

Aix-Marseille Université

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

UFR Sciences et Technologies

Laboratoire de Neurosciences Cognitives - CNRS UMR 7291

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de Docteur

Discipline : Neurosciences

Samira ZTAOU

**Implication des interneurons cholinergiques striataux
dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson :
Etude optogénétique, pharmacologique et comportementale**

Soutenue publiquement le 18/11/2016 devant le jury

Dr. Lydia KERKERIAN-LE GOFF	Aix-Marseille Université, France	Présidente
Pr. Salah EL MESTIKAWY	Université McGill, Canada	Rapporteur
Pr. Wassilios MEISSNER	Université de Bordeaux, France	Rapporteur
Pr. Antonio PISANI	Université de Rome, Italie	Examineur
Dr. Martine LIBERGE	Aix-Marseille Université, France	Co-directrice
Dr. Marianne AMALRIC	Aix-Marseille Université, France	Directrice

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué sous la direction des Drs. Martine Liberge et Marianne Amalric, au sein du Laboratoire de Neurosciences Cognitives (CNRS UMR 7291). Les trois premières années de la thèse ont été financées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR). La 4^e année a été financée grâce à l'obtention d'une bourse de fin de thèse par l'association France Parkinson et la Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC).

En premier lieu, je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury, Pr. Salah El Mestikawy, Pr. Wassilios Meissner, Pr. Antonio Pisani et Dr. Lydia Kerkerian-Le Goff d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement mes directrices de thèse, Dr. Martine Liberge et Dr. Marianne Amalric, pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe « Ganglions de la base » au début de mon stage de Master 2 et de la confiance qu'elles m'ont accordée. Outre les connaissances scientifiques que vous m'avez transmises tout au long de ces années, je voudrais avant tout vous remercier pour ce qui, selon moi, a largement contribué au bon déroulement de ma thèse : vos qualités humaines. Martine, dès mon arrivée dans l'équipe, tu m'as prise sous ton aile et transmis ta passion pour le métier de recherche. Au-delà des heures d'expérimentations passées ensemble, tu m'as toujours encouragée à aller plus loin dans ma réflexion. J'ai rencontré une personne empathique et qui ne compte jamais les heures qu'elle accordait aux autres. Marianne, tu m'as tirée vers le haut. Ton bureau a toujours été ouvert, j'ai pu y trouver une écoute bienveillante, de la bonne humeur et de précieux conseils à chaque fois que je passais le pas de la porte. Lors des congrès auxquels nous avons assisté ensemble, j'ai pu me rendre compte de tes qualités relationnelles et de ton ouverture d'esprit. Ces quatre années de thèse m'ont fait grandir et prendre confiance en moi, et c'est en grande partie à toi que je le dois...

Je souhaiterais remercier les personnes sans qui ce travail, initié dans le cadre d'un projet ANR, n'aurait probablement pas vu le jour : Dr. Corinne Beurrier, Dr. Nicolas Maurice, Dr. Florence Jaouen, Dr. Lydia Kerkerian-Le Goff (Institut de Biologie du Développement de Marseille, CNRS UMR 7288). L'aboutissement de ce travail est le reflet d'une fructueuse collaboration qui m'a permis d'assimiler un panel de nouvelles connaissances.

Durant ces quatre années passées au Laboratoire de Neurosciences Cognitives, sous la direction du Dr. Bruno Poucet, j'ai également eu le privilège de faire de belles rencontres... Merci aux membres de ce laboratoire, pour m'avoir offert un lieu de travail convivial, où règne un esprit familial comme il n'a été

vu nulle part ailleurs dans un laboratoire de recherche et que beaucoup nous envient. Merci à vous : Christiane, Abdel, Frédéric, Jean-Luc, Jérémy, Marieke, Mirelle, Eva, Jenny, Boris, Laurence, Bruno P., Etienne, Francesca, Vincent, Franck, Bruno T., Thierry, Marie-Hélène, Christine A., Franck. Et à tous ceux que j'oublie... Merci aux ingénieurs Didier et Simon qui, par leur aide technique, m'ont sauvé la vie à bien des reprises. Merci à Luciana pour sa gentillesse légendaire de la « mamma italiana », Valérie pour être toujours pétillante, Angélique qui, par son sourire, sa bonne humeur et ses mots touchants, m'a apporté du baume au cœur en cette fin de thèse.

Merci aux membres de la Fédération de Recherche 3C : Christine M., Nathalie L., Danny, Loïc, Sandrine ainsi qu'à l'ensemble des personnels animaliers, passés ou présents, qui a pris soin de nos animaux : Valérie, Elodie, Jean-Baptiste, Yannick, Edward et Inès.

Merci aux membres du Laboratoire de Neurosciences Intégratives et Adaptatives : Jacques, Brahim, Nicolas et Yoh'i pour votre bienveillance et vos conseils. Je souhaiterais remercier Isabelle qui m'a beaucoup aidé pour les expérimentations immunohistologiques. Merci à Gaëlle (NICN UMR 7259) pour son expertise en biologie moléculaire et tout le temps qu'elle m'a accordé.

Merci à Stefania, Joanna, Julie et la petite dernière Juliette pour la convivialité que vous apportez tous les jours dans notre bureau. Merci à tous ceux qui, par le cadre professionnel, sont devenus des proches : Kévin, Romain, Gêrôme, Nico, Fanny, Christophe, Eddy, Mélody. Et plus particulièrement à Céline, Laura, Olivia et Anahid qui m'ont apporté un soutien sans faille. Cette thèse s'est déroulée dans une ambiance très chaleureuse grâce à vous les filles.

Je voudrais également profiter de ces quelques lignes pour remercier mes amis de longue date qui comprendront que, par pudeur (et par manque de place), je ne puisse résumer en quelques mots toute l'affection que je leur porte. Merci... Pas seulement pour le soutien que vous avez su m'apporter durant ces années de thèse, mais tout simplement de faire partie de ma vie : Florence, Laurina, Pierre-François, Carine, Pascale, Jean-Patrick, Isabelle et Aurélien, Sébastien, Marion, Julie R., Jenny et Alex, Christelle, Lisa L., Lisa P., Julie C., Julie P., Marie-Ange, Andrea, Michael. Les longues conversations au téléphone, les retrouvailles chez nous en Corse, les voyages, les soirées, les surprises, les éclats de rire, les larmes. Tous ces moments à vos côtés... Je ne les oublierai jamais !

Enfin, merci à toute ma famille, ma sœur et mon frère, et plus particulièrement à mes parents, sans lesquels je ne serai pas arrivée jusque-là aujourd'hui. Pour tout ce que vous avez toujours fait. Vous avez toujours encouragé mes choix. Votre amour inconditionnel et votre soutien m'ont porté jusqu'ici, et je l'espère, me porteront encore loin...

Table des matières

Résumé

Abstract

Table des illustrations

Liste des abréviations

INTRODUCTION 1

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 7

Chapitre 1 : La Maladie de Parkinson 9

1. Epidémiologie 11

2. Etiologie 11

3. Symptomatologie 12

3.1. Symptômes moteurs 12

3.2. Symptômes non-moteurs 13

4. Physiopathologie 16

4.1. Corps de Lewy 16

4.2. Altérations dopaminergiques 19

4.2.1. Système dopaminergique 19

4.2.2. Dégénérescence de la voie nigrostriatale 20

4.3. Autres altérations non-dopaminergiques 21

4.3.1. Système noradrénergique 22

4.3.2. Système sérotoninergique 22

4.3.3. Système glutamatergique 23

4.3.4. Système cholinergique 23

5. Approches thérapeutiques 26

5.1. Traitements pharmacologiques 27

5.1.1. Traitements dopaminergiques 27

5.1.2. Traitements non-dopaminergiques 30

5.2. Traitements neurochirurgicaux 33

5.2.1. Stimulation cérébrale à haute fréquence 33

6.	Modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson	35
6.1.	Modèles pharmacologiques	36
6.1.1.	Modèle réserpine	36
6.1.2.	Modèle halopéridol	36
6.2.	Modèles neurotoxiques	37
6.2.1.	Modèle MPTP	38
6.2.2.	Modèle 6-OHDA	39
6.3.	Vers des modèles expérimentaux plus proches de la pathologie	43

Chapitre 2 : Les Ganglions de la Base 47

1.	Description des ganglions de la base	49
2.	Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base	50
2.1.	Fonctionnement physiologique	52
2.2.	Dysfonctionnement dans la maladie de Parkinson	55
3.	Vers une remise en cause du modèle classique	56

Chapitre 3 : Le Striatum 61

1.	Description du striatum	63
1.1.	Territoires fonctionnels	63
1.1.1.	Striatum dorsal et ventral	63
1.1.2.	Striosomes et matrice extrastriosomale	64
1.2.	Populations neuronales	65
1.2.1.	Neurones de projection GABAergiques	66
1.2.2.	Interneurones GABAergiques	68
1.2.3.	Interneurones cholinergiques	69
2.	Organisation anatomo-fonctionnelle du striatum	72
2.1.	Modulation cholinergique du striatum	73
2.1.1.	Modulation muscarinique des MSNs	76
2.1.2.	Modulation muscarinique des ChIs	76
2.1.3.	Modulation muscarinique des terminaisons glutamatergiques	77
2.1.4.	Modulation muscarinique des interneurones GABAergiques	77
2.1.5.	Modulation muscarinique des terminaisons dopaminergiques	77

3.	Interaction dopamine/acétylcholine	78
3.1.	Fonctionnement physiologique	78
3.2.	Dysfonctionnement dans la maladie de Parkinson	81
4.	Rôle de l'acétylcholine striatale	82
4.1.	Rôle de l'acétylcholine striatale dans les processus cognitifs	82
4.2.	Rôle de l'acétylcholine striatale dans les déficits non-moteurs	84

MÉTHODOLOGIE 89

1.	Optogénétique	91
1.1.	Principe et fonctionnement	91
1.2.	Mise en place de la technique	94
1.2.1.	Approche virale	94
1.2.2.	Approche transgénique	96
1.2.3.	Implantation des fibres optiques	98
1.2.4.	Conditions de stimulation	99
2.	Lésion 6-OHDA	100
2.1.	Animaux	100
2.2.	Chirurgie	100
3.	Tests comportementaux	101
3.1.	Tests moteurs	101
3.1.1.	Catalepsie	101
3.1.2.	Openfield	102
3.1.3.	Cylindre	103
3.1.4.	Cross maze	104
3.1.5.	Pôle	105
3.1.6.	Rotation à l'amphétamine	105
3.2.	Tests non-moteurs	105
3.2.1.	Openfield	105
3.2.2.	Labyrinthe en croix surélevé	106
3.2.3.	Reconnaissance sociale	107
3.2.4.	Reconnaissance spatiale	108
3.2.5.	Reconnaissance d'un nouvel objet	109
4.	Substances pharmacologiques	112

RÉSULTATS	115
Article 1	117
Article 2	147
Article 3	163
 DISCUSSION	 205
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 231
 VALORISATION DE LA THÈSE	 277

Résumé

La maladie de Parkinson (MP) est caractérisée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* qui innervent le striatum, structure sous-corticale impliquée dans le contrôle moteur, la mémoire et les comportements émotionnels. La perte de cette innervation entraîne une réorganisation fonctionnelle du striatum à l'origine des déficits observés dans la MP. Les interneurons cholinergiques (ChIs) striataux, en particulier, jouent un rôle clef dans cette réorganisation en modulant l'activité des neurones de projection striataux (MSNs).

Ce travail de thèse vise à étudier l'implication des ChIs dans les mécanismes qui sous-tendent l'expression des déficits moteurs, cognitifs et émotionnels mesurés dans différents modèles de la MP chez la souris (modèle pharmacologique de la catalepsie induite par l'halopéridol et modèles lésionnels induits par l'injection unilatérale ou bilatérale de 6-hydroxydopamine). Par une approche optogénétique, nous avons stimulé ou inhibé spécifiquement l'activité des ChIs striataux exprimant la channel- ou l'halo-rhodopsine chez des souris transgéniques ChAT^{cre/cre}. Nous avons ensuite caractérisé les récepteurs muscariniques (mAChRs) impliqués dans l'expression des déficits comportementaux par des injections périphériques ou striatales d'agonistes et d'antagonistes sélectifs des sous-types de mAChRs M1 et M4.

Nous montrons que l'inactivation optogénétique des ChIs réduit les déficits moteurs (akinésie, asymétrie posturale, déficit sensori-moteur) induits par l'halopéridol et par la lésion nigrostriatale unilatérale totale. Les enregistrements électrophysiologiques montrent que l'inhibition des ChIs réduit l'excitabilité des MSNs et rétablit l'équilibre d'activité des deux voies de sortie striatale. Ces effets antiparkinsoniens sont reproduits par le blocage pharmacologique striatal des mAChRs M1 et M4. Ils sont dus à une action préférentielle de l'ACh sur les mAChRs au niveau des MSNs à l'origine de la voie striatonigrale puisqu'ils disparaissent chez des souris invalidées pour les récepteurs M4 exprimés dans ces neurones. La photoinhibition des ChIs réduit les déficits mnésiques et l'anxiété causés par une lésion dopaminergique bilatérale partielle. L'antagoniste des mAChRs M1 réduit l'anxiété mais est inefficace sur les déficits mnésiques, suggérant que d'autres récepteurs cholinergiques striataux puissent être engagés dans les fonctions mnésiques.

L'ensemble de nos résultats apporte un éclairage nouveau sur l'implication des ChIs striataux dans le fonctionnement physiologique et pathologique du striatum.

Mots clés: interneurons cholinergiques; striatum; maladie de Parkinson; déficits moteurs et non-moteurs; récepteurs muscariniques.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is characterized by a progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra *pars compacta* that innervate the striatum, a subcortical structure involved in motor control, memory and emotional behaviors. The loss of dopaminergic innervation leads to a functional reorganization of the striatum circuitry underlying deficits in PD. Striatal cholinergic interneurons (ChIs), in particular, play a key role in this reorganization by modulating striatal projection neurons (MSNs).

This study aims to investigate the involvement of ChIs in the mechanisms underlying the expression of motor, cognitive and emotional deficits observed in different models of PD in mice (pharmacological haloperidol-induced catalepsy model and 6-hydroxydopamine unilateral or bilateral lesion models). Using optogenetics approaches, we activated or inhibited specifically striatal ChIs activity expressing channel- or halo-rhodopsin in transgenic mice ChAT^{cre/cre} mice. We then characterized cholinergic muscarinic receptors (mAChRs) involvement in the expression of the deficits by studying the effects of systemic or intrastriatal injections of selective agonist and antagonist subtypes M1 and M4 mAChRs.

We showed that ChIs photoinhibition reduced motor deficits (akinesia, postural asymmetry, sensorimotor deficit) induced by haloperidol treatment and by unilateral total nigrostriatal lesion. Electrophysiological recordings show that ChIs photoinhibition reduces MSNs excitability and restores the balance between the two striatal output pathways. These antiparkinsonian effects are reproduced by pharmacological intrastriatal blockade of M1 and M4 mAChRs. They are due to a preferential action of ACh on mAChRs expressed on striatonigral MSNs since the deficits disappear in mutant mice that lack M4 mAChRs only in these neurons. ChIs photoinhibition reduces memory deficits and anxiety induced by a partial bilateral dopamine lesion. M1 mAChRs antagonist reduces anxiety but is inefficient on memory deficits, suggesting that other cholinergic receptors might be involved in striatal memory functions.

Overall, these results give new insights on the role of cholinergic interneurons in the normal and pathological functioning of the striatum.

Key words: cholinergic interneurons; striatum; Parkinson's disease; motor and non-motor deficits; muscarinic receptors.

Tables des illustrations

Figures

Figure 1 : Corps de Lewy	16
Figure 2 : Stades de progression de la maladie de Parkinson	17
Figure 3 : Système dopaminergique	19
Figure 4 : Système cholinergique	24
Figure 5 : Evolution du traitement par la L-DOPA au fil des années	28
Figure 6 : Stimulation cérébrale à haute fréquence du noyau subthalamique	34
Figure 7 : Mode d'action des neurotoxines MPTP et 6-OHDA	38
Figure 8 : Modèles de lésion 6-OHDA	41
Figure 9 : Anatomie des ganglions de la base	49
Figure 10 : Circuits fonctionnels des ganglions de la base	51
Figure 11 : Organisation anatomo-fonctionnelle des GB en situation physiologique	53
Figure 12 : Organisation anatomo-fonctionnelle des GB en situation pathologique	55
Figure 13 : Voies striato-nigro-striatales	57
Figure 14 : Modèle d'inhibition des programmes moteurs concurrents	58
Figure 15 : Modèle actualisé de la circuiterie des ganglions de la base	59
Figure 16 : Striatum dorsal et ventral	64
Figure 17 : Striosomes et matrice extrastriosomale	65
Figure 18 : Neurones de projection épineux GABAergiques	67
Figure 19 : Interneurones cholinergiques	70
Figure 20 : Expression des récepteurs sur les interneurones cholinergiques	71
Figure 21 : Innervation cholinergique striatale	73
Figure 22 : Modulation cholinergique de la signalisation striatale	75
Figure 23 : Modèle de convergence	87
Figure 24 : Principe de l'optogénétique	92
Figure 25 : Etapes de l'optogénétique	94
Figure 26 : Approche virale	95
Figure 27 : Approche transgénique	97
Figure 28 : Spécificité de l'expression de l'halorhodopsine	98

Figure 29 : Test de la catalepsie	102
Figure 30 : Test du cylindre	103
Figure 31 : Test du cross maze	104
Figure 32 : Test de l'openfield	106
Figure 33 : Test du labyrinthe en croix surélevé	107
Figure 34 : Test de reconnaissance sociale	108
Figure 35 : Test de reconnaissance spatiale	109
Figure 36 : Test de reconnaissance d'un nouvel objet	110
Figure 37 : Injections intrastriales des substances pharmacologiques	112

Tableaux

Tableau 1 : Symptômes non-moteurs de la maladie de Parkinson	14
Tableau 2 : Distribution des récepteurs muscariniques dans le cerveau de rongeur	25
Tableau 3 : Modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson	46
Tableau 4 : Deux populations de MSNs	68
Tableau 5 : Récapitulatif des tests comportementaux effectués dans nos travaux	111
Tableau 6 : Récapitulatif des substances pharmacologiques utilisées dans nos travaux	113

Liste des abréviations

La majorité des acronymes cités tout au long de ce manuscrit sont conservés sous leur forme anglophone afin de faciliter la correspondance avec les études de la littérature.

6-OHDA	6-hydroxydopamine
AAV	Virus adéno-associé (« adeno-associated virus »)
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate
AMPc	Adénosine mono-phosphate cyclique
ChAT	Choline acétyltransférase
ChIs	Interneurones cholinergiques (« cholinergic interneurons »)
ChR2	Channelrhodopsine-2
COMT	Catechol-O-methyltransferase
COMTIs	Inhibiteurs de la COMT (« catechol-O-methyltransferase inhibitors »)
DA	Dopamine
DLS	Striatum dorsolatéral (« dorsolateral striatum »)
DMS	Striatum dorsomédian (« dorsomedian striatum »)
EAATs	Transporteurs des acides aminés excitateurs
EF-1α	Elongation factor 1-alpha 1
eNpHR	Halorhodopsine
EP	Noyau entopédonculaire (« entopeduncular nucleus »)
EYFP	Enhanced yellow fluorescent protein
FS	Interneurones à décharge rapide (« fast spiking interneurons »)
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GB	Ganglions de la base
GP	Globus pallidus
GPe	Globus pallidus externe

GPi	Globus pallidus interne
i.p.	Intrapéritonéal
i.s.	Intrastriatal
KO	Knock-out
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine ou Levodopa
LRRK2	Leucine rich repeat kinase 2
LTD	Dépression à long terme (« long-term depression »)
LTP	Potentialisation à long terme (« long-term potentiation »)
LTS	Interneurones à décharge lente (« low-threshold spike interneurons »)
mAChRs	Récepteurs cholinergiques muscariniques (« muscarinic acetylcholine receptors »)
MAOB	Monoamine oxydase B
MAOBIs	Inhibiteurs de la MAOB (« monoamine oxidase inhibitors »)
McN	McN-A-434
MFB	Faisceau médian du télencéphale (« medial forebrain bundle »)
mGluRs	Récepteurs métabotropiques du glutamate (« metabotropic glutamate receptors »)
MORs	Récepteurs opioïdes μ (« μ -opioid receptors »)
MP	Maladie de Parkinson
MPDP⁺	1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium
MPP⁺	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MSNs	Neurones épineux de taille moyenne (« medium spiny neurons »)
nAChRs	Récepteurs cholinergiques nicotiniques (« nicotinic acetylcholine receptors »)
NK1	Neurokinine 1
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PDC	L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
PLTS	Interneurones à décharge lente et persistante (« persistent and low-threshold spike »)
PPN	Noyau pédonculopontin (« pedunculopontine nucleus »)
RFP	Red Fluorescent Protein
SNC	Substance noire <i>pars compacta</i>
SNr	Substance noire <i>pars reticulata</i>

STN	Noyau subthalamique (« subthalamic nucleus »)
TANs	Neurones à activité tonique (« Tonicly Active Neurons »)
TH	Tyrosine hydroxylase
VACht	Transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (« vesicular acetylcholine transporter »)
VGLUT3	Transporteur vésiculaire du glutamate (« vesicular glutamate transporter type 3 »)
VTa	Aire tegmentale ventrale (« ventral tegmental area »)
WPRE	Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element

INTRODUCTION

Le striatum constitue la structure d'entrée principale des ganglions de la base, un ensemble de noyaux sous-corticaux fortement interconnectés impliqués dans le traitement d'informations motrices, associatives et limbiques au sein de circuits cortico-striato-thalamo-corticaux. Le striatum est impliqué dans des fonctions variées allant du contrôle de l'exécution motrice, l'apprentissage moteur, la mémoire, la motivation aux comportements émotionnels. Le rôle du striatum dans la régulation des processus moteurs est connu du fait des maladies neurodégénératives qui affectent son activité, comme la maladie de Huntington ou la maladie de Parkinson (Kreitzer and Malenka, 2008).

Le striatum est constitué de 95% de neurones de projection épineux GABAergiques appelés « Medium Spiny Neurons » (MSNs) qui reçoivent des afférences glutamatergiques du cortex cérébral et du thalamus mais aussi des afférences dopaminergiques issues de la substance noire *pars compacta* (SNc). En plus des MSNs, le striatum compte également 1-2% d'interneurones cholinergiques (ChIs). Malgré leur faible proportion, les ChIs, grâce à leur arborisation neuritique très étendue majoritairement dirigée vers les MSNs, jouent un rôle clef dans le contrôle de l'excitabilité de ces neurones et, *in fine*, dans l'exécution des programmes moteurs (Tepper and Bolam, 2004). Le striatum contrôle au travers de deux voies fonctionnellement opposées, directe et indirecte, l'activité des structures de sortie des ganglions de la base. En situation physiologique, l'équilibre entre l'action excitatrice de la voie directe et l'action inhibitrice de la voie indirecte est indispensable pour réguler l'activité des structures de sortie des ganglions de la base, lesquelles, via le thalamus, exercent un contrôle inhibiteur tonique sur les aires corticales (Albin et al., 1989; DeLong, 1990).

Dans la maladie de Parkinson, la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la SNc entraîne un déséquilibre de l'activité de ces deux voies striatales qui se manifeste par l'apparition de symptômes moteurs caractéristiques tels que les tremblements de repos, l'akinésie (incapacité à initier et exécuter les mouvements volontaires) et la rigidité musculaire. La perte des projections nigrostriatales induit ainsi une diminution de l'activité de la voie directe facilitatrice du mouvement conjointement à une augmentation de l'activité de la voie indirecte inhibitrice du mouvement (Albin et al., 1989; DeLong, 1990). Au final, le déséquilibre de ces deux voies provoque une augmentation de l'activité générale des structures de sortie et par conséquent un renforcement

de l'inhibition de la voie thalamo-corticale responsable du symptôme akinétique observé chez les patients parkinsoniens.

Des modèles animaux expérimentaux de la maladie de Parkinson ont également montré que la diminution de dopamine striatale entraîne une libération accrue d'acétylcholine (Pisani et al., 2007; Bonsi et al., 2011) et/ou une hyperexcitabilité des ChIs (Fino et al., 2007; Maurice et al., 2015) ainsi qu'une réorganisation de leur connectivité au sein du striatum (Salin et al., 2009). Cette altération proviendrait de la perte du contrôle inhibiteur de la dopamine nigrostriatale (Maurice et al., 2004; Cragg, 2006; Ding et al., 2006; Pisani et al., 2007; Bonsi et al., 2011). Ainsi, les ChIs participeraient à l'activité dérégulée des MSNs dans la situation pathologique.

Avant l'avènement de la L-DOPA (Levodopa ou L-3,4-dihydroxyphenylalanine) qui constitue à l'heure actuelle le traitement symptomatique le plus efficace pour restaurer le taux de dopamine striatale, la stratégie initiale proposée par Charcot consistait en l'utilisation de substances anticholinergiques. L'efficacité des anticholinergiques sur les symptômes moteurs parkinsoniens, abandonnés en raison de leur action centrale non-spécifique induisant de nombreux effets secondaires, renforce l'idée d'un rôle fondamental de l'acétylcholine dans la pathologie. Cette observation clinique a amené **l'hypothèse selon laquelle la dopamine et l'acétylcholine joueraient un rôle opposé dans la régulation des fonctions striatales et que le déséquilibre entre le système dopaminergique et le système cholinergique participerait à l'apparition des déficits moteurs et non-moteurs de la maladie de Parkinson** (Calabresi et al., 2006; Pisani et al., 2007; Lester et al., 2010).

Bien que le déséquilibre entre le système dopaminergique et le système cholinergique au niveau du striatum semble jouer un rôle clef dans l'apparition des symptômes parkinsoniens, les mécanismes responsables de ces changements d'activité sont loin d'être élucidés. De plus, au niveau électrophysiologique et pharmacologique, les mécanismes sont encore plus complexes, du fait de la diversité des récepteurs cholinergiques, qu'ils soient nicotiniques ou muscariniques. Les mécanismes précis responsables de cet équilibre entre le système dopaminergique et le système cholinergique restent à déterminer. La découverte de nouvelles molécules plus sélectives d'un sous-type de récepteurs muscariniques (Langmead et al., 2008) et le développement de souris *knock-out* génétiquement modifiées pour ne plus exprimer un sous-type de récepteurs muscariniques

(Wess et al., 2007) soulignent le **regain d'intérêt porté à la compréhension du rôle de l'activité cholinergique striatale dans les mécanismes physiopathologiques des ganglions de la base qui sous-tendent l'expression des symptômes moteurs et non-moteurs de la maladie de Parkinson** (Pisani et al., 2007; Bonsi et al., 2011; Goldberg et al., 2012).

Notre travail de thèse s'inscrit dans ce cadre conceptuel. Notre collaboration avec l'équipe du Dr. Lydia Kerkerian-Le Goff (Institut de Biologie du Développement de Marseille, IBDM CNRS UMR 7288) dans le cadre d'un projet ANR (ANR-2010-1416) a été de comprendre comment l'acétylcholine contribue aux changements d'activité opposés des voies directe et indirecte des ganglions de la base après déplétion dopaminergique, et d'en mesurer la résultante fonctionnelle.

Dans la première partie de ce manuscrit (**Rappels bibliographiques**), nous rappellerons brièvement les données de la littérature dans lesquelles nos travaux de thèse se situent. Dans le premier chapitre (**Chapitre 1**), nous aborderons les rappels bibliographiques concernant la maladie de Parkinson, en détaillant les déficits moteurs et non-moteurs, ainsi que les altérations physiopathologiques et les modèles animaux expérimentaux de la maladie utilisés en recherche. Dans le deuxième chapitre (**Chapitre 2**), nous rappellerons l'organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base en condition physiologique et pathologique, ainsi que les limites du modèle classique de l'organisation des ganglions de la base. Enfin, dans le troisième chapitre (**Chapitre 3**), nous aborderons l'organisation anatomo-fonctionnelle du striatum au sein des ganglions de la base, et nous détaillerons plus particulièrement la modulation cholinergique de l'activité striatale et les interactions entre le système dopaminergique et le système cholinergique.

La deuxième partie du manuscrit (**Méthodologie**) sera consacrée aux aspects méthodologiques mis en œuvre pour répondre à notre hypothèse de travail et notamment le choix de l'optogénétique pour étudier spécifiquement et exclusivement les ChIs qui ne représentent que 1-2% de la population neuronale totale du striatum.

Dans la troisième partie du manuscrit (**Résultats**), nos contributions expérimentales seront présentées sous forme d'articles publiés ou actuellement soumis à publication. La première étude

(**Article 1**) a consisté à caractériser, par une approche optogénétique, l'implication des ChIs dans les mécanismes qui sous-tendent l'expression des déficits moteurs tels que l'akinésie, l'asymétrie posturale et les déficits sensori-moteurs, après déplétion dopaminergique, sur deux modèles animaux expérimentaux de la maladie de Parkinson : un modèle pharmacologique et un modèle de lésion unilatérale induit par la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) injectée dans la SNc. Dans la deuxième étude (**Article 2**), nous avons étudié plus spécifiquement les récepteurs cholinergiques muscariniques potentiellement impliqués dans les effets antiparkinsoniens observés précédemment, notamment les récepteurs muscariniques M1 et M4, du fait de leur abondance prépondérante dans le striatum. Dans la troisième étude (**Article 3**), nous nous sommes intéressés à l'implication des ChIs et des récepteurs M1 dans l'expression des déficits cognitifs (déficits de la mémoire sociale à court terme et de la mémoire spatiale) et émotionnels (anxiété), sur un modèle de lésion bilatérale partielle induite par l'injection de 6-OHDA au niveau du striatum dorsal mimant les stades précoces de la maladie.

Enfin, les thèmes abordés et les résultats émanant de ce travail de thèse seront discutés dans la quatrième et dernière partie de ce manuscrit (**Discussion**).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre 1

La Maladie de Parkinson

Chapitre 1 : La Maladie de Parkinson

1. Epidémiologie

En 1817, dans un ouvrage intitulé « *An essay on the shaking palsy* », James Parkinson décrit, pour la première fois, les symptômes d'une maladie nommée « *paralysis agitans* ». Renommée dans les années 1860 par Jean-Martin Charcot, la maladie de Parkinson (MP) est aujourd'hui considérée comme la seconde maladie neurodégénérative en terme de prévalence après la maladie d'Alzheimer. Généralement, la MP est diagnostiquée entre 55 et 65 ans mais des formes précoces ont été également décrites. Sa prévalence est estimée à 1.8% de la population de plus de 65 ans en Europe, allant de 0.6% entre 65 et 69 ans à 2.6% entre 85 et 89 ans (de Rijk et al., 2000). Elle est distribuée de manière similaire entre les hommes et les femmes (de Lau and Breteler, 2006). En raison du vieillissement démographique, cette prévalence s'accroît et la MP pourrait, dans les années à venir, représenter un véritable problème de santé public.

2. Etiologie

La MP se caractérise par une dégénérescence lente et progressive des neurones dopaminergiques. Dans la majorité des cas, l'affection est sporadique mais il existe des formes familiales relativement rares (10 à 15% des cas). Son étiologie ainsi que les mécanismes dégénératifs conduisant à la mort des neurones dopaminergiques demeurent encore peu connus. Des facteurs environnementaux, tels que l'exposition aux pesticides et/ou aux métaux lourds, et la prédisposition génétique seraient impliqués dans le déclenchement de la pathologie.

Il est admis que plusieurs mécanismes peuvent intervenir dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Parmi eux, on décrit la production de radicaux libres, qui conduit à un stress oxydatif, des dysfonctionnements mitochondriaux qui induisent un déficit énergétique cellulaire, des mécanismes d'excitotoxicité et de neuroinflammation et enfin l'accumulation anormale de protéines telles que l' α -synucléine (Dawson and Dawson, 2003; Schapira and Jenner, 2011; Hirsch et al., 2013;

Michel et al., 2016). Ces mécanismes ne sont probablement pas exclusifs et peuvent s'associer pour induire la perte neuronale. Bien que ces différentes hypothèses puissent expliquer, du moins en partie, l'étiologie de la MP, il est souvent complexe de distinguer les facteurs à l'origine du processus neurodégénératif de ceux qui en sont la conséquence.

3. Symptomatologie

La symptomatologie clinique de la MP est la conséquence directe de l'altération du système dopaminergique. Les premiers troubles moteurs apparaissent lorsque la dégénérescence atteint 50-60% des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (SNc) et 70-80% de leurs terminaisons dans le striatum (Meissner, 2012).

3.1. Symptômes moteurs

Les principaux troubles moteurs caractéristiques de la MP forment une triade symptomatique motrice comprenant un tremblement de repos, une akinésie et une rigidité musculaire.

Tremblement de repos

Les tremblements de repos sont le symptôme le plus caractéristique de la MP. Retrouvés chez 75% des patients, il s'agit de la première manifestation motrice de la pathologie. Ce sont des tremblements lents, asymétriques et réguliers avec une fréquence entre 4 et 6 hertz et une amplitude faible, variant selon les activités ou encore le stress (Stanley-Jones, 1956). Les tremblements de repos concernent généralement les extrémités des membres supérieurs et cessent lors de l'initiation d'un mouvement.

Akinésie et bradykinésie

L'akinésie se caractérise par une incapacité à initier et exécuter les mouvements volontaires. Elle s'accompagne souvent d'une hypokinésie qui reflète une réduction de l'amplitude des mouvements et/ou d'une bradykinésie qui traduit une lenteur d'exécution des mouvements. La réduction des mouvements volontaires concerne les gestes rapides ainsi que les mouvements fins et complexes, ce qui entraîne une gêne à la réalisation des actes moteurs du quotidien. Pour cette raison, l'akinésie est l'un des symptômes moteurs les plus invalidants de la MP (Schrag et al., 2000).

Rigidité musculaire

La rigidité musculaire est causée par une augmentation du tonus musculaire (hypertonie) et requiert des mécanismes compensatoires pour supporter la contrainte motrice supplémentaire. Elle affecte globalement tous les muscles mais prédomine sur les muscles fléchisseurs (Delwaide et al., 1986).

À cette triade s'ajoutent également d'autres symptômes moteurs présents à un stade plus tardif de la maladie. L'instabilité posturale se traduit par une altération du réflexe du maintien postural et se manifeste habituellement entre dix à douze ans après les premiers symptômes. Elle est souvent associée à des troubles de la marche et de l'équilibre, à l'origine de chutes fréquentes (Bloem, 1992; Kim et al., 2013). Parmi les troubles de la marche, on retrouve le phénomène de « freezing » ou blocage qui se caractérise par un piétinement sur place avant l'initiation de la marche ou lors d'un changement de direction (Giladi et al., 1992).

3.2. Symptômes non-moteurs

Longtemps considérée comme une pathologie touchant essentiellement la motricité, la MP présente également des troubles non-moteurs qui occupent une place non négligeable dans la pathologie et sont particulièrement handicapants pour les patients (Schrag et al., 2000; Muzerengi et al., 2007). Ces symptômes non-moteurs sont divers et parfois affectent les patients avant même l'apparition des symptômes moteurs (Chaudhuri et al., 2006; 2011). Parmi les symptômes non-moteurs résumés dans le [Tableau 1](#), on retrouve des désordres neuropsychiatriques, des troubles du sommeil, du système nerveux autonome ou végétatif (gastro-intestinaux, urinaires, sexuels, etc.) ainsi que des troubles sensoriels (visuels et olfactifs).

Troubles neuropsychiatriques

- Dépression, apathie, anxiété
- Anhédonie
- Déficit attentionnel
- Hallucinations
- Démence
- Comportement compulsif ou répétitif
- Confusion
- Délire
- Psychose

Troubles du sommeil

- Mouvements périodiques et brusques de membres
- Troubles du sommeil lent
- Troubles du sommeil paradoxal, perte de l'atonie musculaire
- Agitation nocturne
- Somnolence diurne excessive
- Insomnie
- Troubles respiratoires du sommeil

Troubles du système nerveux autonome

- Sudation excessive
- Troubles urinaires : fréquence excessive des mictions nocturnes (pollakiurie)
- Hypotension orthostatique : chutes, douleur cervico-scapulaire
- Troubles sexuels : hypersexualité, impuissance érectile
- Sécheresse oculaire (xérophtalmie)

Troubles gastro-intestinaux

- Hypersalivation
- Dysphagie
- Perte des fonctions gustatives (agueusie)
- Reflux, vomissement
- Nausées
- Constipation
- Incontinence fécale

Troubles sensoriels

- Douleurs
- Trouble de la sensibilité tactile (paresthésie)
- Trouble de l'olfaction

Autres symptômes

- Fatigue
 - Vision double (diplopie)
 - Vision trouble
 - Sécrétion excessive de sébum (séborrhée)
 - Perte de poids ou prise de poids
-

Tableau 1 : Symptômes non-moteurs de la maladie de Parkinson

Les symptômes non-moteurs apparaissent, soit pendant la phase pré-motrice ou prodromique de la maladie, soit suite aux traitements pharmacologiques prescrits aux patients. D'après Chaudhuri et al., 2006.

La complication non motrice considérée comme la plus fréquente est la dépression, affectant près de 45% des patients (Chaudhuri and Schapira, 2009; Chaudhuri and Odin, 2010). Le diagnostic de cet état peut être associé avec de l'anxiété et de l'apathie. L'apathie se caractérise généralement par une perte d'intérêt, un manque d'initiative et une forme d'indifférence à soi et aux autres (Pagonabarraga et al., 2015). Les troubles anxio-dépressifs ainsi que les troubles de l'humeur généralement observés chez les patients parkinsoniens ne relèvent pas uniquement d'une manifestation réactionnelle suite au diagnostic de la maladie, mais sont bien la conséquence de dysfonctionnements cérébraux causés par la pathologie elle-même (*Cf.* Physiopathologie) (Chen and Marsh, 2013; Grover et al., 2015).

Les troubles cognitifs observés chez les patients parkinsoniens touchent essentiellement les fonctions visuo-spaciales, exécutives et mnésiques (Chaudhuri and Schapira, 2009). Ces désordres cognitifs peuvent rester discrets ou évoluer vers la démence dont l'incidence tend à augmenter avec l'âge. On retrouve également des problèmes d'attention et un ralentissement psychomoteur (Caballol et al., 2007). Les démences peuvent parfois être accompagnées de psychoses, généralement caractérisées par des hallucinations visuelles. Elles sont observées chez les patients présentant une détérioration cognitive importante (Grover et al., 2015).

Des altérations du sommeil caractérisées notamment par des insomnies, de la somnolence diurne excessive et une diminution du sommeil lent profond sont couramment décrits (Knie et al., 2011). Parmi les troubles du sommeil, on retrouve aussi une agitation nocturne au cours du sommeil paradoxal, durant laquelle l'inhibition du mouvement n'est plus effectuée et donne lieu à des mouvements brusques et parfois violents (Schrempf et al., 2014).

Une hyposmie ou une anosmie (diminution ou perte de la sensibilité de l'odorat) est également souvent rapportée de manière très précoce chez environ 90% des patients (Chaudhuri and Odin, 2010; Doty, 2012). La multiplicité de ces symptômes non-moteurs peut être due à la déplétion dopaminergique ou à l'atteinte d'autres systèmes, tels que les systèmes noradrénergique, sérotoninergique et cholinergique.

L'un des problèmes majeurs rencontré par les cliniciens est la difficulté à diagnostiquer la maladie à un stade précoce. Une meilleure connaissance des symptômes non-moteurs, apparaissant durant la phase pré-motrice ou prodromique, permettrait un diagnostic plus précoce. En effet,

malgré les recherches actuelles sur des marqueurs biologiques de la MP, les symptômes prodromiques – plus particulièrement l’hyposmie, les troubles gastro-intestinaux, les troubles du sommeil et les troubles neuropsychiatriques – sont les signes pouvant refléter le début de la maladie, 5 à 20 ans environ avant l’apparition des signes moteurs (Meissner, 2012).

4. Physiopathologie

4.1. Corps de Lewy

La principale caractéristique histologique de la MP est la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc associée à la présence d’inclusions intraneurones spécifiques appelées « corps de Lewy ». En 1912, Friedrich Lewy a découvert ces inclusions au niveau du noyau basal magnocellulaire, et du noyau moteur dorsal du nerf vague de cerveaux de sujets parkinsoniens.

Les corps de Lewy correspondent à des agrégats neuronaux de protéines cytoplasmiques, composés d’une accumulation anormale de plusieurs protéines, majoritairement l’ α -synucléine, la parkine, l’ubiquitine, des protéines chaperonnes et des neurofilaments. Ils se présentent sous la forme d’inclusions intracytoplasmiques circulaires de 5 à 25 μ m avec un centre éosinophile dense et une couronne pâle (Braak et al., 2004) ([Figure 1](#)).

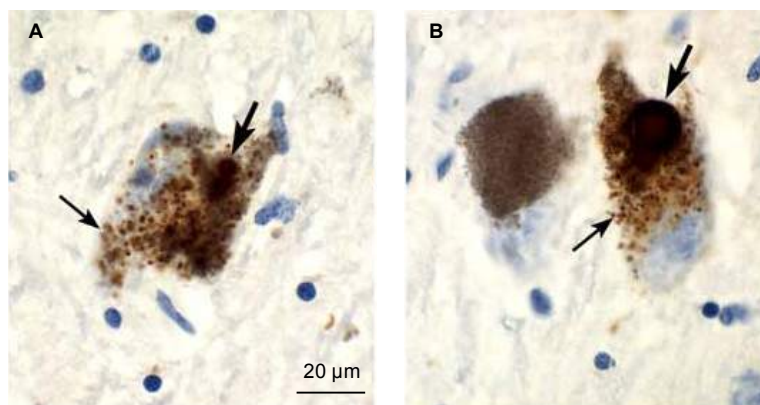


Figure 1 : Corps de Lewy

Mise en évidence de corps de Lewy dans les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (SNc). Les agrégats d’ α -synucléine (flèches fines) s’accumulent pour former les corps de Lewy (flèches larges). L’image B montre un neurone dopaminergique sain sans agrégats d’ α -synucléine (gauche), comparé à un neurone dopaminergique atteint, présentant des corps de Lewy (droite). D’après Braak et al., 2004.

Les corps de Lewy sont présents dans le cytoplasme des neurones dopaminergiques de la SNc mais sont également retrouvés dans un grand nombre de structures cérébrales allant du tronc cérébral, région présentant une perte neuronale importante, vers les régions corticales où l'atteinte est limitée au début de la maladie (Gibb et al., 1991; Jellinger, 1991; Agid et al., 1993; Braak et al., 2002; Del Tredici and Braak, 2016).

La théorie de Braak, basée sur l'accumulation de corps de Lewy de manière progressive dans les différentes régions cérébrales, a conduit à une description de six stades de progression de la maladie (Braak et al., 2002; 2003; 2004) (Figure 2).

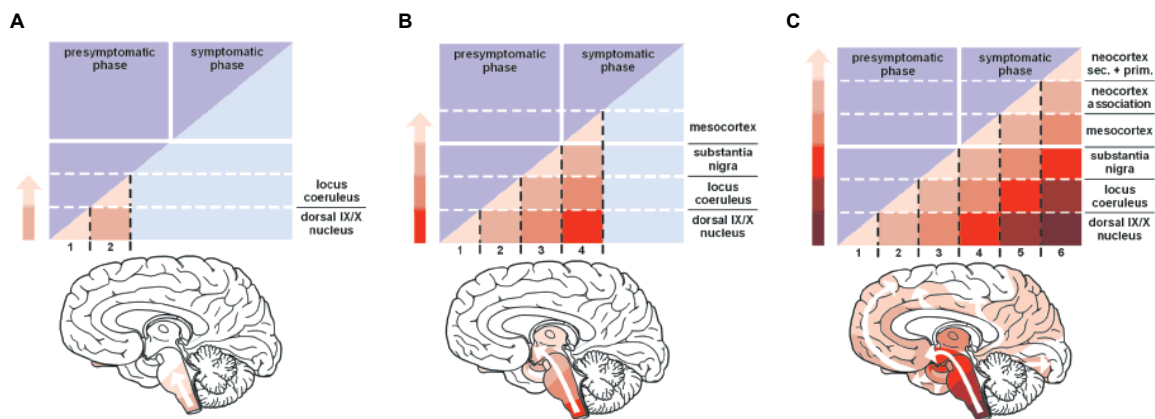


Figure 2 : Stades de progression de la maladie de Parkinson

Stades 1 et 2 (A), stades 3 et 4 (B), stades 5 et 6 (C) de progression de la maladie de Parkinson, définis en fonction du niveau d'accumulation des corps de Lewy dans différentes régions cérébrales. L'axe des abscisses des diagrammes permet de visualiser l'extension du processus pathologique en terme de sévérité. A. Pendant les stades 1 et 2, la présence de corps de Lewy est restreinte au noyau moteur dorsal du nerf vague, les bulbes olfactifs et le locus coeruleus. B. Pendant les stades 3 et 4, la substance noire et le mésocortex sont touchés. C. Les stades 5 et 6 correspondent aux phases avancées où l'atteinte touche l'ensemble du néocortex. D'après Braak et al., 2002.

Les deux premiers stades correspondent à une période pré-clinique de la maladie et pourraient durer jusqu'à plusieurs dizaines d'années. Le **stade 1** débute par l'apparition de corps de Lewy initialement dans le tronc cérébral, qui affectent le noyau moteur dorsal du nerf vague et les bulbes olfactifs. Le **stade 2**, toujours limité au tronc cérébral, montre une expansion des corps de Lewy qui gagne le noyau caudal du raphé, le noyau pédonculopontin ainsi que le locus coeruleus. On ne parle pas encore de MP car aucun symptôme moteur n'est observable, cependant des signes comme

l'anosmie peuvent être retrouvés (Doty, 2012). Le **stade 3** est caractérisé par le début de l'atteinte de la SNc. La dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc, lorsqu'elle est massive, se traduit par l'apparition des symptômes moteurs permettant un diagnostic clinique de la MP. L'accumulation d' α -synucléine affecte aussi le noyau basal de Meynert et l'amygdale, entraînant des troubles de la perception de la douleur et des émotions (Chaudhuri et al., 2011; Winkler et al., 2011). Le **stade 4** montre l'expansion des corps de Lewy vers les régions limbiques et corticales. Lors de ce stade, les troubles neuropsychiatriques peuvent être observés. Enfin, les **stades 5 et 6** correspondent aux phases avancées de la maladie. Le néocortex est davantage touché, les troubles cognitifs empirent et les symptômes moteurs de la MP sont évidents.

La théorie de Braak comporte cependant quelques limites et a été récemment controversée. Bien que les corps de Lewy soient considérés comme des marqueurs anatomiques de la MP, ces inclusions sont également observées lors du processus normal de vieillissement, dans des cas de démences séniles ou dans des pathologies comme la maladie d'Alzheimer. De plus, il est reporté qu'entre 6,3 et 43% des patients parkinsoniens ne suivent pas ce motif d'accumulation de l' α -synucléine (Jellinger, 2009; 2010).

Actuellement, on ne sait toujours pas si la présence de corps de Lewy reflète un mécanisme de défense de la cellule ou s'ils sont directement impliqués dans le processus neurodégénératif. Toutefois, plusieurs hypothèses sont proposées. Les corps de Lewy auraient un rôle protecteur vis-à-vis de la cellule en empêchant l'accumulation toxique des formes insolubles de l' α -synucléine. Cette hypothèse est soutenue par la présence, au sein des corps de Lewy, de protéines impliquées dans les mécanismes de dégradation tels que l'ubiquitine et la parkine. L'ubiquitine élimine les protéines endommagées en s'y liant grâce à une ubiquitine ligase, la parkine. La production de formes non-fonctionnelles de ces deux protéines induit un dysfonctionnement du système de protéolyse intracellulaire, causant ainsi une agrégation de protéines, dont l' α -synucléine, toxiques pour les neurones (Rochet et al., 2012; Michel et al., 2016). Cependant, cette hypothèse est contestée par certains auteurs dont les données suggèrent que l' α -synucléine pourrait, à l'inverse, jouer un rôle protecteur (Manning-Bog et al., 2003; Albani et al., 2004).

4.2. Altérations dopaminergiques

4.2.1. Système dopaminergique

La majorité des neurones dopaminergiques est localisée dans la SNc et l'aire tegmentale ventrale (VTA). Les techniques d'immunofluorescence ont permis de distinguer trois principales voies de transmission dopaminergique issues de ces deux structures (Björklund and Dunnett, 2007; Felten and Shetty, 2010) (**Figure 3**).

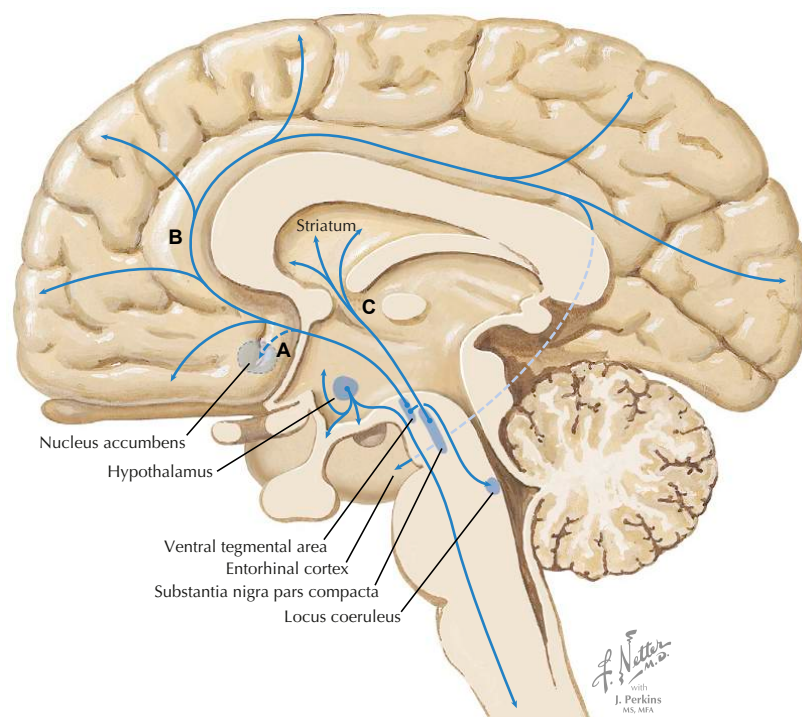


Figure 3 : Système dopaminergique

Les trois principales voies de transmission dopaminergique : la voie mésolimbique (A), la voie mésocorticale (B) et la voie nigrostriatale (C) issues majoritairement de deux structures sous-corticales, la substance noire *pars compacta* (SNc) et l'aire tegmentale ventrale (VTA). D'après Felten and Shetty, 2010.

La **voie mésolimbique**, issue de la VTA, innerve les structures limbiques telles que la partie ventrale du striatum (noyau accumbens), l'hippocampe et l'amygdale, mais aussi des régions du cortex préfrontal médial. Cette voie joue un rôle crucial dans le système de récompense et les comportements dirigés vers un but. La plupart des drogues d'abus agissent sur cette voie en

augmentant la libération de dopamine (DA) par les neurones de la VTA dans l'ensemble de ses sites de projection (Di Chiara and Imperato, 1988a). La **voie mésocorticale** provient également de la VTA et projette sur le cortex cérébral, en particulier les cortex frontal, cingulaire et entorhinal (Oades and Halliday, 1987). Elle est essentielle aux processus mnésiques, motivationnels et émotionnels. Enfin, la **voie nigrostriatale**, originaire de la SNc, projette massivement vers la partie dorsale du striatum (noyau caudé et putamen chez le primate) qui joue un rôle primordial dans le contrôle moteur (Anden et al., 1964; Faull and Carman, 1968), et à un degré moindre vers d'autres structures des ganglions de la base comme le globus pallidus (GP) et le noyau subthalamique (STN) (Lindvall and Björklund, 1979; Hassani et al., 1997).

L'action de la DA est médiée par l'activation de récepteurs dopaminergiques, largement distribués dans le striatum, la SNc, la VTA, le noyau accumbens mais également dans d'autres structures cérébrales, telles que l'hippocampe et le cortex cérébral. Il existe cinq sous-types de récepteurs classés en deux catégories : « D1-like » (sous-types D1 et D5) et « D2-like » (sous-types D2, D3 et D4) classés selon leurs mécanismes de transduction. Les récepteurs « D1-like » sont localisés majoritairement au niveau post-synaptique et présentent une forte affinité pour la DA. Ils sont couplés positivement à l'adénylate cyclase. Les récepteurs « D2-like » ont une affinité moindre pour la DA et sont retrouvés au niveau pré- et post-synaptique. Ils sont couplés négativement à l'adénylate cyclase. L'identification des récepteurs dopaminergiques ainsi que leur distribution et leur mécanisme d'action a représenté un grand intérêt pour la compréhension de la physiopathologie de la MP. Leur connaissance a permis le développement de stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation de composés possédant des affinités sélectives pour ces récepteurs (Brichta et al., 2013).

4.2.2. Dégénérescence de la voie nigrostriatale

La dégénérescence dopaminergique dans la MP est progressive et inégale entre les deux hémisphères cérébraux. La perte de neurones dopaminergiques est plus importante dans un hémisphère cérébral, en particulier dans les premiers stades de la maladie, puis affecte très rapidement les deux hémisphères cérébraux de façon concomitante avec l'évolution des symptômes moteurs qui se bilatéralisent (Brooks and Pavese, 2011).

La dégénérescence des neurones dopaminergiques affecte de manière prépondérante la voie nigrostriatale comparativement aux voies mésolimbique et mésocorticale (Javoy-Agid and Agid, 1980; Hirsch et al., 1988). La perte massive des neurones dopaminergiques nigrostriataux entraîne la disparition de la neuromélanine, un pigment brun présent en quantité importante dans ces neurones, expliquant ainsi la dépigmentation caractéristique de la SNc (Dauer and Przedborski, 2003).

Alors que la perte des neurones dopaminergiques de la SNc peut atteindre jusqu'à 80% dans les stades avancés de la pathologie (Marsden, 1990), la dégénérescence des neurones de la VTA est, en revanche, plus modérée (entre 36 et 55%) (Uhl et al., 1985). Pour autant, des études récentes montrent que l'altération des voies mésolimbique et mésocorticale ne devrait pas être négligée. En effet, la dégénérescence de la voie mésolimbique, bien que faible, joue un rôle majeur dans les aspects non-moteurs de la maladie tels que l'apathie (Levy and Dubois, 2006), les troubles cognitifs (Brown and Marsden, 1990) ou encore les déficits attentionnels (Tröster, 2008). Les troubles exécutifs manifestés par les patients parkinsoniens pourraient être la conséquence secondaire de l'altération de la fonction dopaminergique nigrostriatale mais surtout la conséquence directe de l'altération de la voie mésocorticale (Mattay et al., 2002).

L'hétérogénéité de l'atteinte des neurones dopaminergiques se retrouve également au sein de la SNc. En effet, la perte neuronale est plus marquée dans les parties caudale et ventrolatérale de la SNc, et évoluerait progressivement pour s'étendre aux régions rostrale, dorsale et médiane (Hirsch et al., 1988; Damier et al., 1999). Le striatum dorsal, où les terminaisons dopaminergiques originaires de la SNc sont particulièrement abondantes, est la structure cérébrale la plus affectée par la dégénérescence de la voie nigrostriatale (Anden et al., 1964; Scherman et al., 1989). La perte dopaminergique est prépondérante dans la partie dorsolatérale du putamen où elle peut atteindre jusqu'à 95%, et moindre dans le noyau caudé où l'atteinte avoisine les 60% (Kish et al., 1988). Le déficit est moins marqué dans le striatum ventral.

4.3. Autres altérations non-dopaminergiques

Il apparaît que la perte neuronale associée à la MP n'est pas limitée aux seuls neurones dopaminergiques (Lang and Obeso, 2004). En effet, une dégénérescence concomitante de l'apparition de corps de Lewy et affectant (1) les neurones noradrénergiques du locus coeruleus, (2)

les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé, (3) les neurones glutamatergiques des noyaux intralaminaires du thalamus et (4) les neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert et du noyau pédonculopontin, a également été mise en évidence (Hornykiewicz and Kish, 1987; Agid, 1991).

4.3.1. Système noradrénergique

Des études ont révélé une dégénérescence des neurones noradrénergiques, issus du locus coeruleus dans la MP (Mann et al., 1983; Gaspar et al., 1991; Ehringer and Hornykiewicz, 1998; Delaville et al., 2011). Le locus coeruleus est un noyau du tronc cérébral qui projette vers l'ensemble du cortex, le thalamus, le STN, la SNc, la VTA, le noyau accumbens, l'hippocampe, l'amygdale et le cervelet. La dégénérescence du système noradrénergique au sein du locus coeruleus peut atteindre jusqu'à 80%, une atteinte équivalente voire plus importante que celle des neurones dopaminergiques de la SNc (Zarow et al., 2003). Cette observation conforte la théorie de Braak, qui propose une altération progressive des structures monoaminergiques, affectant d'abord le locus coeruleus au stade 2 avant l'atteinte de la SNc au stade 3 (Braak et al., 2003; 2004; Braak and Del Tredici, 2008).

Le locus coeruleus joue un rôle dans la progression de la MP (Gesi et al., 2000). En effet, une étude montre que la perte des neurones noradrénergiques du locus coeruleus augmente la vulnérabilité des neurones dopaminergiques et exacerbe le développement de la MP, ceci se traduisant par une réduction plus prononcée des fibres dopaminergiques issues de la SNc et globalement de la DA striatale (Rommelfanger and Weinshenker, 2007). La dégénérescence des neurones noradrénergiques issus du locus coeruleus est, par ailleurs, impliquée dans l'apparition de troubles anxieux et l'altération des performances cognitives, notamment des processus attentionnels, observées dans la MP (Berridge and Waterhouse, 2003; Delaville et al., 2011).

4.3.2. Système sérotoninergique

Les neurones sérotoninergiques issus des noyaux du raphé sont également affectés dans la MP. Les noyaux du raphé émettent des projections vers l'ensemble du cerveau. La dégénérescence des neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé peut atteindre jusqu'à 40% chez les patients parkinsoniens (Halliday et al., 1990; Jellinger, 1991). Une diminution importante du taux de sérotonine de plus de 50% est observée dans le cortex de patients parkinsoniens (Scatton et al., 1986).

Une étude récente révèle une perte prépondérante des neurones sérotoninergiques innervant le noyau caudé comparativement au putamen, et suggère un rôle de la dégénérescence sérotoninergique dans les altérations cognitives observées (Kish et al., 2008).

La dégénérescence des neurones sérotoninergiques, associée à la baisse des taux de sérotonine, peut aussi rendre compte en partie des troubles affectifs et notamment de la dépression observée chez les patients parkinsoniens (Mayeux et al., 1988; Frisina et al., 2009; Eskow Jaunarajs et al., 2011; Ballanger et al., 2012). Néanmoins, certains auteurs considèrent la dépression observée dans la MP comme atypique car elle ne répond pas ou très faiblement aux antidépresseurs classiques comme les inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine (Schiffer et al., 1988). Ainsi, alors que certains auteurs attribuent la dépression parkinsonienne à une conséquence directe d'un dysfonctionnement sérotoninergique, d'autres privilégient en revanche l'hypothèse d'une conséquence indirecte du dysfonctionnement des transmissions dopaminergique et noradrénergique (Delaville et al., 2011).

4.3.3. Système glutamatergique

Récemment, il a été montré une perte de 30 à 40% des neurones glutamatergiques issus des noyaux centromédian et parafasciculaire du thalamus chez les patients parkinsoniens (Henderson et al., 2000a; 2000b; Smith et al., 2014). Dans un modèle primate non-humain de la MP, la dégénérescence glutamatergique précéderait celle du système dopaminergique et l'apparition des symptômes moteurs (Smith et al., 2014; Villalba et al., 2014).

La dégénérescence dopaminergique entraîne aussi une perturbation du pattern d'activité des neurones glutamatergiques du noyau sous-thalamique (STN) qui deviennent hyperactifs, traduisant un lien étroit entre ces deux systèmes dans la MP (Bergman et al., 1994; Kreiss et al., 1997).

4.3.4. Système cholinergique

De nombreuses études ont mis en évidence une dégénérescence des neurones cholinergiques, issus principalement du noyau basal de Meynert et du noyau tegmental pédonculopontin dans la MP (Hirsch et al., 1987; Jellinger, 1988; Halliday et al., 1990; Bohnen and Albin, 2011).

Deux voies principales de transmission cholinergique sont issues de ces structures (Felten and Shetty, 2010; Scarr, 2013) ([Figure 4](#)).

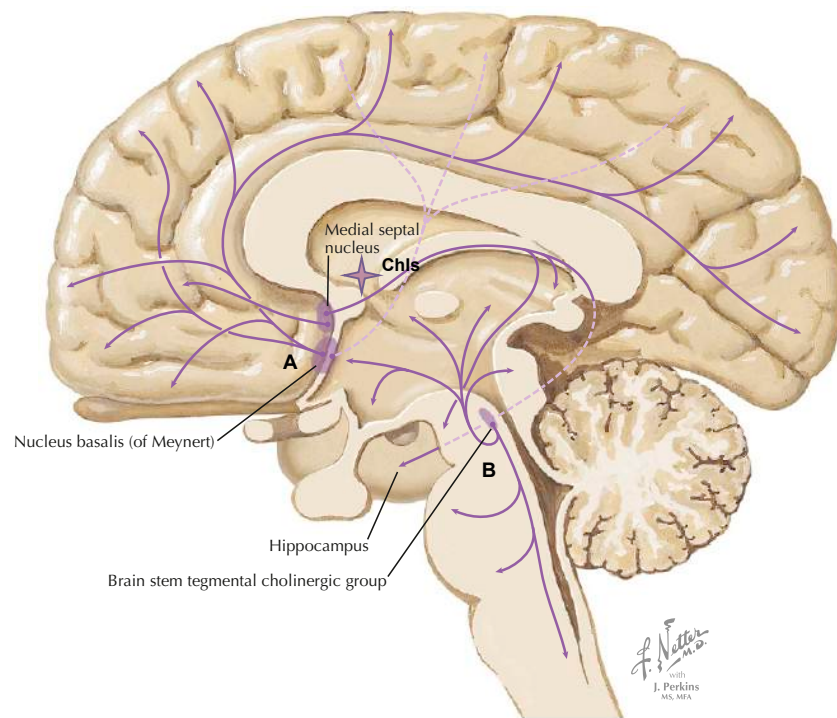


Figure 4 : Système cholinergique

Les deux principales voies de transmission cholinergique : la voie cholinergique du cerveau antéro-basal (A) et la voie cholinergique du tronc cérébral (B) sont issues majoritairement de deux structures sous-corticales, le noyau basal de Meynert et le noyau tegmental pédonculopontin. Les interneurones cholinergiques (ChIs) localisés au niveau du striatum sont représentés par une étoile. D'après Felten and Shetty, 2010.

La **voie cholinergique du cerveau antéro-basal**, incluant le noyau basal de Meynert et le noyau séptal médian, projette vers l'ensemble du cortex cérébral, en particulier vers le cortex cingulaire et le cortex entorhinal mais aussi vers l'hippocampe et l'amygdale. Ces projections cholinergiques vers le cortex et l'hippocampe interviennent dans des processus cognitifs fondamentaux tels que les processus attentionnels et mnésiques (Sarter and Parikh, 2005; Yarnall et al., 2011). La **voie cholinergique du tronc cérébral** issue du noyau tegmental pédonculopontin et du noyau tegmental dorsolatéral, projette vers le thalamus, le striatum, la VTA, la SNc, ainsi que vers d'autres structures du tronc cérébral. Cette voie joue un rôle dans le contrôle moteur mais également dans les processus de récompense et d'apprentissage (Mena-Segovia et al., 2004). On retrouve aussi des **interneurones cholinergiques** (ChIs) localisés au niveau du striatum. Une récente étude montre que la source de l'innervation cholinergique du striatum proviendrait de la voie cholinergique du tronc cérébral (Dautan et al., 2014). Les ChIs, faisant l'objet de nos études, seront plus largement décrits.

L'action de l'acétylcholine (ACh) est médiée par l'activation des récepteurs cholinergiques. On distingue les récepteurs nicotiniques (nAChRs) et muscariniques (mAChRs). Les nAChRs sont des récepteurs ionotropiques. Ils sont composés de cinq sous-unités, qui s'agencent selon une combinaison homo- ou hétéromérique de sous-unités α (2-10) et β (2-4). On observe une spécificité d'expression des sous-unités nicotiniques dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le thalamus, le striatum, la SNc et la VTA (Lucas-Meunier et al., 2003; Brichta et al., 2013). Les mAChRs sont des récepteurs métabotropiques à sept domaines transmembranaires. Il existe cinq sous-types de récepteurs classés en deux catégories. Les mAChRs M1-like (sous-types M1, M3 et M5) couplés aux protéines Gq/11, leur activation entraîne une augmentation du calcium intracellulaire activant la phospholipase C et la protéine kinase C. Les mAChRs M2-like (sous-types M2 et M4) couplés aux protéines Gi/o, leur activation réduit la concentration d'AMPc et inhibe les canaux calciques. Les mAChRs sont exprimés de manière prépondérante comparativement aux nAChRs. Ils sont distribués dans le cortex, l'hippocampe et exprimés en quantité importante dans le striatum (Lucas-Meunier et al., 2003; Langmead et al., 2008; Goldberg et al., 2012; Brichta et al., 2013). Les mAChRs M1, M2 et M4 sont les plus exprimés – leur expression variant selon les structures cérébrales (**Tableau 2**) – tandis que les mAChRs M3 et M5 sont retrouvés en très faible proportion.

Structure cérébrale	Récepteurs M1	Récepteurs M2	Récepteurs M4	Références
Cortex	40%	37%	15%	1 - 2 - 3 - 4
Striatum	30%	20%	45%	1 - 2 - 3 - 4 - 5
Hippocampe	36%	33%	27%	1 - 2 - 3 - 4
Cerveau antéro-basal	–	+++	–	1
Amygdale	+++	+	+	1
Thalamus	+	+++	+	1
Substance noire	–	+	+	1
Tronc cérébral	–	+++	–	1

Tableau 2 : Distribution des récepteurs muscariniques dans le cerveau de rongeur

Distribution des sous-types de récepteurs muscariniques (mAChRs) M1, M2 et M4. Pour chaque sous-type, soit un pourcentage d'expression comparativement aux mAChRs totaux est indiqué, soit une échelle de trois niveaux est établie : (–) absence ; (+) présence faible ; (+++) présence importante. Références : 1. Volpicelli and Levey, 2004 ; 2. Chapman et al., 2011 ; 3. Waelbroeck et al., 1990 ; 4. Yasuda et al., 1993 ; 5. Tayebati et al., 2004.

Dans la MP, les systèmes de transmission cholinergique corticale (la voie cholinergique du cerveau antéro-basal) et sous-corticale (la voie cholinergique du tronc cérébral) sont tous deux affectés. La dégénérescence des neurones cholinergiques au sein du noyau basal de Meynert et du noyau pédonculopontin atteint environ 50% et semble jouer un rôle important dans les troubles de l'équilibre et de la marche présents chez certains patients parkinsoniens (Halliday et al., 1990; Jellinger, 1991) et observés dans un modèle primate non-humain de la MP (Karachi et al., 2010). Au niveau cortical, des réductions de l'activité de la choline acétyltransférase (enzyme de synthèse de l'ACh) et du taux d'ACh sont corrélées avec le déclin des fonctions cognitives (Dubois et al., 1987). La perte d'innervation cholinergique du cortex frontal est impliquée dans les déficits des processus attentionnels observés chez les patients parkinsoniens (Stam et al., 1993) et semble altérer la plasticité corticale lors d'un apprentissage moteur (Conner et al., 2003). Les dysfonctionnements du système nerveux autonome, les troubles du sommeil et de l'olfaction (hyposmie ou anosmie) trouvés dans la MP peuvent également être expliqués par des perturbations de la transmission cholinergique (Perez-Lloret and Barrantes, 2016).

Alors que les neurones cholinergiques issus des voies cholinergiques du cerveau antéro-basal et du tronc cérébral dégèrent dans la MP, les ChIs striataux semblent épargnés dans la pathologie (Barbeau, 1962; Duvoisin, 1967; Hornykiewicz and Kish, 1987). Des études chez l'animal montrent que la déplétion dopaminergique s'accompagne d'une augmentation de l'activité et/ou de l'excitabilité des ChIs (Pisani et al., 2007; Bonsi et al., 2011; Deffains and Bergman, 2015). Ce déséquilibre de l'interaction entre les systèmes dopaminergique et cholinergique striataux, qui sera particulièrement étudié dans ce manuscrit, participerait à l'apparition des symptômes moteurs dans la MP (Pisani et al., 2007; Aosaki et al., 2010; Lester et al., 2010).

5. Approches thérapeutiques

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif pour la MP. Les traitements disponibles à ce jour appartiennent à quatre catégories : (1) les traitements symptomatiques pharmacologiques, (2) les traitements symptomatiques neurochirurgicaux, (3) les traitements neuroprotecteurs et (4) les traitements régénératifs (Smith et al., 2012b).

Nous aborderons les traitements symptomatiques pharmacologiques et neurochirurgicaux qui représentent, pour l'heure, la seule stratégie thérapeutique efficace ciblant principalement les symptômes moteurs de maladie.

5.1. Traitements pharmacologiques

5.1.1. Traitements dopaminergiques

L-DOPA

Les traitements pharmacologiques de la MP ont connu une avancée majeure dans les années 1960 avec l'introduction de la L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine ou Levodopa). Le traitement par la L-DOPA montre des effets bénéfiques considérables sur les symptômes moteurs de la MP (Carlsson et al., 1957; Birkmayer and Hornykiewicz, 1961; Barbeau, 1962; Cotzias et al., 1969).

La L-DOPA est le précurseur de la DA mais, contrairement à cette dernière, elle est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique. Dans le système nerveux central, elle est métabolisée, par la DOPA décarboxylase, en DA par les fibres dopaminergiques non détruites et les neurones sérotoninergiques (Schwartz and Huston, 1996; Carta et al., 2007; Navailles et al., 2010). Cependant, lorsqu'elle est administrée seule, plus de 95% de la L-DOPA est dégradée en périphérie dans le foie et la paroi intestinale, où la DOPA décarboxylase est aussi présente. Cette dégradation périphérique a deux conséquences négatives : (1) elle réduit la disponibilité de la L-DOPA dans le système nerveux central et (2) elle est responsable d'effets secondaires tels que les nausées, les vomissements ou encore de l'hypotension artérielle (à faibles doses) ou de l'hypertension (à fortes doses). Ainsi, le traitement par la L-DOPA (Modopar®, Sinemet®, Stalavo®, etc.) est associé à des inhibiteurs de la DOPA décarboxylase (bensérazide, carbidopa), qui ne franchissent pas la barrière hémato-encéphalique et permettent de réduire les doses efficaces de L-DOPA et d'atténuer les effets secondaires.

À ce jour, la L-DOPA qui permet de compenser la carence en DA demeure le traitement de référence de la MP. Néanmoins, si la L-DOPA permet une amélioration considérable des symptômes moteurs de la MP lors des premières années (période dite de « lune de miel »), elle n'arrête pas la progression de la maladie. La progression de la dégénérescence des neurones dopaminergiques au

cours de la MP conduit à une augmentation du nombre des prises et des doses de L-DOPA pour maintenir son efficacité. À plus long terme, ceci donne lieu à l'apparition d'effets indésirables caractérisés par des fluctuations motrices – l'état du patient alterne entre « phases OFF » pendant lesquelles il présente les symptômes moteurs de la maladie et « phases ON » durant lesquelles les symptômes moteurs sont améliorés par le traitement – et des mouvements anormaux involontaires appelées dyskinésies (Rascol et al., 2000; Brochie et al., 2005; Bastide et al., 2015) (Figure 5). En effet, après environ 5 ans de traitement par la L-DOPA, 60% des patients présentent un déclin de la réponse thérapeutique à la L-DOPA (période dite de « fluctuations motrices »), allant jusqu'à 90% des patients après 10 années de traitement par la L-DOPA (Olanow et al., 2008).

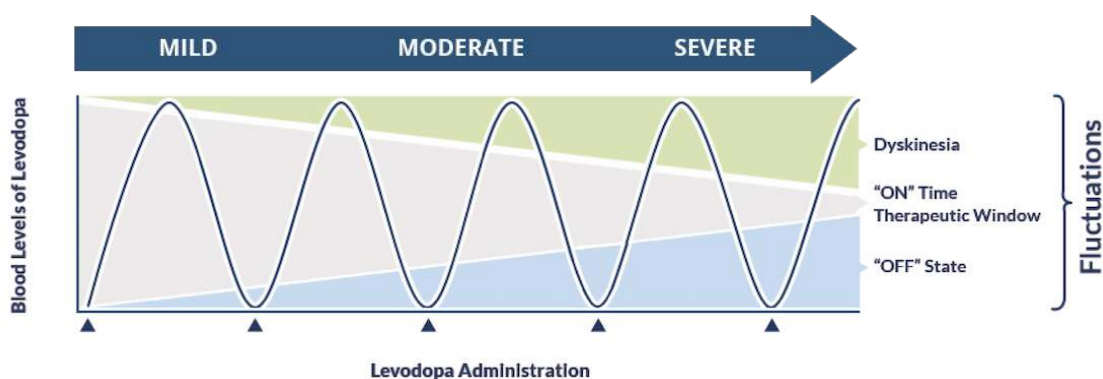


Figure 5 : Evolution du traitement par la L-DOPA au fil des années

Le traitement par la L-DOPA donne lieu à l'apparition d'effets indésirables qui s'aggravent au cours des années. **Mild** : pas ou peu d'effets indésirables (période de « lune de miel »). **Moderate** : effets indésirables modérés (période de « fluctuations motrices » où le patient alterne entre « phases OFF » et « phases ON »). **Severe** : effets indésirables sévères avec apparition des dyskinésies allant jusqu'à une perte totale de l'efficacité thérapeutique de la L-DOPA. La fenêtre thérapeutique et les « phases ON » (gris) diminuent alors que les « phases OFF » (bleu) et les dyskinésies (vert) augmentent au cours des années de traitement par la L-DOPA. Illustration modifiée (Neuroderm).

Ces complications motrices seraient essentiellement dues à une stimulation non physiologique des récepteurs dopaminergiques. En effet, lorsque la perte des neurones dopaminergiques devient trop importante, la L-DOPA ne peut plus abondamment augmenter le stockage vésiculaire de la DA au sein des terminaisons de ces neurones. Compte tenu de la demi-vie relativement brève de la L-DOPA (de 60 à 90 min), la concentration en DA devient fluctuante et la stimulation des récepteurs

dopaminergiques post-synaptiques s'effectue de manière pulsatile, contrastant ainsi avec la libération non pulsatile ou continue de DA en condition physiologique (Olanow et al., 2006; Rezak, 2007). Afin de retarder l'apparition des complications motrices, d'autres stratégies thérapeutiques ont été mises en place afin de maintenir une imprégnation permanente en DA, notamment grâce à des agonistes dopaminergiques ayant des demi-vies plus longues ou à des inhibiteurs enzymatiques du catabolisme de la DA (Rascol et al., 2015).

Inhibiteurs du catabolisme de la dopamine

Cette stratégie thérapeutique vise à potentialiser le traitement par la L-DOPA en inhibant les enzymes responsables de la dégradation de la DA. Les inhibiteurs de la monoamine oxydase B (MAOBIs) et de la catéchol-O-méthyltransférase (COMTIs) sont généralement utilisés au cours des stades avancés de la MP chez les patients présentant des complications motrices.

Les MAOBIs, tel que la sélégiline (Eldepryl®) et la rasagiline (Azilect®) agissent en inhibant sélectivement la MAOB, réduisant ainsi la dégradation de la DA. Ils permettent ainsi de prolonger la durée d'action de la DA au niveau synaptique. La sélégiline possède une efficacité symptomatique relativement modérée, alors que la rasagiline, significativement plus puissante, présente des effets bénéfiques aussi bien lorsqu'elle est utilisée seule ou en association avec la L-DOPA (Rezak, 2007).

Les COMTIs, tels que la tolcapone (Tasmar®) et l'entacapone (Comtan®) agissent en bloquant la dégradation de la DA et de la L-DOPA. En effet, malgré la présence d'inhibiteur de la DOPA décarboxylase (bensérazide, carbidopa), la L-DOPA peut être métabolisée en un métabolite inactif, le 3-O-méthyldopa (3-OMD) par la COMT présente au niveau périphérique, dans le foie et la paroi intestinale. L'utilisation de COMTIs permet, par conséquent, d'inhiber le métabolisme périphérique de la L-DOPA, prolongeant ainsi sa demi-vie et augmentant de ce fait sa disponibilité au niveau du système nerveux central. La tolcapone et l'entacapone induisent une réduction de 40% des fluctuations motrices en « phases OFF » et une augmentation de la durée, de 30 à 60 minutes, des « phases ON » durant lesquelles le traitement par la L-DOPA est bénéfique (Rezak, 2007; Jankovic and Aguilar, 2008).

Agonistes dopaminergiques

Les agonistes des récepteurs dopaminergiques représentent un traitement alternatif. Bien qu'ils soient moins efficaces, ils ont l'avantage d'avoir une demi-vie plus longue (entre 5 et 60 heures) que celle de la L-DOPA, permettant ainsi une activation stable et continue des récepteurs dopaminergiques et évitant les fluctuations motrices.

Dans les années 1980, les agonistes dopaminergiques dits de « première génération », dérivés de l'ergot de seigle, sont utilisés en complément de la L-Dopa dans les stades avancés de la maladie. Les agonistes dérivés de l'ergot de seigle possèdent des affinités pour les récepteurs noradrénergiques et sérotoninergiques, responsables de nombreux effets indésirables (nausées, vomissements, hypotension, confusion, hallucinations et insomnie). Au début des années 2000, ils sont remplacés par des agonistes de « seconde génération », composés synthétiques plus récents et plus sélectifs. Actuellement, tous les agonistes dopaminergiques utilisés en clinique, tels que le pramipexole (Mirapex®), le ropinirole (Requip®), la rotigotine (Neurpro®), agissent préférentiellement sur les récepteurs de type D2 et D2-like (sous-types D2, D3 et D4), avec des affinités modérées et variables pour les autres sous-types de récepteurs dopaminergiques (Lang and Obeso, 2004; Smith et al., 2012b).

Des études ont montré que la prise d'agonistes dopaminergiques en première intention retarde l'apparition de complications motrices comme les dyskinésies, par rapport aux patients ayant commencé leur traitement par la prise de L-DOPA (Rascol et al., 2000; 2011). Ces observations ont conduit à l'utilisation des agonistes dopaminergiques en monothérapie, puis à les compléter avec de la L-Dopa lorsque la maladie progresse et que les symptômes ne peuvent plus être réduits uniquement par les agonistes dopaminergiques.

5.1.2. Traitements non-dopaminergiques

Anticholinergiques

Les anticholinergiques ont été les premières molécules utilisées dans le traitement de la MP. Ainsi, dès 1879, Jean-Martin Charcot propose l'utilisation de l'atropine en faisant l'hypothèse que la MP pourrait correspondre à l'expression d'une hypercholinergie (en raison de la salivation excessive

observée chez de nombreux patients). Il observe un effet bénéfique sur la rigidité et sur les tremblements {Charcot:1879tl. Dans les années 1950, les dérivés synthétiques de l'atropine, mieux tolérés par les patients, ont constitué l'essentiel du traitement pharmacologique de la MP avant l'avènement de la L-DOPA (Fahn, 1989). Leur action doit réduire l'hyperactivité cholinergique du striatum provenant de la perte du contrôle inhibiteur de la DA nigrostriatale.

À l'heure actuelle, l'utilisation des anticholinergiques est recommandée dans le cas de tremblements persistants (Ferreira et al., 2013). Cependant, ils n'ont aucun effet bénéfique sur l'akinésie. De plus, leur action centrale non-spécifique induit des effets secondaires périphériques (nausées, hypotension, tachycardie, mydriase, troubles vésico-sphinctériens) et centraux (troubles mnésiques, confusion, hallucinations). Pour toutes ces raisons, les anticholinergiques comme le trihexyphénidyl (Artane®), la benztropine (Cogentin®) et la procyclidine (Kemadrin®) sont désormais plus rarement utilisés et, quand ils le sont, ils sont généralement prescrits à de faibles doses et chez les sujets jeunes (Rezak, 2007).

Antagonistes glutamatergiques

L'hyperactivité glutamatergique observée au niveau du STN au cours de la MP (Bergman et al., 1990) a conduit à penser au potentiel thérapeutique de composés capables de réduire l'activité de ce système. De nombreuses données issues des modèles animaux de la MP laissaient présager que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs ionotropiques du glutamate ; antagonistes de l' α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate (AMPA) et du N-méthyl-D-aspartate (NMDA) pourrait constituer une stratégie thérapeutique intéressante (Carlsson and Carlsson, 1989; Greenamyre and O'Brien, 1991; Marino et al., 2003; Majláth and Vécsei, 2014). Chez le rongeur et le primate non-humain, ces antagonistes glutamatergiques agissent en synergie avec la L-DOPA pour produire des effets antiparkinsoniens à de faibles doses (Greenamyre et al., 1994; Jonkers et al., 2000) et permettent de réduire significativement les dyskinésies induites par la L-DOPA (Blanchet et al., 1998b). Une étude clinique menée chez l'Homme a confirmé l'effet bénéfique de trois antagonistes des récepteurs NMDA (dextrophan, dextrométhorphan et amantadine) sur les dyskinésies induites par la L-DOPA chez des patients à un stade avancé de la pathologie (Verhagen Metman et al., 1998).

L'amantadine (Mantadix®) s'est avérée très active dans le traitement de la MP et plus particulièrement dans le traitement des dyskinésies induites par la L-DOPA (Vijayakumar and Jankovic, 2016). Certaines études montrent néanmoins des données plus mesurées. En effet, plus de la moitié des patients ne serait pas sensible au traitement par les antagonistes glutamatergiques et ne présente aucune amélioration motrice. De plus, du fait de leur manque de spécificité, les antagonistes glutamatergiques à large spectre induisent de nombreux effets secondaires (dépression, insomnies ou sédation, irritabilité, anorexie, nausées, hallucinations) (Rabey et al., 1992; Le and Lipton, 2001; Rezak, 2007).

D'autres études suggèrent que les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs) pourraient également représenter une alternative intéressante pour réduire les symptômes moteurs de la pathologie (Marino et al., 2003; Ossowska et al., 2007; Lopez et al., 2012; Gubellini et al., 2014; Amalric, 2015).

Agonistes sérotoninergiques

L'utilisation d'agonistes sérotoninergiques résulte de deux observations : (1) les taux de sérotonine sont considérablement réduits chez les patients parkinsoniens (Scatton et al., 1986) et (2) des études chez le rat montrent que la sérotonine exerce un contrôle inhibiteur ou facilitateur sur la libération de DA au niveau striatal selon les récepteurs sérotoninergiques impliqués (Nicholson and Brotchie, 2002; Scholtissen et al., 2006; Di Matteo et al., 2008)

Plusieurs composés agissant comme des agonistes des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A}, tels que le sarizotan et la buspirone, ont été testés chez les patients parkinsoniens et induisent des effets bénéfiques sur la durée des « phases ON » et les dyskinésies induites par la L-DOPA (Bonifati et al., 1994; Bara-Jimenez et al., 2005; Goetz et al., 2007).

Cependant, ces composés sont également des antagonistes des récepteurs dopaminergiques, ce qui rend les interprétations complexes. Ainsi, les études concernant le sarizotan montrent soit une absence d'effet sur les dyskinésies (Goetz et al., 2007), soit, à fortes doses, des effets négatifs sur les symptômes moteurs, potentiellement dus à leurs propriétés antagonistes dopaminergiques (Olanow et al., 2004).

5.2. Traitements neurochirurgicaux

5.2.1. Stimulation cérébrale à haute fréquence

Comme il l'a été évoqué précédemment, la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc entraîne une désorganisation du pattern d'activité des neurones glutamatergiques du STN. De manière intéressante, le cas d'un patient parkinsonien victime d'une hémorragie dans le STN provoquant une amélioration des trois symptômes majeurs de la maladie avec un arrêt du traitement par la L-DOPA (Sellal et al., 1992), a conduit à proposer le STN comme cible thérapeutique potentielle. De plus, des études expérimentales menées sur un modèle primate non-humain de la MP ont démontré que le STN a une activité anormalement élevée, et que la lésion ou la stimulation à haute fréquence de ce noyau améliorent nettement les troubles moteurs (Bergman et al., 1990; Benazzouz et al., 1993; 1996). Plus tard, des études chez le rat ont révélé que la stimulation à haute fréquence du STN augmente la libération de DA au niveau du striatum (Meissner et al., 2003), potentialise les effets de la L-DOPA dans le striatum (Oueslati et al., 2007) et atténue les déficits akinétiques (Darbakay et al., 2003).

Dans les années 1990, avec les progrès de la neuro-imagerie, de l'exploration électrophysiologique et de la chirurgie stéréotaxique, des études ont alors proposé d'appliquer la stimulation cérébrale à haute fréquence chez l'Homme, pour traiter les symptômes moteurs de la MP. Les premières stimulations cérébrales à haute fréquence du STN ont été réalisées chez des patients parkinsoniens par les équipes françaises du Pr. Alim-Louis Benabid et Pr. Pierre Pollak et ont produit des effets remarquables sur la symptomatologie motrice (Pollak et al., 1993; Limousin et al., 1995; 1998). Cette approche consiste en une implantation de deux électrodes bilatéralement dans le STN après son repérage par imagerie cérébrale dans un premier temps, puis par exploration électrophysiologique dans un second temps. Les deux électrodes sont connectées à un stimulateur réglable, placé dans la région sous-claviculaire, permettant d'ajuster les paramètres de stimulation pour optimiser l'effet thérapeutique ([Figure 6](#)).

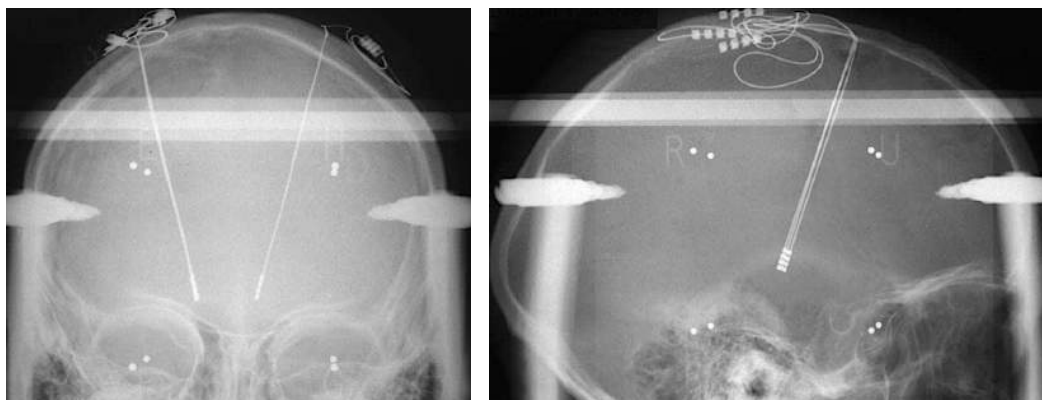


Figure 6 : Stimulation cérébrale à haute fréquence du noyau subthalamique

Radiographies, crâne de face (gauche) et de profil (droite) montrant l'implantation bilatérale d'électrodes de stimulation dans le noyau subthalamique (STN) chez un sujet parkinsonien. Les deux électrodes de stimulation implantées sont reliées à un stimulateur par un fil passant sous le scalp et derrière l'oreille. Le stimulateur, sorte de pacemaker, est lui-même placé dans la région sous-claviculaire. Clichés du service de neurochirurgie du Pr. Benabid, CHU Grenoble.

Appliquée seule ou avec le traitement par la L-DOPA, la stimulation à haute fréquence du STN améliore de 50 à 80% l'ensemble des symptômes moteurs, avec des effets bénéfiques considérables sur l'akinésie, la rigidité, les tremblements et l'absence de fluctuations motrices (Benabid et al., 2000; Thobois et al., 2002; Krack et al., 2003; Benabid et al., 2006; Faggiani and Benazzouz, 2016). De plus, la stimulation à haute fréquence du STN entraîne une réduction importante de la durée des « phases OFF », et les dyskinésies induites par la L-DOPA sont atténuées dans leur durée et leur sévérité du fait de la diminution des doses de L-DOPA prescrites de l'ordre de 35 à 60% (Limousin et al., 1995; Krack et al., 1997; 2003). La stimulation du STN permet de réduire considérablement voire, parfois, d'arrêter les traitements dopaminergiques prescrits, améliorant ainsi l'autonomie des patients (Moro et al., 1999; Molinuevo et al., 2000; Vingerhoets et al., 2002).

Des effets indésirables de la stimulation à haute fréquence du STN ont été décrits, notamment des troubles du contrôle des impulsions (prise de poids, hypersexualité, addiction aux traitements dopaminergiques) ou des troubles émotionnels (dépression, apathie) (Romito et al., 2002; Krack et al., 2003; Walter and Vitek, 2004; Eusebio et al., 2013; Gesquière-Dando et al., 2015). Dans certains cas, ces effets secondaires peuvent être atténués en modifiant les paramètres de stimulation.

6. Modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson

Les modèles expérimentaux de la MP chez l'animal constituent un outil indispensable à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués, et pour la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques. Actuellement trois types de modèles expérimentaux de la MP sont utilisés : (1) les modèles génétiques, (2) les modèles pharmacologiques et (3) les modèles neurotoxiques. Ces modèles sont capables de reproduire une ou plusieurs caractéristiques de la MP, mais aucun d'entre eux ne présente l'ensemble des caractéristiques phénotypiques et biochimiques de la pathologie (Gubellini and Kachidian, 2015). Le modèle idéal devrait en effet présenter toutes les caractéristiques anatomopathologiques et les symptômes moteurs observés chez l'Homme : la neurodégénérescence progressive et irréversible de la voie dopaminergique nigrostriatale, l'atteinte neuronale des systèmes non-dopaminergiques, la triade motrice parkinsonienne, la sensibilité à la L-DOPA et la présence de corps de Lewy (Dawson et al., 2002; Le et al., 2014; Gubellini and Kachidian, 2015).

La mise en évidence de gènes impliqués dans les formes familiales de la MP a conduit à l'utilisation de modèles transgéniques chez la souris obtenus par mutation des gènes codant, par exemple, pour l' α -synucléine, la parkine, la PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) et la LRRK2 (Leucine Rich Repeat Kinase 2). Ces modèles génétiques reproduisent certains aspects de la pathologie, comme l'accumulation d' α -synucléine ou encore l'apparition de corps de Lewy, mais ne présentent pas toujours la dégénérescence du système dopaminergique et les phénotypes moteurs associés (Fernagut and Chesselet, 2004; Fleming et al., 2005; Chesselet et al., 2008). Ils sont ainsi utilisés pour étudier les mécanismes étiologiques et les facteurs génétiques impliqués dans la MP (Chesselet and Richter, 2011; Blesa et al., 2012).

Dans ce chapitre nous aborderons les modèles expérimentaux pharmacologiques et neurotoxiques de la MP, en développant plus particulièrement le modèle halopéridol et le modèle de lésion à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) dont l'utilisation est à la base d'une grande partie des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse.

6.1. Modèles pharmacologiques

Les modèles pharmacologiques sont des modèles utilisant des composés pharmacologiques à action transitoire, tels que la réserpine ou l'halopéridol. Ces modèles ont été développés en se basant sur l'hypothèse que la déplétion en DA est la perturbation biochimique centrale de la physiopathologie de la MP. Les modèles pharmacologiques induisent des phénotypes moteurs sévères, transitoires, et sont utilisés dans la recherche de nouvelles thérapies pour traiter les symptômes moteurs de la MP (Duty and Jenner, 2011).

6.1.1. Modèle réserpine

Le modèle réserpine est un des plus anciens modèles expérimentaux de la MP. Dans les années 1950, Carlsson et coll. observent que l'administration systémique de réserpine entraîne une déplétion cérébrale en catécholamines, accompagnée d'un état catatonique (sédation profonde) chez la souris (Carlsson et al., 1957). La réserpine, dont le mécanisme d'action consiste à vider les stocks vésiculaires de DA présents au niveau des terminaisons synaptiques, induit ainsi une déplétion en DA pouvant atteindre jusqu'à 95% dans les deux heures qui suivent l'injection (Heeringa and Abercrombie, 1995; Duty and Jenner, 2011). De ce fait, la réserpine provoque une akinésie et une rigidité sévère des membres postérieurs chez le rongeur similaires à celles observées dans la MP.

La limite principale de ce modèle vient du fait que la réserpine a un effet transitoire et que le déficit observé n'est pas dû à une perte des neurones dopaminergiques mais à une inactivation fonctionnelle réversible de l'ensemble de la transmission catécholaminergique, non seulement dopaminergique, mais aussi sérotoninergique et noradrénergique (Bezard and Przedborski, 2011).

6.1.2. Modèle halopéridol

L'halopéridol est un neuroleptique antagoniste de récepteurs dopaminergiques D2, et dans une moindre mesure des récepteurs D1. Il produit des effets similaires à la réserpine. Le blocage de la transmission dopaminergique striatale se traduit, du point de vue fonctionnel, par une rigidité musculaire et une catalepsie dans l'heure suivant l'injection d'halopéridol (Sanberg, 1980; Duty and Jenner, 2011). Chez le rongeur, la catalepsie se définit comme un ralentissement moteur et une incapacité à corriger une posture anormale et inconfortable, ce qui s'apparente aux symptômes

d'akinésie et de bradykinésie retrouvés dans la MP. L'administration systémique, ou dans le striatum, d'halopéridol provoque également une diminution de l'activité locomotrice (Hillegaart and Ahlenius, 1987) et une baisse des performances motrices dans des tâches opérantes (Amalric and Koob, 1989).

Comme la réserpine, l'halopéridol est encore largement utilisé de nos jours pour tester les effets antiparkinsoniens de certains composés pharmacologiques. Les limites de ce modèle sont, là encore, un effet transitoire du blocage de la transmission dopaminergique, mais en aval cette fois, par inactivation préférentielle des récepteurs D2. Cependant, une récente étude montre que le modèle halopéridol n'en est pas moins un modèle robuste. En effet, l'administration systémique d'halopéridol entraîne, au niveau du striatum, non seulement une diminution de DA mais aussi de noradrénaline et sérotonine, deux autres systèmes atteints dans la MP (Kulkarni et al., 2009).

Pour résumer, la limite majeure des modèles pharmacologiques est leur caractère transitoire qui ne reflète pas l'évolution progressive du processus dégénératif dopaminergique caractéristique de la MP. À l'heure actuelle, les modèles neurotoxiques basés sur la destruction des neurones dopaminergiques nigraux sont le plus couramment utilisés.

6.2. Modèles neurotoxiques

Les modèles neurotoxiques utilisant des pesticides ou des herbicides permettent l'induction de la MP par administration systémique d'agents toxiques tels que le paraquat ou la roténone. Dans ces modèles, on peut observer l'accumulation d' α -synucléine et l'apparition de corps de Lewy (Bové et al., 2005; Gubellini and Kachidian, 2015). Le paraquat est un herbicide dont la composition ressemble à celle du MPP⁺ (Cf. Modèle MPTP). La roténone est un herbicide et un insecticide qui induit l'accumulation d' α -synucléine, l'apparition de corps de Lewy ainsi que l'altération des systèmes dopaminergique, sérotoninergique et cholinergique (Beal, 2001; Höglinger et al., 2003). Ces modèles sont généralement utilisés dans le but de tester l'efficacité d'agents potentiellement neuroprotecteurs (Bové et al., 2005; Duty and Jenner, 2011; Blesa et al., 2012).

Les modèles neurotoxiques d'intoxication au 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) chez le primate non-humain et de lésion à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) chez le rongeur sont plus particulièrement détaillés dans les chapitres ci-après.

6.2.1. Modèle MPTP

Le MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) est un composé très lipophile capable de traverser la barrière hémato-encéphalique. Une fois passée cette barrière, le MPTP, non toxique par lui-même, est métabolisé par la MAOB en MPDP⁺ (1-méthyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium) avant son oxydation spontanée en son métabolite actif, le MPP⁺ (1-méthyl-4-phenylpyridinium) au niveau des cellules gliales. Le MPP⁺ est ensuite libéré dans l'espace extracellulaire et importé sélectivement dans les neurones dopaminergiques par le transporteur de la DA situé à leur surface (Dawson et al., 2002; Dauer and Przedborski, 2003) (**Figure 7**). Le MPP⁺ inhibe alors le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraînant un stress oxydatif qui conduit à la mort neuronale. Ce mécanisme d'action est l'un des mécanismes supposé responsable de la mort des neurones dopaminergiques dans la MP (Parker et al., 2008; Michel et al., 2016).

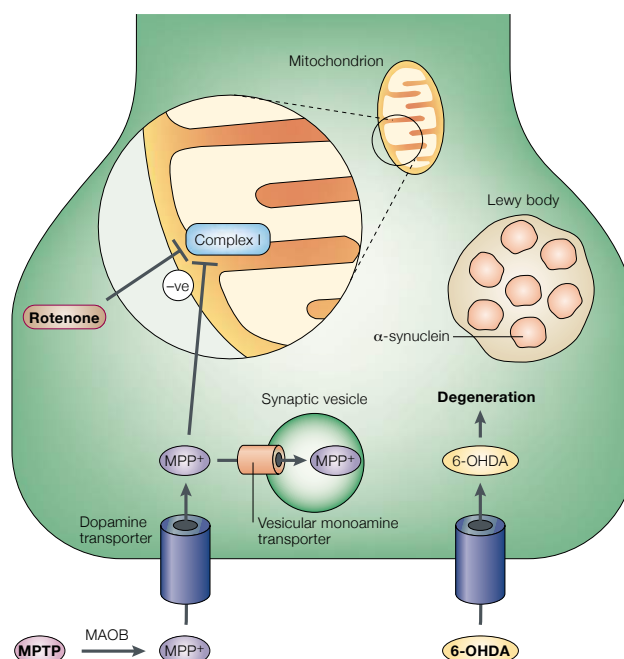


Figure 7 : Mode d'action des neurotoxines MPTP et 6-OHDA

Le MPTP franchit la barrière hémato-encéphalique. Une fois dans le cerveau, il est transformé en MPP⁺ et importé dans les neurones dopaminergiques via le transporteur de la dopamine (DA). Son accumulation au niveau de la mitochondrie inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale induisant un stress oxydatif responsable de la mort des neurones dopaminergiques. La 6-OHDA ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique et doit être directement injectée dans la structure cérébrale d'intérêt. Elle est aussi transportée via le transporteur de la DA dans les neurones dopaminergiques où elle conduit à un stress oxydatif et à une dégénérescence des neurones. D'après Beal, 2001.

La sensibilité au MPTP varie selon les espèces. Il est généralement administré par voie systémique (sous-cutanée, intrapéritonéale, intramusculaire ou intraveineuse) chez les primates non-humains (singes macaques, marmosets) et chez la souris. Le rat est relativement résistant à la toxicité du MPTP car il possède de grandes quantités de MAOB au niveau des vaisseaux périphériques, par conséquent, le MPP⁺ formé est dégradé avant de passer la barrière encéphalique (Boyce et al., 1984). Pour cette raison, le MPTP est injecté directement dans les structures cérébrales chez le rat. Le modèle d'intoxication au MPTP chez le primate non-humain constitue le modèle de référence pour évaluer le potentiel thérapeutique de nouveaux composés avant les essais cliniques chez l'Homme.

Chez le primate non-humain, l'administration systémique de MPTP permet de reproduire la plupart des signes cliniques de la MP, incluant la rigidité musculaire, l'akinésie, la bradykinésie, l'instabilité posturale (Smeyne and Jackson-Lewis, 2005) et parfois des tremblements selon l'espèce considérée (Bergman et al., 1998). Ce modèle présente une atteinte des neurones dopaminergiques comparable à celle observée chez les patients parkinsoniens et notamment une dégénérescence préférentielle des terminaisons nerveuses dopaminergiques localisées dans le putamen, comparativement au noyau caudé (Moratalla et al., 1992; Forno et al., 1993). Cependant, il ne permet pas de mettre en évidence la présence de corps de Lewy (Porras et al., 2012). Certaines études rapportent que l'intoxication au MPTP induit la formation de corps de Lewy uniquement chez la souris (Meredith et al., 2002; Fornai et al., 2005).

La limite majeure de ce modèle réside dans le fait qu'il ne reproduit pas l'évolution temporelle très lente de la MP observée chez l'Homme. L'administration chronique de faibles doses de MPTP permet cependant d'obtenir une perte neuronale plus progressive et donc plus proche de l'évolution de la maladie chez l'Homme (Dawson et al., 2002).

6.2.2. Modèle 6-OHDA

La 6-OHDA (6-hydroxydopamine) a été la première neurotoxine utilisée pour produire un modèle expérimental de la MP chez le rongeur (Ungerstedt, 1968). Elle correspond à une forme hydroxylée de la DA et est utilisée pour ses propriétés neurotoxiques spécifiques des neurones catécholaminergiques. Contrairement au MPTP, la 6-OHDA ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique et nécessite donc d'être injectée par voie intracérébrale. Elle est incorporée dans les

terminaisons des neurones catécholaminergiques (neurones dopaminergiques et noradrénergiques) par les transporteurs des catécholamines, dont le transporteur de la DA. Elle y est ensuite métabolisée. L'auto-oxydation de la 6-OHDA induit la production de radicaux libres, responsables d'un stress oxydatif à l'origine de nombreuses altérations structurales et fonctionnelles des protéines et des lipides cellulaires, et des altérations du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Blum et al., 2001; Duty and Jenner, 2011) (**Figure 7**).

Afin d'obtenir une dégénérescence spécifique des neurones dopaminergiques et de limiter l'impact sur les neurones noradrénergiques, un inhibiteur de la recapture de la noradrénaline, la désipramine, peut-être co-administrée avec la 6-OHDA. Lorsque l'injection de 6-OHDA est réalisée dans le striatum ou la SNc, la désipramine n'est pas indispensable étant donné la faible proportion de terminaisons noradrénergiques retrouvés dans ces structures (Blum et al., 2001; Bezard et al., 2013).

L'ampleur des altérations du système dopaminergique dépend du type de lésion réalisée. En effet, la 6-OHDA peut-être injectée, à différentes doses, dans différentes structures le long de l'axe nigrostriatal : au niveau de la SNc, du faisceau médian du télencéphale (Medial Forebrain Bundle, MFB) ou du striatum (Heuer et al., 2012b). Nous détaillerons plus particulièrement les lésions à la 6-OHDA dans la SNc et le striatum qui ont été utilisées dans les travaux de cette thèse.

Injection de 6-OHDA au niveau de la SNc

L'administration de 6-OHDA dans la SNc induit une destruction rapide et massive des neurones dopaminergiques de l'ordre de 90% (Duty and Jenner, 2011), visible en immunohistochimie par une perte du marquage pour la tyrosine hydroxylase (TH), l'enzyme de synthèse de la DA (Tashiro et al., 1989) (**Figure 8A**). La perte neuronale commence dans les 12 heures suivant l'injection de 6-OHDA, est maximale autour de 6 jours après l'injection et reste stable jusqu'à 4 semaines après l'injection de 6-OHDA (Jeon et al., 1995). L'injection peut être effectuée de façon uni- ou bilatérale, cependant elle est le plus souvent unilatérale en raison de la forte mortalité observée lors de l'injection bilatérale.

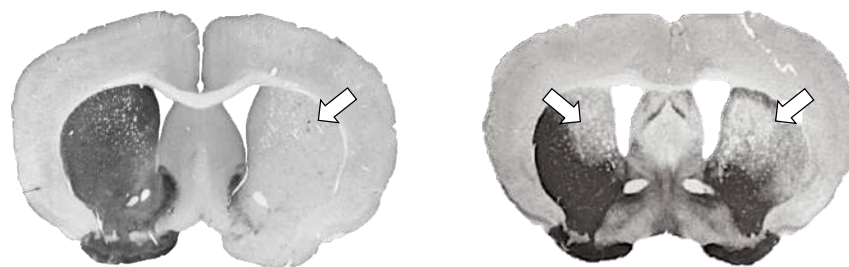


Figure 8 : Modèles de lésion 6-OHDA

Coupes frontales de cerveaux de souris illustrant la déplétion dopaminergique suite à une lésion unilatérale totale par injection de 6-OHDA au niveau de la substance noire *pars compacta* (SNc) (A) et une lésion bilatérale partielle par injection de 6-OHDA au niveau du striatum dorsal (B). La déplétion dopaminergique est visible grâce à la perte du marquage de la tyrosine hydroxylase (TH) (flèches). D'après Iancu et al., 2005; Neychev et al., 2008.

D'un point de vue comportemental, la lésion unilatérale totale entraîne chez le rongeur un comportement moteur asymétrique, caractérisé par une déviation de la tête et de la queue de l'animal vers le côté ipsilatéral au côté lésé, conséquence du déséquilibre de la transmission dopaminergique entre les deux hémisphères (Ungerstedt, 1968). Elle induit également une akinésie de la patte antérieure controlatérale à l'injection de 6-OHDA. Ces déficits peuvent être mesurés grâce à plusieurs tests moteurs permettant d'estimer la sévérité de la déplétion dopaminergique (Heuer et al., 2012b). Ils sont atténués par le traitement à la L-DOPA (Lundblad et al., 2002; Marin et al., 2007) et par la stimulation à haute fréquence du STN (Gubellini et al., 2006; 2009), traduisant ainsi la validité de ce modèle dans l'évaluation des symptômes moteurs de la MP.

La lésion induit également un comportement rotatoire, plus ou moins important selon l'étendue de la lésion, et qui peut-être exacerbé par l'injection de composés pharmacologiques agissant sur le système dopaminergique (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970). Ainsi, après lésion unilatérale chez le rongeur, l'injection d'amphétamine provoque des rotations ipsilatérales, alors que l'injection d'apomorphine induit des rotations controlatérales. En effet, l'amphétamine, en stimulant la libération de DA, agit au niveau pré-synaptique du côté intact alors que l'apomorphine, agoniste non sélectif des récepteurs dopaminergiques, agit au niveau post-synaptique du côté lésé, sur les récepteurs hypersensibilisés par la perte de DA (Duty and Jenner, 2011).

Ce modèle de lésion unilatérale totale est très largement utilisé. Cependant, une limite souvent négligée de ce modèle et plus généralement des modèles unilatéraux, est l'influence de l'hémisphère

intact sur l'hémisphère lésé et inversement. En effet, plusieurs études rapportent que des récupérations motrices ou compensations sont possibles, résultant du phénomène de « sprouting » de fibres provenant de l'hémisphère intact et venant innover l'hémisphère lésé (Finkelstein et al., 2000; Roedter et al., 2001; Deumens et al., 2002). De plus, le modèle de lésion unilatérale totale présente des différences majeures par rapport à la pathologie. Dans la MP, la dégénérescence unilatérale au départ se bilatéralise rapidement (Brooks and Pavese, 2011), et l'asymétrie due au caractère unilatéral de la lésion ne reproduit pas cette bilatéralisation. La lésion unilatérale n'induit pas la formation de corps de Lewy, et la perte rapide et extensive de neurones dopaminergiques ne mime pas la dégénérescence lente et progressive de la MP.

Injection de 6-OHDA au niveau du striatum

Lorsque l'injection de 6-OHDA est effectuée dans le striatum, la neurotoxine est captée par les transporteurs des catécholamines au niveau des terminaisons dopaminergiques nigrostriatales et induit une dégénérescence rétrograde. L'injection intrastriatale de 6-OHDA peut être uni- ou bilatérale et est généralement utilisée pour induire une lésion dopaminergique partielle.

L'injection unilatérale de 6-OHDA au niveau du striatum reste moins étudiée contrairement au modèle de lésion unilatérale dans la SNc (Kirik et al., 1998; Yuan et al., 2005; Heuer et al., 2012b). Selon la dose de 6-OHDA administrée, l'étendue de la lésion dopaminergique varie, permettant ainsi de reproduire différentes phases de la MP (Przedborski et al., 1995). Une étude montre que l'injection unilatérale de 6-OHDA dans le striatum entraîne une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la SNc, commençant dès la première semaine après l'injection et se poursuivant jusqu'à 8 à 16 semaines, ce qui en fait un modèle expérimental plus représentatif de la MP (Sauer and Oertel, 1994).

L'injection bilatérale de 6-OHDA au niveau du striatum permet de reproduire les phases précoces de la MP, notamment lorsque la perte d'innervation dopaminergique striatale est restreinte au striatum dorsal. Elle induit entre 35 à 65% de perte des terminaisons dopaminergiques dans le striatum dorsal et a peu d'effet sur l'activité motrice spontanée des animaux qui ne présentent pas de déficits posturaux (Chen et al., 2014; Bonito-Oliva et al., 2014a) (**Figure 8B**). Cependant, les déficits peuvent être révélés dans des tests opérants plus complexes, comme la tâche de temps de réaction qui

permet de détecter des déficits tels que l'akinésie (Amalric and Koob, 1987; Amalric et al., 1995), une tâche également utilisée chez l'Homme (Gauntlett-Gilbert and Brown, 1998).

En comparaison avec le modèle de lésion unilatérale, la lésion 6-OHDA bilatérale partielle présente plusieurs avantages. Tout d'abord, l'atteinte dopaminergique progressive et bilatéralisée est plus représentative de la dégénérescence observée dans la MP. Elle induit des déficits non-moteurs tels que les déficits cognitifs, motivationnels, l'anxiété, la dépression et l'anosmie (Tadaiesky et al., 2008; Chen et al., 2014; Drui et al., 2014; Bonito-Oliva et al., 2014a; Aidi-Knani et al., 2015), similaires aux symptômes retrouvés chez les patients parkinsoniens. De plus, la lésion bilatérale partielle minimise le « sprouting » inter-hémisphérique.

Malgré cela, la principale limite de ce modèle vient justement de son caractère partiel et transitoire. Les effets comportementaux induits par ce type de lésion sont visibles au maximum 8 semaines (Courtière et al., 2011). Une étude a montré que les taux de DA striataux, fortement diminués après injection de 6-OHDA dans le striatum, reviennent à des valeurs normales 8 semaines après la lésion (Yuan et al., 2005). Bien que cette étude concerne des lésions unilatérales, il est possible que des mécanismes de compensation similaires puissent également intervenir dans le cas de lésions bilatérales partielles.

6.3. Vers des modèles expérimentaux plus proches de la pathologie

L'enjeu des différents modèles expérimentaux décrits dans la littérature est de se rapprocher au plus près de toutes les caractéristiques anatomopathologiques observées chez l'Homme dans la MP. De nouveaux modèles de dégénérescence dopaminergique plus progressive, utilisant des virus adéno-associés (AAV) pour induire la pathologie, ont récemment été décrits. Par exemple, la surexpression de l' α -synucléine, par injection d'AAV contenant la forme sauvage (α -syn) (Decressac et al., 2012a; 2012b; Tozzi et al., 2016) ou mutée de l' α -synucléine humaine (A53T) (Engeln et al., 2013) permet une induction plus progressive de la MP chez les rongeurs. Dans ces modèles, l'accumulation de l' α -synucléine reproduit en partie les altérations cellulaires retrouvées dans la MP comme les dysfonctionnements synaptiques (Decressac et al., 2012b). Ils permettent de modéliser des mécanismes physiopathologiques progressivement mis en place, proches de ceux observés dans la pathologie chez l'Homme, contrairement à ce qui est classiquement obtenu avec les modèles

neurotoxiques (Decressac et al., 2012a). L' α -synucléine injectée commence à s'accumuler formant ensuite de larges inclusions intraneuronales puis des neurites dystrophiques. Trois semaines après l'injection d'AAV, une diminution progressive de l'expression de la TH dans le striatum, qui se poursuit pendant 8 à 16 semaines, est observée dans le striatum chez le rat. Cette dégénérescence dopaminergique lente et progressive est corrélée à une altération des performances motrices des animaux au cours du temps (Decressac et al., 2012b).

Ces nouveaux modèles présentent la gamme complète des mécanismes physiopathologiques observés dans la MP tels que l'inflammation, l'accumulation toxique d' α -synucléine et la progression temporelle de la dégénérescence des neurones dopaminergiques. Cependant, des études récentes ont révélé que les lésions de la SNc induites par la surexpression virale de la forme mutée de l' α -synucléine humaine (A53T) diffèrent selon la souche de rats utilisée. Les neurones de la SNc des rats mâles Sprague Dawley semblent plus sensibles à l'accumulation d' α -synucléine et/ou à l'infection par l'AAV que ceux des rats mâles Wistar Han (Engeln et al., 2013; 2016). Ainsi, ces modèles α -synucléine sont intéressants par leur aspect progressif car ils permettent de refléter les stades précoces, puis avancés de la MP.

Récemment, le groupe de Lydia Kerkerian-Le Goff a développé un nouveau modèle progressif basé sur l'inhibition pharmacologique aigue de transporteurs des acides aminés excitateurs (EAATs) par le L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC) (Assous et al., 2014). Une injection unilatérale de PDC dans la substance noire (entre la SNc et la SNr) chez le rat entraîne une perte progressive des neurones dopaminergiques de la SNc, sans affecter les neurones non-dopaminergiques de la SNr. En effet, la perte dopaminergique avoisine les 21% 4 jours après l'injection dans la SNc, puis progresse à 31, 41, 47 et 57%, 15, 30, 60 et 120 jours après l'injection et elle est corrélée à une progression des déficits moteurs (une altération de l'activité locomotrice et une asymétrie posturale) (Gubellini and Kachidian, 2015). De manière intéressante, la perte neuronale affecte également l'hémisphère controlatéral à la lésion atteignant 19% et 36% de perte 60 et 120 jours après l'injection de PDC, mimant une bilatéralisation de la dégénérescence neuronale similaire à celle observée chez l'Homme dans la MP. Dans ce modèle, les neurones dopaminergiques présentent quelques dépôts d' α -synucléine (Nafia et al., 2008). Cependant, ces dépôts sont restreints à la zone péri-injectée. Le

modèle PDC ne permet par conséquent pas de mimer le pattern d'accumulation d' α -synucléine et l'apparition de corps de Lewy dans les structures cérébrales affectées dans la MP (Gubellini and Kachidian, 2015).

En résumé, aucun des modèles animaux expérimentaux connus dans la littérature, récapitulés de façon non-exhaustive dans le [Tableau 3](#), ne reflète l'ensemble des caractéristiques anatomopathologiques, biochimiques et phénotypiques de la MP. Certains modèles seront alors plus appropriés que d'autres selon les problématiques des études.

Catégorie	Modèle	Mécanisme	Administration	Dégénérescence	Progression	Corps de Lewy	Symptômes moteurs
Pharmacologiques	Réserpine	Vider les stocks vésiculaires de dopamine	Injection systémique	-	-	-	+++
Neurotoxiques	Halopéridol	Antagoniste des D2	Injection systémique	-	-	-	+++
	6-OHDA	Inhiber le complexe I	Injection SNC, MFB	+++	-	-	+++
			Injection striatum	++	+	-	++
	MPTP	Inhiber le complexe I	Injection systémique	++	+	-	++/++++
	Paraquat®	Inhiber le complexe I		++	+	+	+
	Maneb®	Altérer la recapture de glutamate et dopamine	Injection systémique	+	+	-	+
	Roténone	Inhiber le complexe I	Injection systémique ou centrale	++	+	+	+
Génétiques	α -synucléine	Agrégats de corps de Lewy/toxicité	Mutation, surexpression par injection d'AAV	+	+	++	+
	Parkine	Perte ubiquitine ligase	Mutation	+/-	+/-	+/-	+/-
	PINK1	Dysfonctionnement mitochondrial	KO	+/-	+/-	+/-	+/-
	LRRK2	Perte d'activité enzymatique ubiquitine E3 ligase	Mutation, KO	+/-	+/-	+/-	+/-
Autres	PDC	Inhiber les EAATs	Injection SNC	++	+++	-	+

Tableau 3 : Modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson

Dans les modèles expérimentaux, une ou plusieurs caractéristiques similaires à celles observées chez l'Homme dans la maladie de Parkinson sont reproduites : la dégénérescence dopaminergique, son aspect progressif, la présence de corps de Lewy et les symptômes moteurs. Pour chaque caractéristique biochimique et phénotypique, une échelle de quatre niveaux est établie : (-) absence ; (+) présence faible ; (++) présence modérée ; (+++) présence importante. Adapté d'après (Gubellini and Kachidian, 2015).

Chapitre 2

Les Ganglions de la Base

Chapitre 2 : Les Ganglions de la Base

1. Description des ganglions de la base

Les ganglions de la base (GB), appelés également noyaux gris centraux, désignent un ensemble de noyaux sous-corticaux. Ils comprennent le striatum, le pallidum – subdivisé en globus pallidus externe (GPe) et interne (GPi) chez le primate, ou en globus pallidus (GP) et noyau entopédonculaire (EP) chez le rongeur – le noyau subthalamique (NST) et la substance noire subdivisée en substance noire *pars compacta* (SNc) et substance noire *pars reticulata* (SNr) (**Figure 9**). Les deux subdivisions du pallidum (GPe/GPi ou GP/EP) ainsi que les deux parties de la substance noire (SNc/SNr) sont fonctionnellement dissociées. En revanche, le GPi (ou EP) et la SNr sont généralement associés du fait de leur similarité fonctionnelle. En interagissant avec d'autres structures comme le thalamus et le cortex cérébral, les GB forment un vaste réseau cortico-striato-thalamo-cortical (Albin et al., 1989; DeLong, 1990). Ce circuit participe au système extrapyramidal du contrôle des mouvements mais est aussi impliqué dans les fonctions associatives et cognitives.

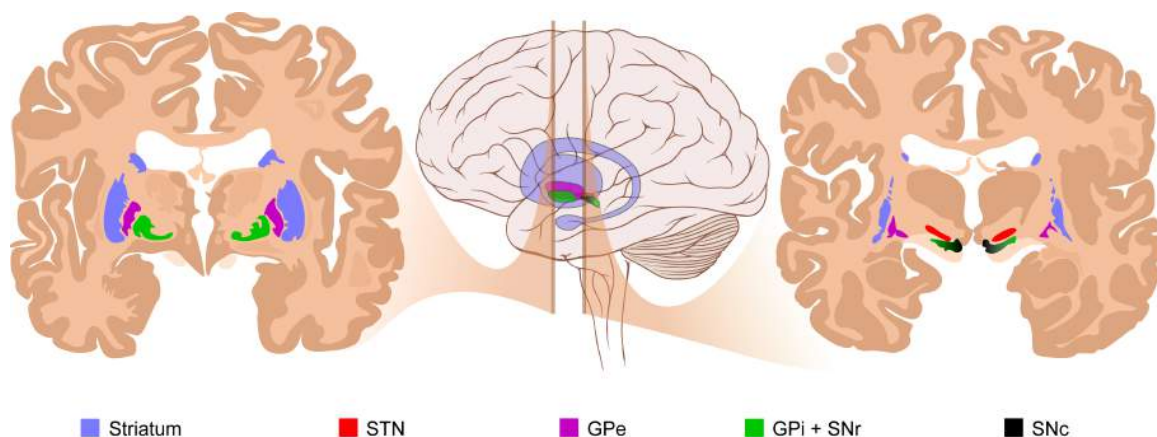


Figure 9 : Anatomie des ganglions de la base

Coupes coronales à deux niveaux d'antéro-postériorité illustrant les ganglions de la base (GB) chez l'Homme. Abréviations : GPe, globus pallidus externe ; GPi, globus pallidus interne ; STN, noyau subthalamique ; SNc, substance noire *pars compacta* ; SNr, substance noire *pars reticulata*. D'après les travaux de A. Gillies, M. Häggström et P. J. Lynch.

2. Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base

Des progrès considérables quant à la compréhension du fonctionnement physiologique des GB ont été réalisés au cours des 30 dernières années. À la fin des années 1980, deux principales hypothèses s'opposent quant aux modalités du traitement de l'information dans le réseau des GB. La première hypothèse suggère une ségrégation des informations issues des aires corticales en circuits parallèles tandis que la seconde hypothèse sous-tend plutôt l'idée d'une convergence et d'une intégration des informations corticales vers les différentes structures des GB.

L'hypothèse d'une ségrégation des informations corticales en circuits parallèles

L'innervation corticale massive des GB sous-tend l'idée que ces structures formeraient un réseau impliqué dans le contrôle d'informations fonctionnellement différentes (Alexander et al., 1986; Alexander and Crutcher, 1990; Alexander et al., 1990). Alexander et coll. ont proposé un modèle de ségrégation fonctionnelle de l'information corticale selon lequel il existe, chez le primate, cinq boucles ou circuits cortico-striato-thalamo-corticaux indépendants, fonctionnant en parallèles : un circuit moteur, oculomoteur, limbique et deux circuits associatifs comprenant le circuit préfrontal dorsolatéral et orbitofrontal latéral (Alexander et al., 1986). Dans ce modèle, un type d'information particulier serait ainsi transféré au travers des GB suivant une topographie fonctionnelle stricte.

Les données plus récentes proposent trois circuits fonctionnels : un circuit moteur, un circuit associatif et un circuit limbique (Obeso et al., 2008; Volkmann et al., 2010). Le circuit moteur assure la transmission de l'information sensorielle et motrice, le circuit associatif traite les informations cognitives tandis que le circuit limbique relaie les informations émotionnelles et motivationnelles. Le circuit moteur implique les aires corticales motrices primaires, prémotrices, motrices supplémentaires, oculomotrices et somesthésiques ainsi que les territoires sensorimoteurs des différentes structures des GB. Le circuit associatif reçoit des projections des aires préfrontales dorsolatérales et orbitofrontales latérales et projettent sur les territoires associatifs des GB. Enfin, les aires limbiques, paralimbiques, l'hippocampe et l'amygdale sont à la base du circuit limbique qui fait ensuite intervenir les territoires limbiques des différents noyaux des GB ([Figure 10](#)).

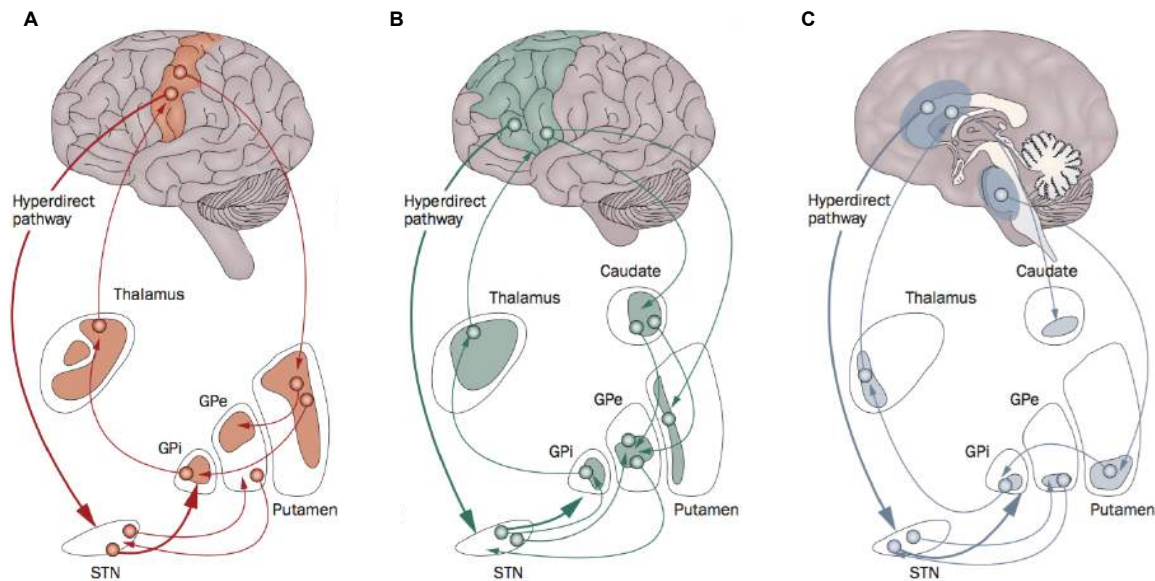


Figure 10 : Circuits fonctionnels des ganglions de la base

Organisation topographique, chez l'Homme, du circuit moteur en rouge (A), du circuit associatif en vert (B) et du circuit limbique en bleu (C). A. Le circuit moteur implique les aires corticales motrices primaires, prémotrices, motrices supplémentaires, oculomotrices, somesthésiques et les territoires sensorimoteurs des ganglions de la base (GB). B. Le circuit associatif implique les aires préfrontales dorsolatérales, orbitofrontales latérales et les territoires associatifs des GB. C. Le circuit limbique implique les aires limbiques, paralimbiques, l'hippocampe, l'amygdale et les territoires limbiques des GB. Abréviations : Caudate/putamen, striatum ; GPe, globus pallidus externe ; GPi, globus pallidus interne ; STN : noyau subthalamique. D'après Volkmann et al., 2010, adaptée de Obeso et al., 2008.

L'hypothèse d'une convergence et d'une intégration des informations corticales au sein des GB

Percheron et coll. ont proposé que les différentes informations fonctionnelles ne seraient pas ségréguées, mais plutôt intégrées au niveau des GB (Percheron et al., 1984; Yelnik et al., 1984; François et al., 1987; Yelnik et al., 1987). Ce modèle de convergence des informations corticales vers les différentes structures des GB, repose sur plusieurs arguments anatomiques. D'une part, on observe une réduction majeure (1) du nombre de neurones assurant la transmission des influx corticaux, entre le cortex cérébral et le striatum, et entre le striatum et le GPi-SNr (Schröder et al., 1975) ; (2) du volume des structures à chaque relais dans les boucles fonctionnelles. Le cortex est plus volumineux que le striatum qui est lui-même 20 fois plus volumineux que le GP et contient 100 fois plus de neurones (Yelnik, 2002). D'autre part, les arborisations dendritiques des neurones du GP et de la SNr ont un volume et une disposition tels que les projections issues des différentes régions du striatum peuvent converger sur les mêmes neurones pallidaux ou nigraux (Percheron et al., 1984;

Yelnik et al., 1984; Percheron and Filion, 1991). Ainsi, les informations corticales passant dans les circuits cortico-sous-corticaux convergeraient au niveau des GB où elles seraient intégrées de telle sorte que l'information finale, projetée en retour au niveau cortical, serait composée de plusieurs modalités fonctionnelles.

Dans leur revue, Parent et Hazrati, sur la base de leur étude des afférences corticales vers le striatum, postulent également qu'une forte convergence d'informations a lieu au sein des GB (Parent and Hazrati, 1995a; 1995b). La ségrégation fonctionnelle observée au niveau des afférences corticales serait préservée au sein des GB qui comprendrait trois territoires fonctionnels : un territoire sensorimoteur, un territoire associatif et un territoire limbique. Cette subdivision en trois territoires fonctionnels a été mise en évidence dans le striatum, le GP et le NST chez l'animal (François et al., 2004; Grabli et al., 2004). Le territoire sensorimoteur est le plus dorsal, le territoire associatif est médian et le territoire limbique le plus ventral. Chez l'homme, des données anatomiques sont en faveur de cette organisation (Karachi et al., 2002). Toutefois, ils mettent en évidence que les zones striatales des projections corticales ne sont pas parfaitement séparées et qu'elles présentent des zones de recouvrement au niveau des frontières des différents territoires striataux. Ce modèle est basé sur une vision moins paralléliste que le modèle de ségrégation puisqu'il tient compte à la fois (1) de l'intégration des informations corticales vers les structures des GB et (2) de l'existence de recouvrement, au sein des noyaux, entre les différents territoires. Il n'implique pas une ségrégation totale des informations au sein des circuits cortico-sous-corticales et souligne la présence, au sein des GB, du traitement des informations motrices, cognitives, émotionnelles et motivationnelles.

2.1. Fonctionnement physiologique

Grâce aux nombreuses données anatomiques et fonctionnelles collectées sur les GB, un modèle d'organisation générale du **circuit moteur** impliquant le cortex, les GB et le thalamus a été proposé (Albin et al., 1989) puis complété (Alexander and Crutcher, 1990) ([Figure 11](#)).

Le striatum constitue la structure d'entrée principale du circuit des GB. Il reçoit des afférences glutamatergiques provenant du cortex cérébral et du thalamus, et des afférences dopaminergiques issues de la SNc. Le striatum intègre ces informations et contrôle, au travers de deux voies, directe et indirecte, l'activité de l'EP et de la SNr qui constituent les structures de sortie, chez le rongeur.

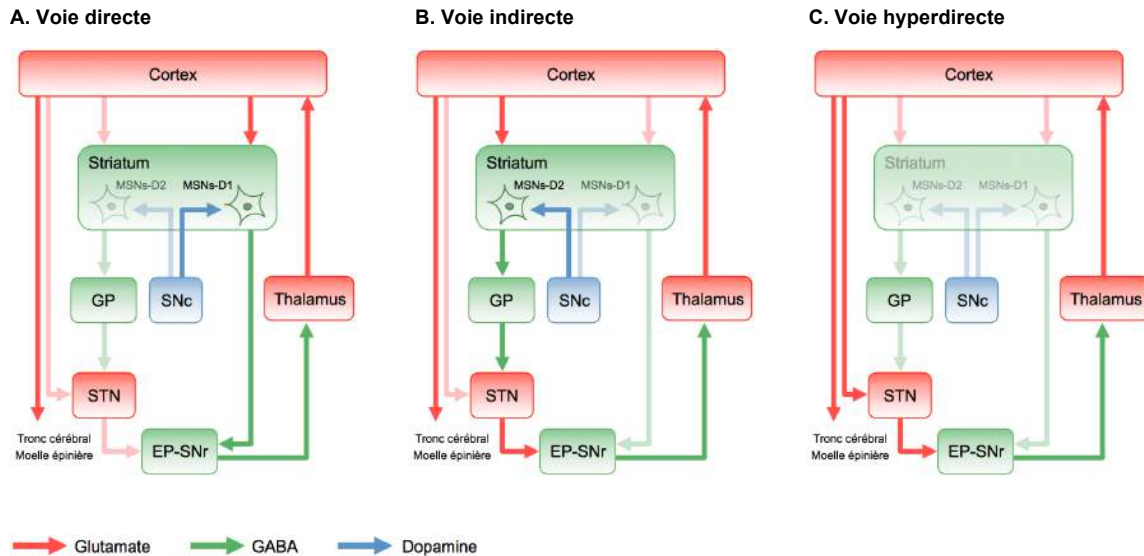


Figure 11 : Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base en situation physiologique

Schémas illustrant le fonctionnement de la voie directe (A), la voie indirecte (B) et la voie hyperdirecte (C) au sein du circuit des ganglions de la base (GB) en situation physiologique. Sont représentées les projections glutamatergiques (rouge), GABAergiques (vert) et dopaminergiques (bleu). Abréviations : EP, noyau entopédonculaire (correspondant au globus pallidus interne GPi) ; GP, globus pallidus (correspondant au globus pallidus externe GPe) ; MSNs-D1, neurones épineux exprimant les récepteurs dopaminergiques D1 ; MSNs-D2 : neurones épineux exprimant les récepteurs D2 ; STN, noyau subthalamique ; SNC, substance noire *pars compacta* ; SNr, substance noire *pars reticulata*.

La voie directe, mono-synaptique, est composée de neurones épineux moyens striataux (Medium Spiny Neurons, MSNs) inhibiteurs, de type GABAergique, qui expriment les récepteurs dopaminergiques de type D1 et deux neuropeptides, la substance P et la dynorphine (MSNs-D1) (Bolam and Smith, 1990). Ils projettent directement sur les structures de sortie EP-SNr qui ont elles-mêmes un effet inhibiteur sur les neurones du thalamus. L'activation de la voie directe aboutit donc à la levée de l'inhibition de la voie thalamo-corticale (Figure 11A)

La voie indirecte, poly-synaptique, est globalement excitatrice puisqu'elle s'organise en deux composantes inhibitrices et une composante excitatrice. La première composante est représentée par les MSNs striataux inhibiteurs GABAergiques qui expriment les récepteurs dopaminergiques de type D2 et les enképhalines (MSNs-D2) et qui projettent en direction du GP (Alexander and Crutcher, 1990; Gerfen et al., 1990). La deuxième composante fait intervenir les neurones GABAergiques pallidaires de projection en direction du NST. Enfin, la dernière composante correspond à la projection des neurones glutamatergiques du NST vers les structures de sortie EP-SNr. Ainsi,

L'activité des neurones du GP est inhibée par les projections striato-pallidales. L'inhibition du NST par ces neurones pallidaux est levée et par conséquent, la voie indirecte aura un effet excitateur sur les neurones des structures de sortie EP-SNr. Au final, l'activation de cette voie induit un renforcement de l'inhibition de la voie thalamo-corticale (**Figure 11B**).

Des études plus récentes ont révélé l'existence d'une troisième voie dite hyperdirecte, qui relie directement le cortex au NST. Elle a un effet excitateur rapide et puissant sur les structures de sortie EP-SNr (Nambu et al., 2000; 2002; Jahfari et al., 2011; Brunenberg et al., 2012). L'activation de la voie hyperdirecte conduit, comme la voie indirecte, à un renforcement de l'inhibition de la voie thalamo-corticale (**Figure 11C**).

La réalisation d'un mouvement dépend de l'équilibre qu'il existe entre l'action excitatrice de la voie directe et l'action inhibitrice des voies indirecte et hyperdirecte sur l'activité corticale. La levée de l'inhibition thalamique, induite par l'activation de la voie directe, participerait à l'initiation du mouvement tandis que le renforcement de cette inhibition, par l'activation de la voie indirecte ou hyperdirecte, tend à réduire les mouvements. Des études récentes utilisant la technique d'optogénétique (Kravitz et al., 2010) ont permis de confirmer cette dichotomie, en activant spécifiquement les MSNs-D1 ou des MSNs-D2, associés respectivement aux voies directe et indirecte (Kravitz et al., 2010; Freeze et al., 2013). Les résultats montrent que, chez la souris, l'activation optogénétique spécifique des MSNs-D1 de la voie directe induit une augmentation de la locomotion et une inhibition des neurones de la SNr. À l'inverse, l'activation spécifique des MSNs-D2 de la voie indirecte stimule les neurones de la SNr et en conséquence une diminution de la locomotion.

L'équilibre entre les deux voies est assuré par l'innervation dopaminergique striatale issue de la SNc. La DA libérée dans le striatum agit au niveau des MSNs-D1 de la voie directe et des MSNs-D2 de la voie indirecte, et module ainsi ces deux voies de façon opposée. L'activation des récepteurs D1 par la DA active la voie directe, alors que l'activation des récepteurs D2 inhibe la voie indirecte (Surmeier et al., 2007). Ces effets opposés de la DA opèrent en synergie au sein du striatum pour moduler la transmission cortico-striatale (Gerfen and Surmeier, 2011).

2.2. Dysfonctionnement dans la maladie de Parkinson

Le modèle proposé par Albin et coll. rend compte du fonctionnement physiologique des GB mais aussi de leur dysfonctionnement en situation pathologique (Albin et al., 1989; DeLong, 1990).

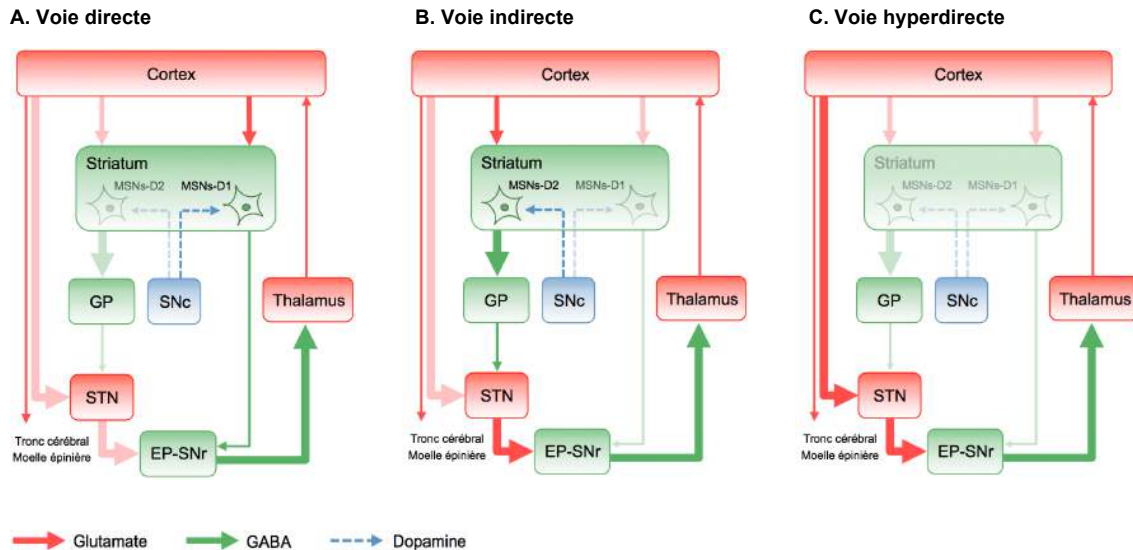


Figure 12 : Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base en situation pathologique

Dans la maladie de Parkinson, la dégénérescence des neurones dopaminergiques issus de la SNc (pointillés bleus) induit une hypoactivité de la voie directe (A) et une hyperactivité des voies indirecte (B) et hyperdirecte (C). Ces dysfonctionnements induisent une augmentation de l'activité générale des structures de sortie EP-SNr et un renforcement de l'inhibition de la voie thalamo-corticale : la boucle facilitatrice du mouvement est ainsi perturbée.

Dans la MP, la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc, qui induit une diminution du taux de DA au niveau du striatum, conduit alors à un dysfonctionnement général du circuit des GB (Albin et al., 1989; DeLong, 1990; Wichmann and DeLong, 1996) (Figure 12). D'après le modèle d'organisation classique, la dégénérescence des projections nigrostriatales induit une diminution de l'activité de la voie directe (facilitatrice du mouvement) parallèlement à une augmentation de l'activité de la voie indirecte (inhibitrice du mouvement). La voie directe étant moins activée, le signal inhibiteur généré par les structures de sortie EP-SNr vers le thalamus sera plus important (Figure 12A). L'augmentation de l'activité de la voie indirecte s'accompagne, quant à elle, d'une hyperactivité du NST qui potentialise l'action inhibitrice des structures de sortie EP-SNr sur le thalamus (Figure 12B). De récentes études montrent que l'hyperactivité du NST peut

également être due à une augmentation de la connectivité de la voie hyperdirecte glutamatergique (Nambu, 2005; Leblois et al., 2006; Baudrexel et al., 2011) ([Figure 12C](#)).

Au final, le changement d'activité de ces différentes voies provoque une augmentation de l'activité générale des structures de sortie EP-SNr et par conséquent un renforcement de l'inhibition de la voie thalamo-corticale : la boucle facilitatrice du mouvement est ainsi perturbée. Ce déséquilibre, vraisemblablement responsable des symptômes moteurs caractéristiques de la maladie, est associé à l'akinésie et la bradykinésie observées chez les patients parkinsoniens.

3. Vers une remise en cause du modèle classique

Bien qu'il ait été considéré comme le modèle de référence pour la compréhension du fonctionnement physiologique et pathologique des GB, le modèle d'Albin et coll. (Albin et al., 1989; DeLong, 1990) est critiquable (DeLong and Wichmann, 2009). En effet, il ne tient pas compte de l'existence (1) de connexions entre les GB et d'autres structures cérébrales et (2) des nombreuses autres connexions au sein même du réseau des GB.

Ainsi, les projections cortico-thalamiques (Briggs and Usrey, 2008), les projections thalamo-striatales (Smith et al., 2004; 2014) ou encore l'intégration du noyau pédonculopontin (Gut and Winn, 2016) doivent être aussi à considérer.

Une des critiques majeures exprimée à l'encontre du modèle classique concerne la ségrégation des projections striatales. En effet, il a été montré que certaines terminaisons du GP sont immuno-positives pour la substance P, suggérant que des MSNs-D1 projetant sur les structures de la voie directe émettent également des collatérales au niveau du GP (Kawaguchi et al., 1990; Wu et al., 2000). De façon similaire, des terminaisons immuno-positives pour les enképhalines sont retrouvées dans la SNr, indiquant que les MSNs-D2 projetant sur les structures de la voie indirecte présentent des arborisations collatérales dans une structure classiquement associée à la voie directe (Kawaguchi et al., 1990; Wu et al., 2000). Ces auteurs indiquent que de telles arborisations pourraient concerner environ les deux tiers des MSNs efférents. Le concept d'une ségrégation reposant sur l'expression différente des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 dans le striatum est également de plus en plus contesté. Des études en hybridation *in situ* ont montré qu'il existait une co-localisation des ARNm codant pour les récepteurs D1 et D2 dans de nombreux MSNs, et qu'un même neurone peut être

activé par un agoniste D1 ou D2 (Surmeier et al., 1996). D'autres données *in vitro* ont confirmé cette co-localisation des récepteurs D1 et D2 sur les MSNs en culture (Aizman et al., 2000). Conti et coll. ont également montré que l'administration intrastriatale d'agonistes D1 ou D2 induit des modifications métaboliques identiques, à savoir une réduction de l'utilisation de glucose à la fois dans le GP et la SNr, structures associées aux voies indirecte et directe, respectivement (Conti et al., 2001). L'ensemble de ces observations remet ainsi partiellement en cause le principe admis de deux voies de sortie individualisées et d'une ségrégation des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 régulant chacune des deux voies.

Il existe également des connexions entre les structures des GB bien plus complexes que celles décrites dans le modèle des voies directe et indirecte. La présence de voies striato-nigro-striatales formant des boucles entre la SNc et le striatum indiquent l'existence de connexions réciproques entre les neurones dopaminergiques de la SNc et le striatum (Haber et al., 2000; Haber, 2003) (**Figure 13**).

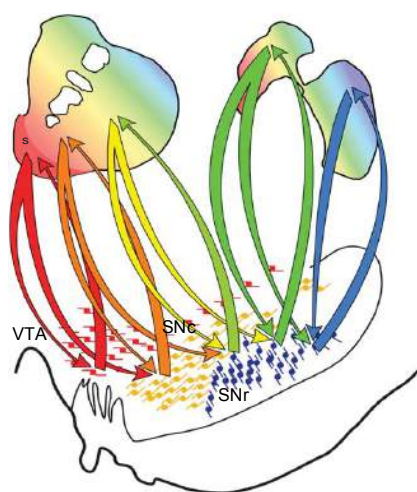


Figure 13 : Voies striato-nigro-striatales

Schéma illustrant les connexions réciproques existant entre le striatum et les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* (SNc). Le gradient de couleur présente l'organisation des entrées cortico-striatales : limbiques (rouge), associatives (vert) et motrices (bleu). L'existence des voies striato-nigro-striatales met en évidence un jeu de connexion « en spirales » qui relie le territoire limbique aux territoires associatifs et sensorimoteur du striatum. Abréviations : SNc, substance noire *pars compacta* ; SNr, substance noire *pars reticulata* ; VTA, aire tegmentale ventrale. D'après Haber et al., 2000.

Dans les années 2000, Suzanne N. Haber montre que, chez les primates non-humains, les projections dopaminergiques sont organisées de telle sorte que le striatum ventral reçoit des afférences d'un nombre limité de neurones dopaminergiques provenant de la VTA et de la partie médiane de la SNc, mais projette en retour vers une zone beaucoup plus large. Au contraire, le striatum dorsolatéral (sensorimoteur) reçoit une innervation dopaminergique provenant d'une zone plus large, comprenant les régions ventrales et latérales de la SNc, mais projette en retour vers une région plus restreinte de cellules dopaminergiques. Schématiquement, chaque boucle striato-nigro-

striatale connecterait une région striatale avec une région dopaminergique de façon réciproque et non réciproque. Outre les connexions réciproques, une région striatale recevrait des projections dopaminergiques sur lesquelles elle ne projetterait pas, et projetterait sur des groupes cellulaires dopaminergiques, qui ne l'innervent pas en retour.

D'autres arguments viennent également remettre en question l'organisation fonctionnelle classique des deux voies de sorties. Jonathan W. Mink propose un modèle d'inhibition des programmes moteurs concurrents afin que seul le programme moteur approprié soit initié (Mink, 1996; 2003). Cette hypothèse considère que lorsqu'un mouvement volontaire est généré, le cortex envoie un signal conjoint au striatum et au NST, ce dernier excite alors de manière diffuse le GPi (ou EP) et la SNr créant une inhibition du générateur de commandes motrices des mouvements concurrents. Au même moment, le striatum filtre les informations qu'il reçoit du cortex, les transforme en fonction du contexte, et inhibe le GPi (ou EP) et la SNr levant de ce fait l'inhibition motrice pesant sur le mouvement désiré. De cette manière, les sorties des GB agissent pour sélectionner la commande motrice souhaitée et inhibent les commandes compétitrices afin de permettre l'exécution du mouvement (Figure 14).

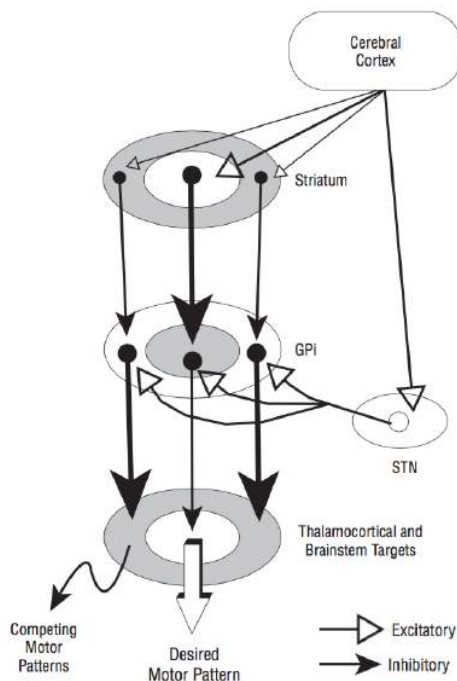
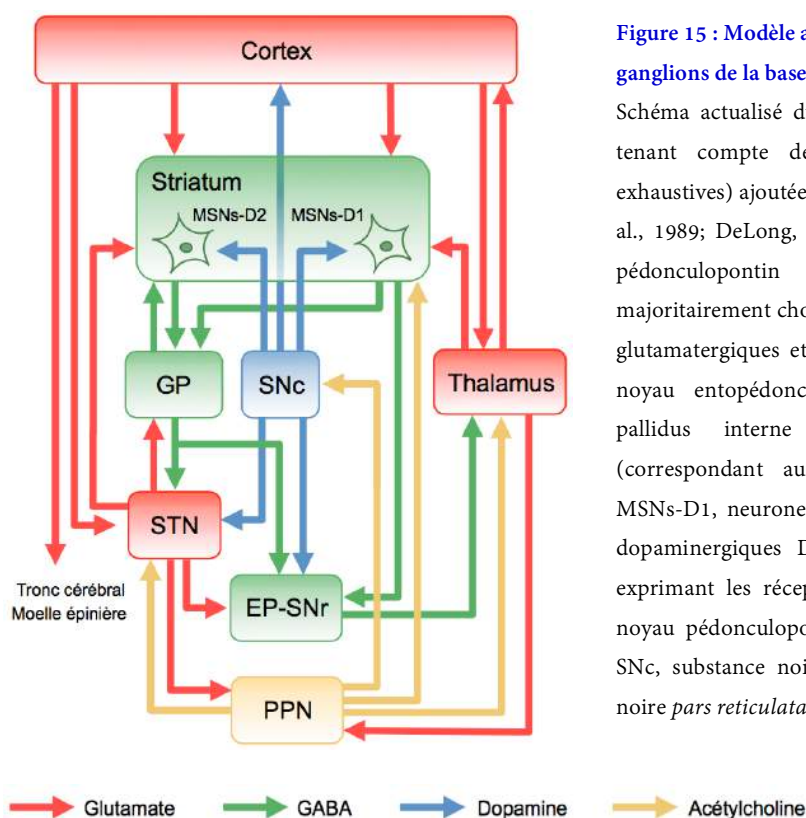


Figure 14 : Modèle d'inhibition des programmes moteurs concurrents

Mink propose un modèle dans lequel les structures de sorties des ganglions de la base (GB) comme le globus pallidus interne GPi (correspondant au noyau entopédunculaire EP chez le rongeur) agissent pour sélectionner la commande motrice souhaitée et inhibent les commandes concurrentes afin de permettre l'exécution du mouvement. Les flèches blanches représentent les projections excitatrices et les flèches noires les projections inhibitrices. L'épaisseur des flèches représente l'ampleur relative de l'activité des projections. Abréviations : GPi, globus pallidus interne ; STN, noyau subthalamique. D'après Mink, 2003.

Plus récemment, les travaux menés par le groupe de Rui Costa montrent que les MSNs-D1 et MSNs-D2 associés respectivement à la voie directe et indirecte sont activés de façon concomitante. Ils observent une augmentation transitoire de l'activité calcique dans les deux populations de MSNs au moment de l'initiation du mouvement, ce qui n'est pas le cas lorsque l'animal est au repos (Cui et al., 2013; Calabresi et al., 2014). Ces données, compatibles avec le modèle de Mink, renforcent l'hypothèse d'une activation des deux voies nécessaire à la sélection de l'action : la voie directe permet alors l'action ciblée tandis que la voie indirecte inhibe les mouvements non désirés.

Ces données récentes de la littérature ne cessent d'affiner le modèle classique d'organisation fonctionnelle des GB. Un modèle actualisé, complétant celui proposé par Albin et coll. et tenant compte des multiples connexions décrites précédemment, est proposé dans la figure suivante (Figure 15). Ce modèle résume et rend compte de la complexité de modéliser les nombreuses connexions du circuit cortico-striato-thalamo-cortical.



Chapitre 3

Le Striatum

Chapitre 3 : Le Striatum

1. Description du striatum

Le striatum est la structure la plus volumineuse des ganglions de la base et joue un rôle crucial dans l'intégration des informations corticales. Il apparaît chez le rongeur comme un seul noyau alors que, chez l'homme et les primates non humains, il se compose de deux parties, le noyau caudé et le putamen, séparés par la capsule interne.

1.1. Territoires fonctionnels

Les aires corticales projettent de manière topographique sur le striatum et permettent ainsi de délimiter différents territoires fonctionnels, les territoires sensorimoteur et associatif formant le striatum dorsal, et le territoire limbique formant le striatum ventral.

1.1.1. Striatum dorsal et ventral

Le striatum est divisé en deux territoires : le striatum dorsal et le striatum ventral (McGeorge and Faull, 1989; Parent and Hazrati, 1995a; Voorn et al., 2004; Kreitzer, 2009) ([Figure 16](#)).

Le striatum dorsal est constitué des portions latérales du noyau caudé et dorsolatérale du putamen. Chez le rongeur, il est souvent lui-même subdivisé en deux territoires. Le striatum dorsolatéral (DLS), correspondant au putamen chez les primates, reçoit les projections du cortex sensorimoteur, alors que le striatum dorsomédian (DMS) correspondant au noyau caudé chez le primate, reçoit des projections des cortex préfrontal et associatif. Le DLS et le DMS se distinguent par leur implication dans des processus cognitifs différents. En effet, le DMS serait impliqué durant les premières phases d'apprentissage moteur, alors que le DLS interviendrait plutôt dans la consolidation et l'automatisation du comportement (Yin et al., 2009). D'autres études montrent que le DLS est impliqué dans la mémoire procédurale et que le DMS est plutôt engagé dans la mémoire spatiale (Voorn et al., 2004).

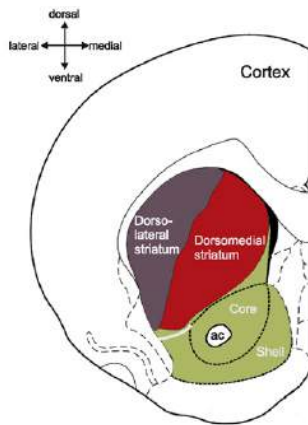


Figure 16 : Striatum dorsal et ventral

Coupe coronale schématique de cerveau de rongeur représentant les différents territoires fonctionnels du striatum : le striatum dorsal – subdivisé en striatum dorsolatéral (mauve) et dorsomédian (rouge) – et le striatum ventral (vert). Le striatum ventral est composé du noyau accumbens qui est divisé en une partie « core » entourant la commissure antérieure (ac) et une partie « shell ». D'après Humphries and Prescott, 2010.

Le striatum ventral, quant à lui, se compose du noyau accumbens, subdivisé en une partie « core » entourant la commissure antérieure et une partie « shell ». Il reçoit les projections du cortex limbique. Les deux subdivisions du striatum ventral auraient des rôles différents, le « core » contrôlerait les transitions entre la motivation et l'initiation de l'action ou du comportement dirigé, et le « shell » interviendrait dans le contrôle de la motivation des actions, conditionnées ou non (Heimer and Van Hoesen, 2006).

Toutefois, ces territoires dorsaux et ventraux ne sont pas complètement ségrégués. Ils forment un continuum fonctionnel dans lequel il existe certaines zones de recouvrement ou chevauchement (Calzavara et al., 2007; Haber, 2016). La mise en évidence des voies striato-nigro-striatales par Haber a permis de montrer que, par le jeu de connexions « en spirales », le territoire limbique du striatum (striatum ventral) pouvait influencer les territoires associatif et sensorimoteur (DMS et DLS) (Haber et al., 2000; Haber, 2003), soulignant la connexion fonctionnelle entre ces régions striatales.

1.1.2. Striosomes et matrice extrastriosomale

Le striatum peut aussi être divisé en deux compartiments, les striosomes et la matrice extrastriosomale, sur la base de leurs propriétés histochimiques (Figure 17). Les striosomes constituent des îlots de neurones et représentent environ 10% du volume striatal total. La matrice, quant à elle, occupe la plus grande partie du striatum et est relativement pauvre en cellules. Cette organisation hétérogène a été décrite pour la première fois en 1978 par Graybiel et Ragsdale, sur la base de la présence de marqueurs neurochimiques spécifiques montrant notamment une forte immunoréactivité de la matrice à l'acétylcholinestérase (AChE, enzyme de dégradation de l'ACh),

alors que les striosomes sont plus faiblement marqués (Graybiel and Ragsdale, 1978; Hirsch et al., 1989). La subdivision striosomes/matrice a ensuite été confirmée par la mise en évidence d'une distribution hétérogène d'une très grande variété de neurotransmetteurs et de protéines (Graybiel, 1990). En effet, les striosomes sont riches, entre autres, en récepteurs opiacés et montrent une forte immunoréactivité pour la substance P et les enképhalines, tandis que la matrice exprime une grande immunoréactivité pour la TH et pour la somatostatine.

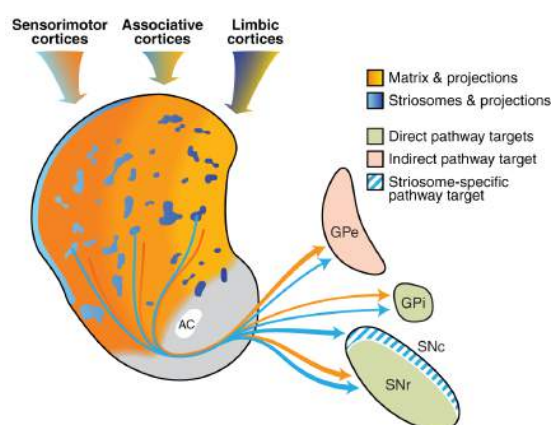


Figure 17 : Striosomes et matrice extrastriosomale

Coupe coronale schématique de striatum illustrant les striosomes (bleu) et la matrice (orange). La coloration des flèches qui projettent vers le striatum représente la contribution relative des régions corticales limbiques aux striosomes et des régions sensorimotrices et associatives à la matrice. Les flèches efférentes du striatum indiquent les projections des neurones épineux GABAergiques (MSNs) des striosomes et de la matrice vers les structures cibles. Abréviations : AC, commissure antérieure ; GPe, globus pallidus externe ; GPi, globus pallidus interne ; SNc, substance noire *pars compacta* ; SNr, substance noire *pars reticulata*. D'après Crittenden and Graybiel, 2011.

La signification de cette compartimentation est encore aujourd'hui mal comprise, mais des études ont néanmoins suggéré que ces deux compartiments seraient impliqués dans des fonctions distinctes. Des structures limbiques comme l'amygdale et certaines parties du cortex préfrontal seraient reliées aux striosomes, tandis que la matrice recevrait des informations issues principalement du cortex sensorimoteur (Donoghue and Herkenham, 1986). Chez le rongeur, les neurones des striosomes projettent essentiellement vers la SNc, et ceux de la matrice vers la SNr (Gerfen, 1984; Graybiel, 1990; Crittenden and Graybiel, 2011).

1.2. Populations neuronales

Trois populations neuronales fortement interconnectées sont réparties de façon homogène au sein du striatum : les neurones de projection GABAergiques, les interneurones GABAergiques et les interneurones cholinergiques (Kemp and Powell, 1971; Bishop et al., 1982; Kawaguchi et al., 1995; Tepper and Bolam, 2004; Kreitzer, 2009). Ces neurones se distinguent par les neuromédiateurs et récepteurs qu'ils expriment, ainsi que par leur morphologie et leur propriétés physiologiques.

1.2.1. Neurones de projection GABAergiques

Les neurones de projection GABAergiques appelés également « Medium Spiny Neurons » (MSNs) en raison de leurs caractéristiques morphologiques, représentent 90 à 95% des neurones striataux chez le rongeur et 75 à 80% chez les primates (Kemp and Powell, 1971; DiFiglia et al., 1976; Graveland and DiFiglia, 1985; Kreitzer, 2009). Comme leur nom l'indique, ce sont des neurones de taille moyenne (soma de 10 à 20 μm de diamètre) et leurs dendrites sont recouvertes de nombreuses épines. Les MSNs sont la cible majeure des afférences du striatum et sont aussi les neurones efférents (Wilson and Groves, 1980). Leurs axones sont relativement longs et présentent de nombreuses collatérales (DiFiglia et al., 1976; Kawaguchi et al., 1997), qui forment des synapses avec les autres neurones striataux, en particulier sur les autres MSNs (Somogyi et al., 1981; Wilson, 1994; Tepper and Bolam, 2004).

Les MSNs sont classés selon leur site de projection, les neuropeptides qu'ils libèrent et le type de récepteur à la DA qu'ils expriment. Les MSNs striato-nigraux (MSNs-D1), à l'origine de la voie directe, expriment les récepteurs dopaminergiques D1, les mAChRs M1 et M4 et deux neuropeptides, la substance P et la dynorphine. Les MSNs striato-pallidaux (MSNs-D2), à l'origine de la voie indirecte, expriment les récepteurs dopaminergiques D2, les mAChRs M1 et les enképhalines (MSNs-D2). Comme il l'a été évoqué précédemment, cette dichotomie reste cependant débattue (Surmeier et al., 1996; Aizman et al., 2000; Gertler et al., 2008). Ainsi, il existe également une faible proportion de MSNs du striatum dorsal (5%) qui co-expriment les deux types de récepteurs dopaminergiques (Bertran-Gonzalez et al., 2008; 2010). Les MSNs-D1 et MSNs-D2 ont une morphologie relativement similaire, avec néanmoins, une arborisation dendritique plus complexe pour les MSNs-D1 (Gertler et al., 2008) ([Figure 18A](#)). Des études d'immunomarquage ont permis de montrer que les deux populations de MSNs sont en nombre comparable dans le striatum dorsal : 43% de MSNs-D2 et 52% de MSNs-D1 (Bertran-Gonzalez et al., 2008). La région la plus caudale du striatum présente une distribution hétérogène et est constituée majoritairement de MSNs-D1 (Gangarossa et al., 2013b). Cette organisation hétérogène est également retrouvée au niveau du noyau accumbens dans la partie ventrale du striatum (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Gangarossa et al., 2013a).

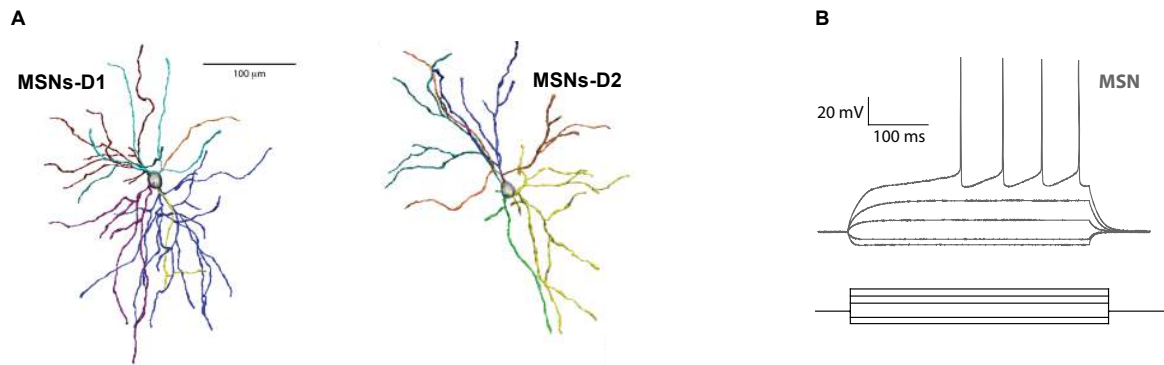


Figure 18 : Neurones de projection épineux GABAergiques

A. Morphologie des neurones de projection épineux GABAergiques (Medium Spiny Neurons, MSNs). Les MSNs-D1 possèdent plus de dendrites primaires (représentées de différentes couleurs) que les MSNs-D2. D'après (Gertler et al., 2008). **B.** Enregistrement *in vitro* des MSNs en courant-clamp (configuration cellule entière). Réponse après application de courants de différentes intensités, dépolarisants ou hyperpolarisants. D'après Kreitzer, 2009.

D'un point de vue électrophysiologique, bien que les MSNs reçoivent des afférences excitatrices provenant du cortex et du thalamus, ils sont relativement silencieux. La faible excitabilité de ces neurones est due à leur potentiel membranaire de repos très hyperpolarisé, de -90 à -70 mV (Kita et al., 1984; Wilson et al., 1990; Kreitzer, 2009). Les MSNs peuvent passer de leur état de repos très hyperpolarisé à un état dépolarisé (-60 à -40 mV), état durant lequel ils peuvent émettre des potentiels d'action (Wilson and Groves, 1981) (**Figure 18B**). Des études récentes ont cependant montré que les deux populations de MSNs diffèrent également par leurs caractéristiques électrophysiologiques. En effet, les MSNs-D2 sont plus excitables que les MSNs-D1 (Kreitzer and Malenka, 2007; Gertler et al., 2008; Maurice et al., 2015).

Dans leur revue, Bertran-Gonzalez et coll. relatent d'autres différences existant entre ces deux populations de MSNs, du point de vue morphologique, électrophysiologique, des récepteurs qu'ils expriment, mais également concernant leurs afférences corticales et leurs efférences intrastriales et extrastriales (Bertran-Gonzalez et al., 2010). L'ensemble de ces données est résumé dans le **Tableau 4**.

	MSNs-D1	MSNs-D2
Morphologie	Plus de dendrites	Moins de dendrites
Synapses cortico-striatales	Moins d'afférences corticales	Plus d'afférences corticales
	LTD modulée par mGluR1, M1	LTD modulée par mGluR1, M1, D2
	LTP modulée par D1, NMDA	LTP modulée par A2A, NMDA
Electrophysiologie	Moins excitables	Plus excitables
	Propagation dendritique des potentiels d'action moins distale	Propagation dendritique des potentiels d'action plus distale
Projections axonales	Intrastriatales : MSNs-D1, MSNs-D2 (faible)	Intrastriatales : MSNs-D1, MSNs-D2
	Extrastriatales : EP, SNr, GP	Extrastriatales : GP
Expression	Récepteurs : D1, D3, A1, M1, M4 (forte)	Récepteurs : D2, D3, A2A, M1, M4 (faible)
	Neuropeptides : GABA, SP, Dynorphine	GABA, Enképhalines

Tableau 4 : Deux populations de MSNs

Récapitulatif des différences existant entre les deux populations de MSNs, MSNs-D1 et MSNs-D2, d'un point de vue morphologique, électrophysiologique, de leurs projections axonales, ainsi que des récepteurs et des neuropeptides qu'ils expriment. D'après Bertran-Gonzalez et al., 2010.

1.2.2. Interneurones GABAergiques

Les interneurones GABAergiques représentent 5% des neurones striataux et interviennent, entre autres, dans les mécanismes de la plasticité cortico-striatale. Les interneurones GABAergiques présentent une arborisation dendritique dépourvue d'épines qui rayonne à proximité du soma, et possèdent une arborescence axonale très dense. Ils sont subdivisés en trois populations, selon leurs propriétés électrophysiologiques et neurochimiques (Kawaguchi et al., 1997; Tepper and Bolam, 2004; Kreitzer and Malenka, 2008; Kreitzer, 2009).

Les interneurones à décharge rapide ou « Fast Spiking Interneurons » (FS). Du point de vue histochimique, ils sont appelés également interneurones paravalbumine positifs. Comme leur nom l'indique, ils sont capables de décharger à haute fréquence et de manière soutenue (Kreitzer and Malenka, 2008; Kreitzer, 2009). Ils présentent une arborisation dendritique très dense, si bien qu'un seul interneurone peut établir des connexions avec 135 à 541 MSNs (Koós and Tepper, 1999).

Les interneurones à décharge lente ou « Low-Threshold Spike Interneurons » (LTS) présentent un seuil de décharge très faible. D'un point de vue histochimique, ces interneurones expriment la somatostatine, le neuropeptide Y et l'oxyde nitrique synthase.

Les interneurones à décharge lente et persistante ou « Persistent and Low-Threshold Spike » (PLTS). Ils sont également appelés interneurones calrétinine positifs. Ils présentent un seuil de décharge très faible et un potentiel plateau persistant de longue durée.

Les différents interneurones GABAergiques présentent une distribution propre en fonction des territoires fonctionnels du striatum. Les interneurones FS sont concentrés dans la partie dorsolatérale du striatum, les interneurones LTS sont retrouvés dans la région ventrale, alors que les interneurones PLTS sont plutôt localisés dans la partie dorsomédiane du striatum (Kita et al., 1990; Kawaguchi et al., 1995; Tepper and Bolam, 2004).

1.2.3. Interneurones cholinergiques

Les interneurones cholinergiques (ChIs) du striatum représentent moins de 2% de la population neuronale striatale (Kemp and Powell, 1971; Bolam et al., 1984; Phelps et al., 1985). Ils sont identifiables par leur contenu en choline acétyltransférase (ChAT), enzyme de synthèse de l'ACh, ainsi qu'en acétylcholinestérase (AChE), l'enzyme de dégradation de l'ACh.

Morphologiquement, les ChIs ont tout d'abord été identifiés comme des interneurones géants. Ils sont très volumineux et possèdent un large soma, sphérique ou allongé, de 20 à 50 µm de diamètre, duquel émerge une importante arborisation neuritique qui projette principalement sur les axones des MSNs, et permet de moduler l'activité des MSNs dans de vastes territoires du striatum (**Figure 19A**) (Bolam et al., 1984; Smith and Bolam, 1990; Wilson et al., 1990). Les ChIs sont distribués de manière homogène à travers les différents territoires fonctionnels du striatum (Phelps et al., 1985; 1989), avec une distribution préférentielle au niveau de la matrice extrastriosomale, aux frontières des striosomes (van Vulpén and van der Kooy, 1998).

D'un point de vue électrophysiologique, les ChIs présentent des décharges spontanées, toniques à une fréquence de 2 à 10 Hz (Wilson et al., 1990; Kawaguchi, 1993; Wilson and Goldberg, 2006; Kreitzer, 2009). Ils sont considérés comme des « pacemakers » autonomes puisqu'ils émettent des potentiels d'action en absence d'entrée synaptique. Les potentiels d'action qu'ils génèrent sont

particulièrement longs et sont suivis d'une phase de post-hyperpolarisation très marquée variant entre 100 et 200 ms (Kreitzer, 2009). Ces caractéristiques leur ont valu le terme de « Tonicly Active Neurons » (TANs) (Wilson et al., 1990; Aosaki et al., 1995; Apicella, 2002) (**Figure 19B**).

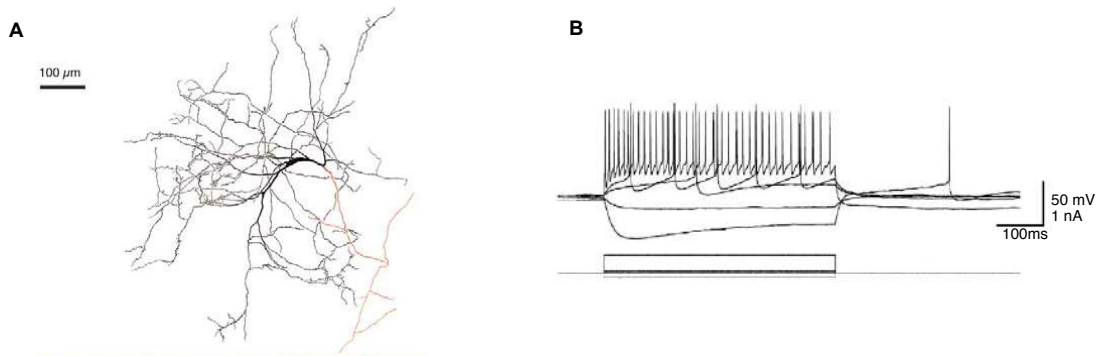


Figure 19 : Interneurones cholinergiques

A. Morphologie des interneurones cholinergiques (ChIs) illustrant leur large soma (noir) et leur arborisation neuritique étendue. B. Enregistrement *in vitro* des ChIs en courant-clamp (configuration cellule entière). Réponse après application de courants dépolarisants ou hyperpolarisants de différentes intensités. D'après Tepper and Bolam, 2004.

Les ChIs reçoivent des afférences glutamatergiques du cortex et des noyaux centromédian et parafasciculaire du thalamus (Lapper and Bolam, 1992; Sidibé and Smith, 1999; Reynolds and Wickens, 2004), des projections dopaminergiques massives provenant de la SNc (Lavoie et al., 1989; Dimova et al., 1993; Smith and Villalba, 2008), ainsi que des afférences GABAergiques provenant des deux populations de MSNs (Bolam et al., 1986; Martone et al., 1992; Pisani et al., 2007; Bonsi et al., 2011) et des interneurones GABAergiques du striatum (Chang and Kita, 1992; Vuillet et al., 1992; Koós and Tepper, 2002). Les ChIs reçoivent également des afférences sérotoninergiques (Bonsi et al., 2007) et noradrénergiques (Pisani et al., 2003b). Les cibles d'action principales des ChIs sont les MSNs. Bien qu'en faible proportion, les ChIs jouent un rôle modulateur clé dans le contrôle de l'excitabilité des deux populations de MSNs (Bolam et al., 1984; Phelps et al., 1985; Izzo and Bolam, 1988), et *in fine* participent aux fonctions motrices et cognitives médiées par le striatum.

Les ChIs expriment de nombreux récepteurs, notamment les récepteurs ionotropiques du glutamate AMPA et NMDA, les récepteurs métabotropiques du glutamate mGluRs, les récepteurs dopaminergiques D2 et D5 et les mAChRs M2 et M4 (Tepper and Bolam, 2004; Pisani et al., 2007;

Kreitzer, 2009; Bonsi et al., 2011; Lim et al., 2014). La diversité des récepteurs exprimés par les ChIs, résumée dans la **Figure 20**, rend ainsi compte de la complexité de la régulation de l'activité cholinergique au sein du striatum.

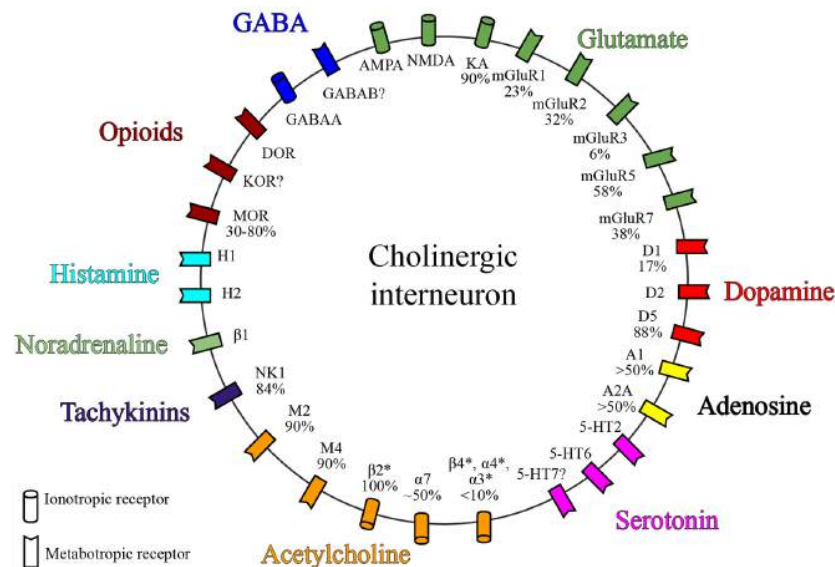


Figure 20 : Expression des récepteurs sur les interneurons cholinergiques

Schéma simplifié représentant les sous-types de récepteurs glutamatergiques, dopaminergiques, adénosinergiques, sérotoninergiques, cholinergiques, tachykininergiques, noradrénergiques, histaminergiques, opioïdiques et GABAergiques exprimés sur un interneurone cholinergique (ChI) du striatum dorsal. Les valeurs indiquent le pourcentage de ChIs exprimant chacun des sous-types de récepteurs. D'après Lim et al., 2014.

La stimulation des récepteurs D2 entraîne une diminution de la libération d'ACh striatale, en diminuant à la fois les décharges spontanées des ChIs et leurs entrées synaptiques (DeBoer et al., 1996; Pisani et al., 2000; Maurice et al., 2004). À l'inverse, la stimulation des récepteurs D5 (de type D1-like) entraîne une augmentation de la libération d'ACh (Damsma et al., 1990; DeBoer and Abercrombie, 1996; Aosaki et al., 1998). Les ChIs expriment également le récepteur neurokinine 1 NK1, récepteur ayant une haute affinité pour la substance P, suggérant une interaction particulière des ChIs avec les MSNs-D1 (Pickel et al., 2000). En effet, il a été montré que la substance P libérée par les MSNs-D1 augmente l'activité des ChIs via la modulation de la transmission GABAergique, et induit la libération d'ACh par un mécanisme NK1R médié (Govindaiah et al., 2010). De plus, la libération d'ACh est également sous le contrôle inhibiteur des autorécepteurs M2 et M4 (Yan and Surmeier, 1996; Calabresi et al., 1998c).

Une des isoformes du transporteur vésiculaire du glutamate (VGLUT3) est également fortement exprimée au niveau des ChIs du striatum (Gras et al., 2002; Herzog et al., 2004). Des données montrent une co-expression du transporteur VGLUT3 avec le transporteur vésiculaire de l'ACh (VACHT) (Gras et al., 2008), suggérant une co-transmission ou une co-libération du glutamate et de l'ACh. Des souris *knock-out* n'exprimant plus de récepteurs VGluT3 (souris VGluT3 KO) présentent une moindre sensibilité à l'halopéridol, une hyperlocomotion et une hypersensibilité à la cocaïne comparativement aux souris *wild-type*. Ces effets comportementaux sont similaires à ceux observés lors d'ablation sélective de ChIs par immunotoxine (Hikida et al., 2001; Kitabatake et al., 2003) et corrélés à une diminution de la libération d'ACh tritiée ($[^3\text{H}]\text{ACh}$) mesurée sur des tranches de striatum. La libération de DA tritiée ($[^3\text{H}]\text{DA}$) est par contre équivalente chez les souris VGluT3 KO et les souris *wild-type*. Ces résultats confirment que les conséquences fonctionnelles sont dues à une diminution du tonus cholinergique et non à une altération de la transmission dopaminergique dans le striatum (Gras et al., 2008). De plus, la présence de VGluT3 et VACHT dans les mêmes vésicules synaptiques permet une accumulation plus importante d'ACh dans ces vésicules et d'augmenter la libération d'ACh. Ce mécanisme de synergie vésiculaire n'est plus observé chez les souris VGluT3 KO, suggérant ainsi une modulation intra-synaptique par le glutamate (via le transporteur VGluT3) de la transmission cholinergique striatale (Mestikawy et al., 2011).

2. Organisation anatomo-fonctionnelle du striatum

Le striatum constitue le lieu de convergence des afférences glutamatergiques de l'ensemble du cortex et des noyaux centromédian et parafasciculaire du thalamus. Les projections glutamatergiques cortico-striatales sont massives et sont majoritairement ipsilatérales, même si des projections contralatérales ont été décrites (McGeorge and Faull, 1989). Les afférences glutamatergiques thalamo-striatales projettent sur le striatum ipsilatéral (Berendse and Groenewegen, 1990). L'activité striatale est modulée par des afférences dopaminergiques provenant de la SNc et de la VTA (Haber et al., 2000; Haber, 2003). Le noyau pédonculopontin ainsi que le noyau tegmental dorsolatéral assure l'innervation cholinergique du striatum (Dautan et al., 2014). Le striatum reçoit également des afférences glutamatergiques d'autres structures telles que l'hippocampe ou encore l'amygdale.

Les efférences GABAergiques du striatum (MSNs) projettent principalement sur les structures de sortie l'EP (ou GPi) et la SNr, ainsi que sur le GPe. Les projections représentent le point de départ des voies directe et indirecte précédemment décrites (Grofová, 1975; Alexander and Crutcher, 1990; Bolam and Smith, 1990; Gerfen et al., 1990; Lévesque et al., 2003). Les MSNs envoient également, en moindre quantité, des terminaisons axonales au niveau de la SNc (Haber et al., 2000; Haber, 2003).

Cette connectivité complexe met en évidence le rôle intégratif et central du striatum au sein du circuit des GB (Kreitzer and Malenka, 2008; Kreitzer, 2009).

2.1. Modulation cholinergique du striatum

De par son importante immunoréactivité pour la ChAT et l'AChE, le striatum est connu depuis de nombreuses années comme une structure présentant une riche innervation cholinergique (Bolam et al., 1984; Phelps et al., 1985; Weiner et al., 1990; Havekes et al., 2011) (**Figure 21**).

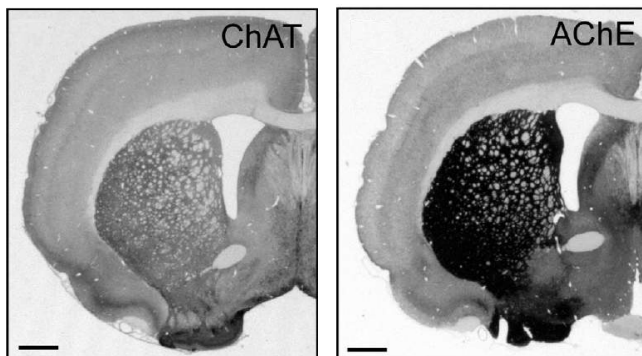


Figure 21 : Innervation cholinergique striatale

Coupes coronales illustrant l'immunoréactivité pour l'enzyme de synthèse de l'acétylcholine (ACh), la choline acétyltransférase (ChAT) (gauche) et pour l'enzyme de dégradation de l'ACh, l'acétylcholinestérase (AChE) (droite). Echelle = 900 μ m. D'après Havekes et al., 2011.

Au sein du striatum, l'innervation cholinergique provient majoritairement des ChIs (Woolf and Butcher, 1981; Mesulam et al., 1992; Calabresi et al., 2000a; Havekes et al., 2011) qui, malgré leur faible proportion (moins de 2%) fournissent une arborisation axonale similaire à celle des neurones dopaminergiques (Descarries and Mechawar, 2000). Une innervation cholinergique mineure issue du noyau pédonculopontin a également été décrite (Woolf and Butcher, 1986). Une étude récente indique que cette innervation provenant de la voie cholinergique du tronc cérébral et projetant sur le striatum peut avoir des conséquences fonctionnelles importantes (Dautan et al., 2014).

Les axones des interneurons cholinergiques sont caractérisés par la présence de petites varicosités (Contant et al., 1996). Certaines études rapportent que malgré la forte densité d'innervation cholinergique, peu de synapses cholinergiques sont retrouvées dans le striatum (Contant et al., 1996; Aznavour et al., 2003), indiquant que la transmission cholinergique s'effectuerait de manière non-synaptique (transmission volumique) via les nombreuses varicosités présentes à la surface des axones des ChIs, en complément de la transmission synaptique classique (Descarries et al., 1997; Havekes et al., 2011).

L'ACh libérée au niveau du striatum par les ChIs exerce son action en activant deux classes de récepteurs cholinergiques, les nAChRs et les mAChRs (Zhou et al., 2003). Ces deux types de récepteurs sont exprimés aussi bien sur les ChIs et les MSNs qu'au niveau des terminaisons glutamatergiques, issues du cortex cérébral et du thalamus, et des terminaisons dopaminergiques provenant de la SNc. La diversité des récepteurs et de leur localisation rendent compte de la complexité de la connectivité au sein du striatum (Pisani et al., 2007; Bonsi et al., 2011) ([Figure 22](#)).

Les nAChRs sont des récepteurs ionotropiques formés par l'assemblage de cinq sous-unités qui s'agencent selon une combinaison homo- ou hétéromérique de sous-unités α et β . Différents sous-types de nAChRs, composés de combinaisons de sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ et $\beta 2$, $\beta 3$ ont été identifiés, avec une prédominance des nAChRs $\alpha 6\beta 2^*$ et $\alpha 4\beta 2^*$ (* indique la présence d'autres sous-unités) au niveau du striatum et de la SNc (Zhou et al., 2002; Quik et al., 2007; Quik and Wonnacott, 2011). Les nAChRs sont exprimés sur les terminaisons glutamatergiques, les terminaisons dopaminergiques issues de la SNc, sur les interneurons GABAergiques (interneurons FS et LTS) mais ils sont absents des MSNs (Zhou et al., 2003; Quik et al., 2007; Kreitzer, 2009). Généralement, la stimulation de ces nAChRs facilite respectivement la libération de glutamate, de DA et de GABA (Dani, 2001; Zhou et al., 2001; Koós and Tepper, 2002; Zhou et al., 2003; Rice et al., 2011).

Les mAChRs (M1-M5) sont plus largement exprimés au sein du striatum dorsal que les nAChRs. Les mAChRs M1 et M3 sont couplés aux protéines Gq/11, tandis que les mAChRs M2 et M4 sont couplés aux protéines Gi/o. Des données immunocytochimiques révèlent une expression prédominante de mAChRs M1 et M4, alors que les mAChRs M2 et M3 sont moins présents, et les mAChRs M5 en quantité infime (Weiner et al., 1990; Hersch and Levey, 1995; Pisani et al., 2007; Chapman et al., 2011). Plusieurs études s'accordent sur une prédominance des mAChRs M4 dans le

striatum, estimée à 45% des mAChRs totaux présents, alors que la distribution des mAChRs M1 et M2 est estimée à environ 30% et 20%, respectivement (Waelbroeck et al., 1990; Yasuda et al., 1993; Volpicelli and Levey, 2004; Chapman et al., 2011) (Cf. [Tableau 2](#)).

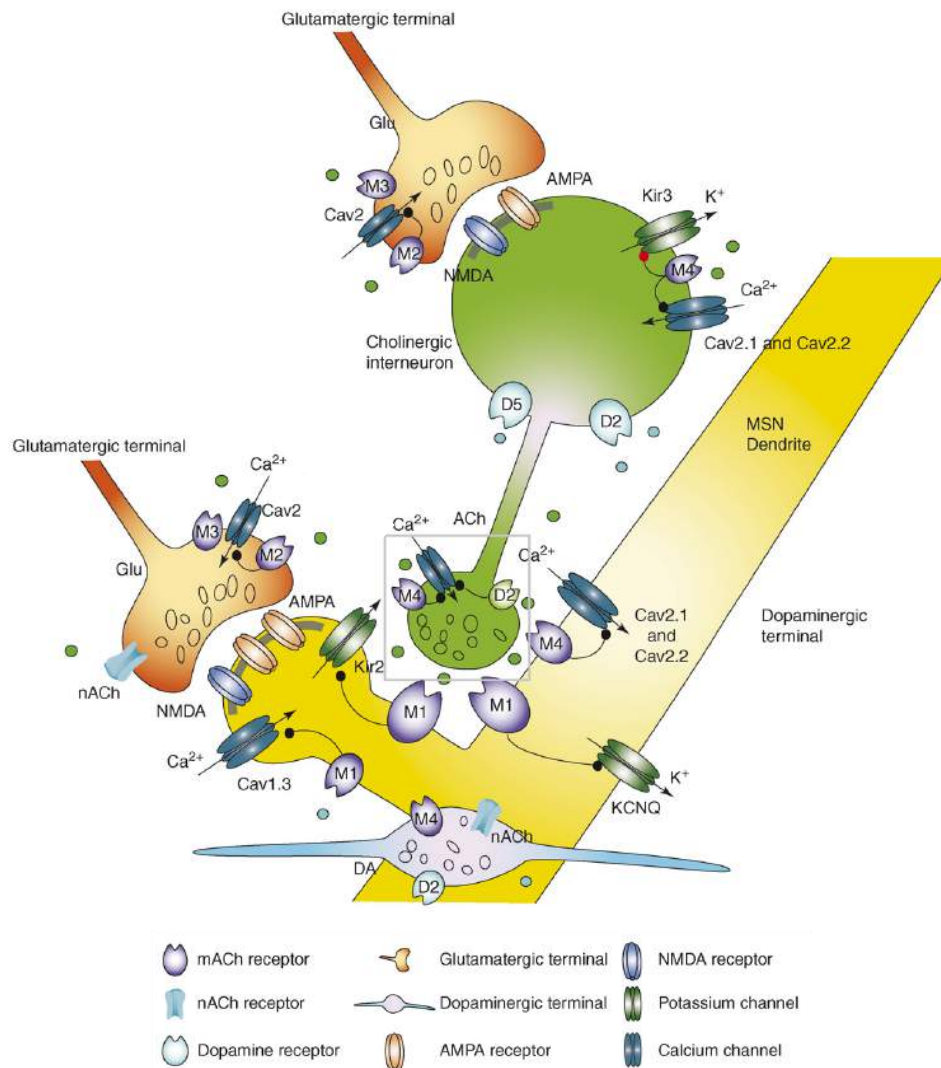


Figure 22 : Modulation cholinergique de la signalisation striatale

Illustration schématique d'un interneurone cholinergique (ChI) (vert) et d'un neurone de projection épineux (MSN) (jaune) recevant des afférences glutamatergiques (orange) et dopaminergiques (bleu). Les récepteurs muscariniques (mAChRs) M1 et M4 sont exprimés de manière prépondérante dans le striatum, sur les MSNs. Les mAChRs M2 et M3 sont exprimés sur les terminaisons pré-synaptiques glutamatergiques et exercent un contrôle inhibiteur de la transmission glutamatergique. Les mAChRs M4 et M2 (non illustré) sont exprimés par les ChIs où ils exercent un contrôle inhibiteur de la transmission cholinergique. Les récepteurs nicotiniques (nAChRs) sont exprimés sur les terminaisons glutamatergiques et dopaminergiques, mais absents sur les MSNs. Abréviations : ACh, acétylcholine ; DA, dopamine ; Glu, glutamate ; MSN, medium spiny neuron. D'après Pisani et al., 2007.

2.1.1. Modulation muscarinique des MSNs

Les mAChRs M1 sont exprimés sur les deux populations de MSNs, alors que les mAChRs M4 sont majoritairement exprimés sur les MSNs-D1 (Bernard et al., 1992; Ince et al., 1997; Santiago and Potter, 2001; Yan et al., 2001; Pisani et al., 2007; Kreitzer, 2009; Bonsi et al., 2011). En effet, une étude rapporte que les mAChRs M4 sont retrouvés dans 86% des MSNs-D1 et 14% des MSNs-D2 (Santiago and Potter, 2001).

Plusieurs données de la littérature suggèrent que les mAChRs M1, couplés aux protéines Gq/11, permettraient l'activation des MSNs (Calabresi et al., 1998a; 1999; Bonsi et al., 2011; Oldenburg and Ding, 2011). Comme les mAChRs M1 et M4 activent deux voies de signalisation différentes, leur stimulation induit des effets opposés sur les deux populations de MSNs.

2.1.2. Modulation muscarinique des ChIs

Les mAChRs M2 et M4, couplés aux protéines Gi/o, sont exprimés au niveau des ChIs où ils jouent le rôle d'autorécepteurs. Leur activation diminue la libération d'ACh (Yan and Surmeier, 1996; Calabresi et al., 1998b; 2000a; Ding et al., 2006; Pisani et al., 2007; Bonsi et al., 2011; Oldenburg and Ding, 2011). En effet, l'utilisation d'un agoniste sélectif des mAChRs M2 (oxotrémorine) induit une hyperpolarisation des ChIs (Calabresi et al., 1998c). De plus, il a été montré qu'un antagoniste relativement sélectif des mAChRs M2, l'AF-DX 116, entraîne une libération d'ACh, probablement en bloquant le rétrocontrôle négatif qu'ils exercent sur la libération d'ACh (Galarraga et al., 1999).

À l'aide de souris *knock-out* génétiquement modifiées pour ne plus exprimer les mAChRs M2 (souris M2 KO) ou les mAChRs M4 (souris M4 KO), ou les deux types de mAChRs (souris M2-M4 double KO), une étude a montré que la délétion des mAChRs M2 n'affecte pas la libération d'ACh, alors que celle des mAChRs M4 supprime totalement le contrôle inhibiteur sur la libération d'ACh au niveau striatal (Zhang et al., 2002). Ces données semblent ainsi indiquer, qu'au niveau des ChIs, les mAChRs M4, et non les mAChRs M2, jouent un rôle indispensable au rétrocontrôle négatif de la libération d'ACh dans le striatum.

2.1.3. Modulation muscarinique des terminaisons glutamatergiques

Des études indiquent la présence de mAChRs M2 et M3 sur les terminaisons glutamatergiques issues du cortex où ils exercent des effets opposés en inhibant ou en facilitant la libération de glutamate, respectivement (Alcantara et al., 2001; Pisani et al., 2007; Higley et al., 2009). De ce fait, il a été montré que la scopolamine, un antagoniste non sélectif des différents sous-types de mAChRs, augmente la concentration extracellulaire de glutamate dans le striatum (Rawls and McGinty, 1998).

2.1.4. Modulation muscarinique des interneurones GABAergiques

Bernard et coll. ont montré que les interneurones GABAergiques, plus particulièrement les interneurones LTS, expriment majoritairement les mAChRs M1 et en moindre proportion les mAChRs M4 (Bernard et al., 1992). Une revue rapporte également la présence de mAChRs M2 au niveau des interneurones LTS (Kreitzer, 2009). Des données électrophysiologiques ont montré qu'un agoniste non sélectif des mAChRs, la muscarine, entraîne une diminution de la libération de GABA, suggérant que les autorécepteurs M2 et M4 seraient majoritairement exprimés par les interneurones GABAergiques et impliqués dans cette inhibition pré-synaptique (Kreitzer, 2009).

2.1.5. Modulation muscarinique des terminaisons dopaminergiques

Enfin, les terminaisons dopaminergiques expriment des mAChRs et notamment les mAChRs M4, dont l'activation induit une diminution de la libération de DA (Pisani et al., 2007). Des études réalisées *in vitro* sur des tranches striatales ou des synaptosomes striataux ont révélé que l'activation des mAChRs des terminaisons dopaminergiques augmente la libération d'ACh (Lehmann and Langer, 1982; Bonanno et al., 1985). Cependant, de nombreuses études de microdialyse *in vivo* révèlent que l'injection locale d'agonistes et d'antagonistes mAChRs peut soit augmenter, soit diminuer, soit n'avoir aucun effet sur la libération de DA (Xu et al., 1989; Westerink et al., 1990; Meltzer et al., 1994; Smolders et al., 1997; Whitehead et al., 2001). Les causes de ces données contradictoires ne sont pas encore expliquées, mais la diversité des mAChRs pourrait être, en partie, responsable. Il serait aussi plausible que la modulation muscarinique des terminaisons dopaminergiques n'apporte qu'une contribution mineure à la régulation cholinergique de l'activité striatale par rapport à la modulation nicotinique.

3. Interaction dopamine/acétylcholine

3.1. Fonctionnement physiologique

Un des facteurs importants de modulation de l'activité striatale est l'équilibre et l'interaction qui existent entre les systèmes dopaminergique et cholinergique. Cet équilibre est déterminant pour le maintien d'un contrôle moteur correct. En effet, l'activité des interneurons cholinergiques est modulée par la DA provenant de la SNc et de la VTA. L'hypothèse d'un équilibre entre DA et ACh a été proposée dans les années 1960 (Barbeau, 1962), ces deux neurotransmetteurs agissant de façon antagoniste au niveau du striatum (Di Chiara et al., 1994; Acquas and Di Chiara, 2002; Aosaki et al., 2010). Les MSNs-D1 à l'origine de la voie directe sont activés par la DA via les récepteurs dopaminergiques D1 et sont inhibés via l'action de l'ACh sur les mAChRs M4. À l'inverse, les MSNs-D2 projetant sur la voie indirecte sont inhibés par les récepteurs D2 mais activés par l'ACh via les mAChRs M1 (Pisani et al., 2007; Kreitzer, 2009; Gerfen and Surmeier, 2011; Oldenburg and Ding, 2011; Goldberg et al., 2012). Ainsi, les transmissions dopaminergique et cholinergique sont cruciales pour l'équilibre fonctionnel entre les voies directe et indirecte et, en conséquence, pour le maintien d'un contrôle moteur correct.

Le contrôle dopaminergique de la libération d'ACh dépend des récepteurs dopaminergiques exprimés sur les ChIs. Tous les ChIs expriment les récepteurs D2, tandis qu'une faible proportion d'entre eux exprime les récepteurs D1. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* montrent que la DA exerce un contrôle inhibiteur sur les ChIs via les récepteurs D2, induisant une diminution de la libération d'ACh (Lehmann and Langer, 1983; Stoof et al., 1992; Consolo et al., 1993; DeBoer and Abercrombie, 1996; Yan et al., 1997; Pisani et al., 2000; 2007; Bonsi et al., 2011). Au contraire, en l'absence de récepteurs D2, la DA agit sur les récepteurs D1 et augmente la libération d'ACh (Damsma et al., 1991; Di Chiara et al., 1994; DeBoer and Abercrombie, 1996; Steinberg et al., 1998; Acquas and Di Chiara, 1999; Pisani et al., 2007; Bonsi et al., 2011).

La libération de DA est stimulée par l'ACh via l'activation des nAChRs et mAChRs pré-synaptiques (Acquas and Di Chiara, 2002; Pisani et al., 2007; Exley and Cragg, 2008; Kreitzer, 2009; Aosaki et al., 2010; Bonsi et al., 2011; Oldenburg and Ding, 2011; Threlfell and Cragg, 2011; Goldberg

et al., 2012). Des études récentes ont montré que l'activation optogénétique des ChIs génère une libération locale de DA dans le striatum, via l'activation des nAChRs pré-synaptiques exprimés sur les terminaisons dopaminergiques (Threlfell et al., 2012; Wang et al., 2014). Cachepe et coll. ont, quant à eux, rapporté que l'effet de l'activation des ChIs sur la libération de DA n'est que partiellement médiée par l'activation de nAChRs (Cachepe et al., 2012). En effet, la combinaison des approches optogénétique et pharmacologique *in vitro* a révélé une collaboration des nAChRs (sous-unités $\beta 2^*$, * indique la présence d'autres sous-unités) et des mAChRs, en même temps qu'une activation des récepteurs AMPA du glutamate.

Des données rapportent, chez le rongeur, une expression prédominante des mAChRs dans le striatum ventral par rapport au striatum dorsal (Tayebati et al., 2004; Threlfell and Cragg, 2011). Dans le DLS, les deux types de récepteurs cholinergiques sont impliqués dans la régulation de la libération de DA, alors que dans le DMS les mAChRs ont un rôle prédominant (Gauchy et al., 1991). Cependant, dans le DLS, l'ACh peut aussi inhiber indirectement la libération de DA. Cette action s'effectue au travers du GABA et de la dynorphine, qui inhibe la libération de DA via les récepteurs GABA-A et Kappa localisés sur les terminaisons dopaminergiques (Kemel et al., 1992b; Krebs et al., 1994). Des souris *knock-out* génétiquement modifiées pour ne plus exprimer les mAChRs M1 (souris M1 KO) présentent une transmission dopaminergique exacerbée, suite à une libération accrue de DA dans le striatum (Gerber et al., 2001). Or, les terminaisons dopaminergiques au niveau du striatum n'expriment pas de mAChRs M1. Afin d'expliquer leur résultats, Gerber et coll. proposent que les MSNs présents au niveau des striosomes projetant vers la SNc pourraient inhiber l'activité des neurones dopaminergiques dans cette structure. Ainsi, l'activation par l'ACh striatale des mAChRs M1 exprimés par les MSNs facilite l'action de cette voie inhibitrice sur les neurones dopaminergiques de la SNc. Dans le cas de la délétion des mAChRs M1, l'inhibition des MSNs sur les neurones dopaminergiques de la SNc est réduite, induisant ainsi une activité de décharge plus importante et, par conséquent, une libération accrue de DA dans le striatum chez les souris M1 KO (Gerber et al., 2001). D'autres études utilisant les souris M2 KO ou les souris M4 KO suggèrent que ces mAChRs sont importants dans le contrôle moteur et qu'ils sont impliqués dans l'équilibre de l'interaction DA/ACh au niveau striatal (Gomeza et al., 1999a; 1999b; Salamone et al., 2001; Wess et al., 2007). En

effet, chez ces souris mutantes, une transmission dopaminergique exacerbée est observée. La perte de l'action inhibitrice des autorécepteurs sur la libération d'ACh induit une augmentation d'ACh striatale qui active alors les nAChRs présents sur les terminaisons dopaminergiques.

Dans le striatum, des neuropeptides tels que les tachykinines (substance P, neurokinines A et B) et les opioïdes (enképhalines et dynorphines) co-exprimés avec le GABA par les MSNs jouent également un rôle crucial dans l'équilibre de l'interaction DA/ACh striatale. Lorsqu'ils sont libérés par les collatérales des MSNs, ces peptides permettent de réguler les transmissions dopaminergiques (Di Chiara and Imperato, 1988b; Tremblay et al., 1992; Kemel et al., 1992a; Krebs et al., 1994; Dourmap et al., 1997; Li et al., 2002) et cholinergique (Arenas et al., 1991; Steinberg et al., 1998; Blanchet et al., 1998a; Jabourian et al., 2004). En effet, les MSNs-D1 expriment, comme tachykinines, la substance P, et forment des connexions synaptiques avec les ChIs. La substance P est un activateur des récepteurs NK1 exprimés par les ChIs. Ainsi, la stimulation des récepteurs NK1 induit la libération d'ACh (Lim et al., 2014). Les enképhalines, via les récepteurs opioïdes μ (MORs) localisés sur les ChIs, exercent un contrôle inhibiteur de la libération d'ACh. L'inhibition de l'ACh induite par les MORs entraînerait une libération moindre de DA au niveau striatal probablement en limitant l'activation pré-synaptique des nAChRs (Britt and McGehee, 2008).

Des enregistrements électrophysiologiques réalisés chez le singe éveillé ont montré que les TANs et les neurones dopaminergiques étaient sensibles aux stimuli prédictifs de la récompense et présentaient des réponses opposées. Il a été observé une diminution brève de la fréquence de décharge des TANs, appelée « pause », suite à l'apparition d'un stimulus conditionné qui prédit l'arrivée d'une récompense corrélée à une activité en bouffée des neurones dopaminergiques (Aosaki et al., 1994; Apicella et al., 1997; Apicella, 2002; Aosaki et al., 2010). Bien que cette pause soit également sous le contrôle d'autres systèmes de transmission, comme celui exercé par les neurones glutamatergiques issus des noyaux centromédian et parafasciculaire du thalamus, la DA semble jouer un rôle important. Effet, cette pause disparaît après déplétion en DA striatale consécutive à un traitement par le MPTP (Aosaki et al., 1994; 2010). Ces données témoignent, une fois de plus, du lien étroit qu'il existe entre les systèmes dopaminergique et cholinergique dans le striatum, en situation normale et pathologique.

3.2. Dysfonctionnement dans la maladie de Parkinson

L'utilisation d'anticholinergiques (antagonistes muscariniques) pour le traitement de la MP est la première démonstration de l'existence d'un antagonisme fonctionnel entre les systèmes dopaminergique et cholinergique dans le striatum (Duvoisin, 1967; Hornykiewicz and Kish, 1987).

Des modèles expérimentaux de la MP ont montré que la déplétion en DA striatale induit une libération accrue d'ACh dans le striatum (Pisani et al., 2007; Bonsi et al., 2011). Ce déséquilibre de l'interaction DA/ACh participerait à l'apparition des déficits moteurs de la MP (Lester et al., 2010). L'augmentation de l'ACh striatale a pendant très longtemps été attribuée à la perte de l'action inhibitrice de la DA sur les récepteurs D2 présents sur les ChIs (Maurice et al., 2004). Une autre étude électrophysiologique a également évalué l'activité des ChIs dans un modèle de déplétion dopaminergique aigue. La déplétion dopaminergique entraîne une augmentation de l'excitabilité des ChIs *in vitro* (Fino et al., 2007).

La déplétion en DA striatale est également responsable d'une réorganisation de la connectivité des ChIs sein du striatum (Salin et al., 2009). Salin et coll. ont injecté dans la SNr ou le GP un traceur rétrograde (virus de la rage) capté par les terminaisons synaptiques, ce qui leur a permis ainsi de différencier les MSNs-D1 des MSNs-D2. En situation physiologique, ils montrent que les ChIs sont connectés avec les MSNs-D1 et MSNs-D2 en proportion équivalente. En revanche, après une déplétion en DA striatale par injection de 6-OHDA dans la SNC, les ChIs innervent préférentiellement les MSNs-D2 aux dépens des MSNs-D1. Cette réorganisation, ainsi que l'activation préférentielle des mAChRs M1 exprimés par les MSNs-D2 par la libération accrue d'ACh, pourraient participer au déséquilibre des voies de sortie responsable des déficits moteurs de la MP. Il a également été montré qu'après déplétion dopaminergique les MSNs-D2 perdent leurs épines dendritiques alors que les MSNs-D1 gardent une morphologie semblable à celle observée dans des conditions physiologiques (Day et al., 2006). Cependant, les MSNs-D2 sont hyperactifs (Mallet et al., 2006), ce qui laisse penser que la perte des épines dendritiques pourrait être un mécanisme de compensation qui tendrait à réduire l'hyperactivité des MSNs-D2 (Day et al., 2008).

Dans une étude électrophysiologique *in vitro*, Parker et coll. montrent que la déplétion dopaminergique par injection de 6-OHDA affaiblit la voie thalamo-striatale, et plus particulièrement les projections glutamatergiques dirigées sélectivement vers les MSNs-D1, mais n'affecte pas les afférences cortico-striatales vers ces neurones (Parker et al., 2016). En condition physiologique, la voie thalamo-striatale projette préférentiellement vers les MSNs-D1. Après déplétion dopaminergique, ils montrent une réorganisation de la connectivité de la voie thalamo-striatale vers les MSNs-D2 aux dépens des MSNs-D1, concordant avec l'hyperactivité de la voie indirecte observée après déplétion dopaminergique. Ces données très récentes suggèrent, qu'en condition pathologique, le thalamus serait responsable d'une activation asymétrique du circuit des ganglions de la base et semble ainsi jouer un rôle clé dans les mécanismes sous-tendant l'apparition des symptômes moteurs (Tritsch and Carter, 2016).

La suppression de la transmission dopaminergique induit également des modifications de l'expression de certains peptides (tachykinines, opioïdes) et, en conséquence, de la transmission cholinergique striatale, ce qui induit un déséquilibre de l'interaction DA/ACh. Dans le cas d'une lésion dopaminergique induite par la 6-OHDA chez le rat, les tachykinines entraînent une augmentation de la transmission cholinergique dans les territoires sensorimoteur (Kemel et al., 2002) et limbique (Pérez et al., 2007) du striatum. De plus, en l'absence de transmission dopaminergique, les enképhalines via les récepteurs opioïdes μ (MORs) localisés sur les ChIs exercent une inhibition de libération d'ACh au niveau des régions limbiques du striatum (Jabourian et al., 2005; 2007). Ainsi, l'altération de la régulation de la transmission cholinergique, via les enképhalines et les MORs, jouerait un rôle dans les déficits motivationnels et cognitifs associés à la déplétion dopaminergique.

4. Rôle de l'acétylcholine striatale

4.1. Rôle de l'acétylcholine striatale dans les processus cognitifs

Des études rapportent que l'ACh striatale joue un rôle crucial dans les processus mnésiques associatifs (Apicella, 2002), motivationnels (Witten et al., 2010), attentionnels (Shapovalova, 1999) mais aussi dans la flexibilité comportementale (Ragozzino et al., 2002; 2009; Okada et al., 2014).

Lors d'expériences d'apprentissage conditionné chez le singe éveillé, les TANs (correspondant aux ChIs) diminuent phasiquement leur activité à la réception d'un stimulus prédicteur d'une récompense (Apicella et al., 1998; Apicella, 2002), suggérant qu'une diminution de l'activité cholinergique striatale (pause des TANs) est impliquée dans l'apprentissage par renforcement positif chez le singe. Cependant, chez le rongeur, il a été montré qu'un déficit en ACh striatale après lésion des ChIs par immunotoxine perturbe les processus d'apprentissage procéduraux liés à une récompense (Kitabatake et al., 2003). Morris et coll. proposent que l'ACh et la DA au sein du striatum participent aux processus d'apprentissage de façon coopérative: le signal cholinergique informerait les autres structures des GB « quand » apprendre, le signal dopaminergique « comment apprendre » et enfin, l'activité cortico-striatale définirait « quoi » apprendre (Morris et al., 2004). Une lésion des neurones glutamatergiques de la voie thalamo-striatale – voie issue du noyau parafasciculaire du thalamus et qui projette majoritairement vers les ChIs du striatum dorsal – entraîne une diminution de l'activité des ChIs qui s'accompagne de déficits d'acquisition d'apprentissages nouveaux chez le rongeur (Bradfield et al., 2013).

Les ChIs du striatum ventral (noyau accumbens) jouent également un rôle dans les processus motivationnels. Il a été montré que l'inactivation optogénétique des ChIs striataux chez le rongeur, altère leur capacité à associer un stimulus (une drogue renforçante, la cocaïne) à un environnement donné dans des expériences de préférence de place conditionnée (Witten et al., 2010).

Les données sont plus controversées et bien moins claires concernant l'implication des ChIs dans le processus de flexibilité comportementale. En effet, Ragozzino et coll. ont montré que, chez le rongeur, la libération d'ACh au niveau du striatum dorsal est indispensable à la réalisation d'une tâche d'apprentissage inversé appelée également « reversal learning » qui mesure la capacité des animaux à changer leur comportement en réponse à l'inversion d'une règle qu'ils avaient auparavant apprise (Ragozzino, 2003). Le blocage pharmacologique par (1) la scopolamine, un antagoniste non-sélectif des mAChRs (Ragozzino et al., 2002) ou (2) la pirenzepine, un antagoniste sélectif des mAChRs M1 (Tzavos et al., 2004), s'accompagnent d'une altération de la flexibilité comportementale. Une autre étude montre des effets opposés dans la même tâche comportementale après lésion des ChIs par une immunotoxine, et suggère à l'inverse que les ChIs striataux inhibent la flexibilité principalement en agissant sur les mAChRs M4 (Okada et al., 2014).

4.2. Rôle de l'acétylcholine striatale dans les déficits non-moteurs

La présence de symptômes non-moteurs dans la MP tels que les déficits neuropsychiatriques, cognitifs et émotionnels a fait l'objet de recherches récentes tant en clinique qu'au niveau expérimental chez l'animal. Des déficits cognitifs, notamment des déficits des fonctions exécutives (altérations de la planification, de la programmation et de l'exécution d'un comportement orienté vers un but) et de la flexibilité cognitive (altérations de l'adaptation d'un comportement aux modifications de l'environnement), ont été mis en évidence chez les patients parkinsoniens (Lees and Smith, 1983; Brown and Marsden, 1990; Green et al., 2002; Caballol et al., 2007; Bohnen and Albin, 2011; Liu et al., 2012; Ransmayr, 2015; Aarsland, 2016). La mémoire est également affectée, notamment la mémoire de travail, la mémoire épisodique et la mémoire procédurale (Dujardin and Laurent, 2003). Les processus attentionnels le sont aussi (Ballard et al., 2002). Trois caractéristiques pathologiques peuvent expliquer les déficits cognitifs observés dans la MP : la dégénérescence (1) de la voie dopaminergique nigrostriatale, (2) de la voie dopaminergique mésocorticale et (3) de la voie dopaminergique mésolimbique, dégénérescence associée à la présence de corps de Lewy.

Si beaucoup d'études rapportent le rôle physiologique de l'ACh striatale dans les processus mnésiques, motivationnels et la flexibilité comportementale, en revanche peu d'études se sont intéressées au rôle de l'ACh striatale dans les processus cognitifs qui sont altérés dans la MP. En effet, les altérations de la transmission cholinergique corticale sont largement décrites dans la pathologie, notamment la réduction de l'activité de l'AChE et celle de l'expression des nAChRs et de certains sous-types de mAChRs, comme les mAChRs M2 (Dubois et al., 1987; Brown and Marsden, 1990; Aubert et al., 1992; Lang and Lozano, 1998; Caballol et al., 2007; Bohnen and Albin, 2011; Müller and Bohnen, 2013), la transmission cholinergique striatale est, quant à elle, peu étudiée.

Les activités cholinergiques au niveau cortical et sous-cortical semblent opposées, d'un côté, une « hypocholinergie » corticale liée à la dégénérescence des neurones cholinergiques issus du noyau basal de Meynert projetant vers l'hippocampe, l'amygdale et le cortex cérébral (Bohnen and Albin, 2011; Müller and Bohnen, 2013) et, de l'autre, à une « hypercholinergie » striatale, les ChIs semblent être épargnés dans la MP (Pisani et al., 2007; Bonsi et al., 2011). Dans une étude autoradiographique

post-mortem de cerveaux de patients parkinsoniens, Rodriguez-Puertas et coll. montrent une augmentation de la fixation du [³H]Hemicholinium-3, un marqueur présentant une forte affinité pour le transporteur de la choline (l'ACh est synthétisée dans les terminaisons axonales à partir de la choline et de l'acétyl-coenzyme A) dans le striatum de patients parkinsoniens (+59% dans le noyau caudé et +145% dans le putamen) comparativement aux sujets sains (Rodríguez-Puertas et al., 1994).

L'hypothèse classique de la réduction dopaminergique causant une hyperactivité et/ou une hyperexcitabilité des ChIs striataux permet d'expliquer l'efficacité des antagonistes muscariniques sur la symptomatologie motrice de la MP (Katzenschlager et al., 2003; Clarke, 2004; Langmead et al., 2008; Ferreira et al., 2013). Néanmoins, elle n'explique pas les troubles cognitifs observés chez les patients lorsqu'ils sont traités par des antagonistes muscariniques (Langmead et al., 2008) et l'amélioration de leur performances cognitives (fonctions exécutives, mnésiques, visuo-spatiales) lorsqu'ils sont traités par des inhibiteurs de l'AChE tel que le donépézil (Aarsland et al., 2002; Caballol et al., 2007). L'ensemble de ces données semble suggère une action coopérative, plutôt qu'antagoniste, des systèmes dopaminergique et cholinergique striataux dans les processus cognitifs.

La potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD) sont deux formes de plasticité synaptique, décrites comme les supports cellulaires des processus d'apprentissage, de mémorisation et de récupération de l'information neuronale. Initialement découvertes dans l'hippocampe (LTP) et le cervelet (LTD), elles sont aussi observées dans le striatum au niveau des synapses cortico-striatales où elles sous-tendent l'apprentissage des habiletés motrices et des performances cognitives (Calabresi et al., 1996). La DA et l'ACh sont essentielles aux mécanismes de plasticité synaptique dans le striatum. L'activation des récepteurs dopaminergiques et des récepteurs cholinergiques nAChRs et mAChRs (sous-types M1 et M2) peut induire une LTP ou une LTD au niveau des synapses cortico-striatales (Calabresi et al., 2006). L'induction de la LTP par la DA endogène requiert l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 exprimés par les MSNs (Calabresi et al., 2000b) ou par les ChIs (Suzuki et al., 2001). Cette induction est inhibée après déplétion dopaminergique induite par une injection de 6-OHDA dans la SNc (Centonze et al., 1999). L'induction de la LTD nécessite, quant à elle, la co-activation des récepteurs D1 et D2 (Calabresi et al., 1992). L'ACh joue également un rôle crucial dans ces mécanismes ; l'induction de la LTP

requiert l'activation des mAChRs M1 (Calabresi et al., 1999) alors que les mAChRs M2 l'inhibent (Calabresi et al., 1998b).

Les modifications de l'interaction DA/ACh dans la MP altèrent la plasticité synaptique et conduiraient à l'apparition de déficits cognitifs. Ainsi, une étude très récente montre que la surexpression de l' α -synucléine (par injection d'AAV contenant la forme sauvage de l' α -synucléine humaine dans la substance noire) induit une réduction partielle des taux de DA striatale, ce qui bloque sélectivement l'induction de la LTP dans les ChIs striataux. Les animaux présentent alors des altérations de leurs capacités mnésiques dans un test opérant d'évitement actif (« Two-way active avoidance test ») (Tozzi et al., 2016). Ce test évalue la capacité des animaux à associer un signal lumineux à un choc électrique dans un compartiment spécifique de l'enceinte, et leur capacité à développer une stratégie comportementale pour éviter la délivrance de ce choc en se déplaçant dans un autre compartiment.

Calabresi et coll. ont proposé un modèle de convergence pour expliquer les déficits cognitifs associés à la MP (Calabresi et al., 2006) (**Figure 23**). Les altérations des mécanismes de plasticité synaptique pourraient être dus au déséquilibre de l'interaction DA/ACh mais aussi à la perte des autres systèmes monoaminergiques (sérotonine et noradrénaline), particulièrement lorsque que ces systèmes monoaminergiques peuvent directement affecter la libération de DA et d'ACh (Ventura et al., 2003; Bortolozzi et al., 2005). Les systèmes sérotoninergiques et noradrénergiques sont retrouvés altérés dans la MP et pourraient également expliquer les déficits neuropsychiatriques (anxiété, dépression, apathie, etc.) que l'on observe avec les déficits cognitifs .

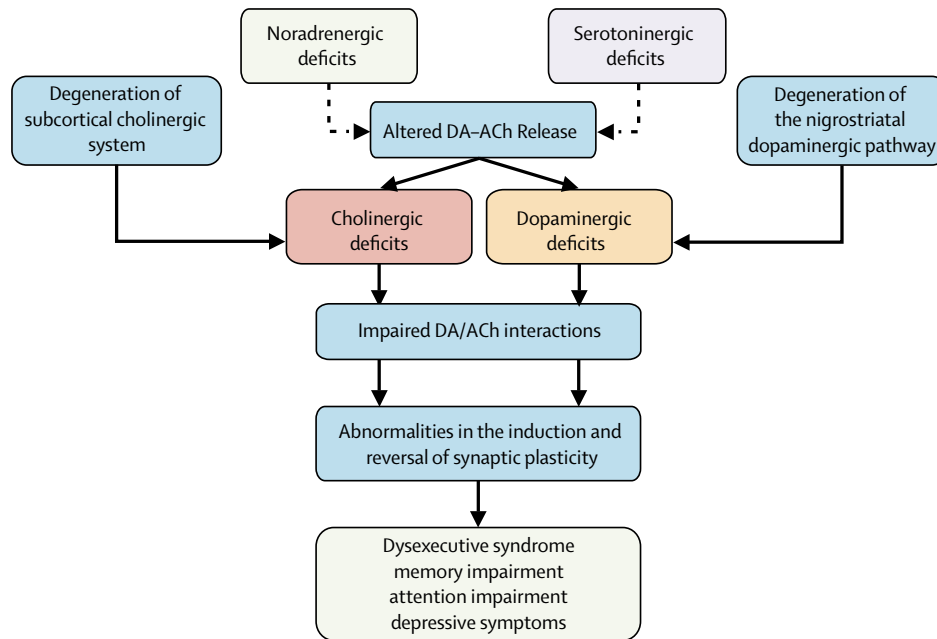


Figure 23 : Modèle de convergence

Calabresi et coll. proposent un modèle de convergence pour expliquer les déficits cognitifs associés à la maladie. Les déficits de dopamine (DA) et d'acétylcholine (ACh), causés par la dégénérescence du système dopaminergique nigrostriatal et du système cholinergique cortical, entraînent des altérations de la plasticité synaptique et des dysfonctionnements cognitifs. La dégénérescence concomitante d'autres systèmes monoaminergiques (sérotoninergiques et noradrénergiques) peut directement affecter la libération de DA et d'ACh. D'après Calabresi et al., 2006.

MÉTHODOLOGIE

Méthodologie

1. Optogénétique

L'optogénétique, développée dans les années 2000, a rapidement suscité un vif intérêt dans le domaine des Neurosciences. Cette technique permet, en combinant à la fois l'optique et la génétique, de moduler de manière sélective l'activité d'un type cellulaire ciblé avec une excellente résolution spatio-temporelle (Boyden et al., 2005), ce qui était impossible auparavant avec les approches classiques lésionnelles, de stimulation électrique et/ou de pharmacologie ([Figure 24A](#)).

1.1. Principe et fonctionnement

Le principe de l'optogénétique repose sur l'utilisation d'opsines, protéines ayant la propriété d'être photoactivables par la lumière à une longueur d'onde donnée. La première opsine a été découverte en 1971 dans une archéobactérie *Halobacterium halobium* (Oesterhelt and Stoeckenius, 1971). Elle a été suivie par la découverte de l'halorhodopsine (**eNpHR**, issue de l'archéobactérie *Natronomonas pharaonis*) en 1977 (Matsuno-Yagi and Mukohata, 1977) et de la channelrhodopsine-2 (**ChR2**, issue de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*) en 2002 (Nagel et al., 2002). La première utilisation de l'optogénétique dans des neurones de mammifères, chez le rongeur, revient au groupe de Gero Miesenböck qui, à la suite de plusieurs manipulations génétiques, est parvenu à induire une dépolarisation par une stimulation lumineuse entraînant une décharge de potentiels d'action (Zemelman et al., 2002). Cependant, la triple transfection utilisée par ces derniers rendait l'utilisation de cette technique très complexe et peu reproductible. La poursuite de l'utilisation d'opsines par le groupe de Karl Deisseroth, à l'Université de Stanford en 2005, a permis l'essor de l'approche optogénétique (Boyden et al., 2005; Deisseroth et al., 2006; Deisseroth, 2011).

L'utilisation de la ChR2 ou de l'eNpHR permet de moduler l'activité d'une population neuronale cible en réponse à des stimulations lumineuses à différentes longueurs d'ondes. La ChR2 est un canal cationique perméable aux ions Na^+ et Ca^{2+} lorsqu'elle est stimulée par un laser bleu à

473 nm, tandis que l'eNpHR est une pompe qui permet l'entrée d'ions Cl^- lorsqu'elle est stimulée par un laser jaune à 589 nm (Zhang et al., 2007; Pastrana, 2010; Zhang et al., 2010) (Figure 24B). Ainsi, lorsqu'elles sont photostimulées aux longueurs d'ondes spécifiques, ces opsines permettent de dépolariser ou hyperpolariser, respectivement, les neurones qui les expriment. L'approche optogénétique a depuis été affinée par la découverte de larges gammes d'opsines aux propriétés spectrales et perméabilité variées (Fenno et al., 2011).

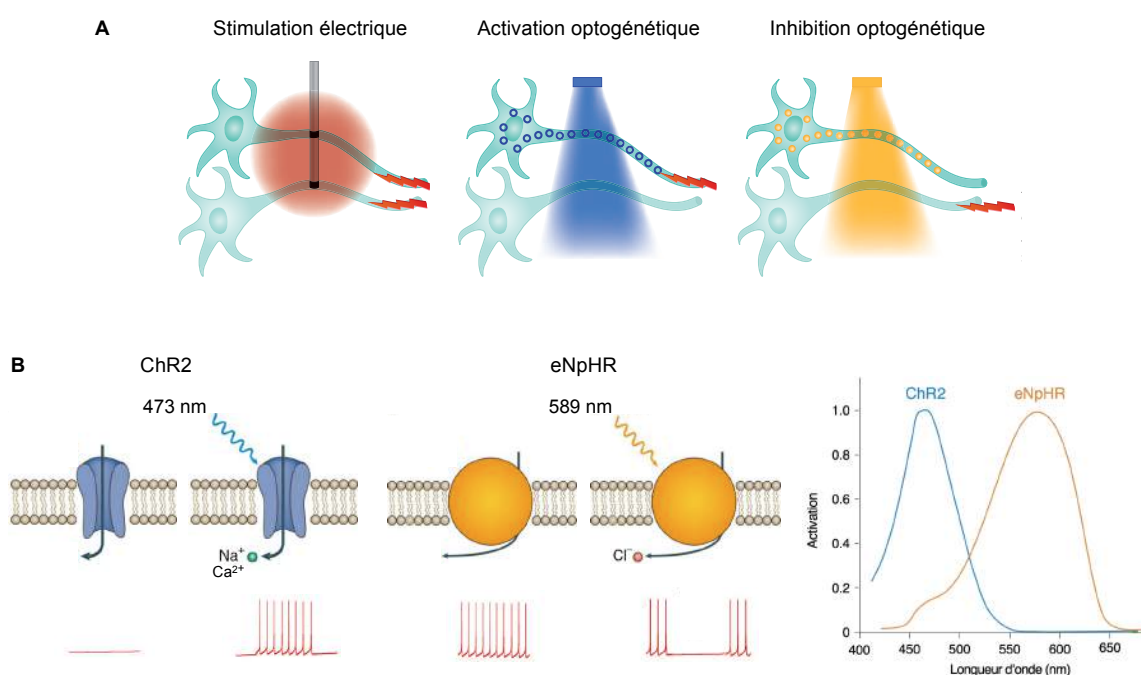


Figure 24 : Principe de l'optogénétique

A. Contrairement à la stimulation électrique qui n'est pas spécifique d'un type neuronal, l'optogénétique utilise des outils génétiques qui permettent l'expression de protéines photoactivables à la lumière (opsines) par les neurones ciblés. Grâce à la stimulation lumineuse, l'optogénétique permet de contrôler l'activité électrique d'une seule population neuronale (ici, une lumière bleue les photoactive et une lumière jaune les photoinhibe). La présence de l'éclair rouge signifie que le neurone est actif. D'après (Deisseroth, 2011). B. Schéma des deux opsines, channelrhodopsine-2 (ChR2) et halorhodopsine (eNpHR). La ChR2 est un canal cationique perméable aux ions Na^+ et Ca^{2+} . L'eNpHR est une pompe qui permet l'entrée des ions Cl^- lorsqu'elle est stimulée par un laser jaune à 589 nm. L'activation de la ChR2 par la lumière bleue (473 nm) dépolarise le neurone alors que l'activation de l'eNpHR par la lumière jaune (589 nm) l'hyperpolarise. Modifiée d'après Zhang et al., 2010.

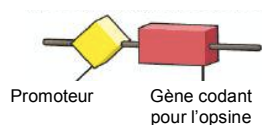
L'expression des opsines au sein d'un type neuronal ciblé peut s'effectuer grâce à deux stratégies. La première stratégie consiste à utiliser un vecteur viral, par exemple un virus adéno-associé (AAV), dans lequel l'opsine est encodée sous le contrôle d'un promoteur fort et ubiquitaire (Deisseroth et al., 2006; Zhang et al., 2006; Adamantidis et al., 2007; Aravanis et al., 2007). L'intégration de ces vecteurs dans le génome de neurones permet une forte expression de la construction. L'utilisation des systèmes Cre-lox permet de réduire l'expression de l'opsine à un type cellulaire spécifique (Zhang et al., 2010). La seconde stratégie consiste à générer une souris transgénique qui permettra l'insertion de la construction de l'opsine dans le génome de l'animal sous le contrôle d'un promoteur spécifique du type cellulaire ciblé (Arenkiel et al., 2007; Wang et al., 2007). Chacune de ces deux stratégies comportent aussi bien des avantages que des inconvénients.

L'approche virale est rapidement mise en place (environ un mois) et permet une plus grande liberté d'adaptation que l'approche transgénique. Néanmoins, l'expression de l'opsine dépend des paramètres expérimentaux tels que de la quantité de virus administré ou le site de l'injection stéréotaxique. Dans ces conditions, la reproductibilité des expériences utilisant des injections virales peut s'avérer être techniquement difficile.

La construction d'une lignée de souris transgéniques est complexe et plus lente à mettre en place (environ un an). Le niveau d'expression de l'opsine sous contrôle d'un promoteur spécifique peut s'avérer trop faible pour permettre une stimulation lumineuse de neurones cibles. Cependant, une fois la lignée de souris stabilisée, la distribution spatiale des neurones exprimant l'opsine est semblable entre les animaux, permettant ainsi une excellente reproductibilité des conditions expérimentales.

Les différentes étapes de l'approche optogénétique sont résumées dans la figure suivante (**Figure 25**). L'optogénétique permet un contrôle temporel fin et spécifique d'un type cellulaire et de l'impact de sa modulation à différents niveaux d'étude (cellule, synapse, réseau de neurones, comportement). De plus, l'effet réversible de cette approche facilite son utilisation aussi bien pour des études électrophysiologiques *in vitro* que pour des tests comportementaux *in vivo* chez l'animal éveillé.

Etape 1 – Construction du plasmide contenant l'opsine



Etape 2 – Insertion de la construction dans un virus



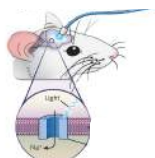
Etape 3 – Injection virale dans la structure d'intérêt



Etape 4 – Insertion de fibres optiques au niveau de la région cible



Etape 5 – Photostimulation de l'opsine exprimée par un laser



Etape 6 – Caractérisations comportementales



Figure 25 : Etapes de l'optogénétique

Illustration des principales étapes nécessaires à la mise en place de la technique d'optogénétique dans le cas de l'approche virale. L'approche utilisant des lignées de souris transgéniques exprimant l'opsine dans le génome de l'animal sous le contrôle d'un promoteur spécifique du type neuronal ciblé, permet en revanche de s'affranchir des 3 premières étapes. Dans ce cas, lors de la chirurgie, les souris ne subiront que l'insertion de fibres optiques au niveau de la région cérébrale ciblée. Modifié d'après Buchen, 2010.

1.2. Mise en place de la technique

Le choix de l'optogénétique dans notre étude a été motivé par le fait que cette approche nous offrait l'opportunité de moduler l'activité des ChIs, qui représentent seulement 1-2% de la population neuronale du striatum, avec une résolution spatio-temporelle très précise et d'en mesurer les conséquences électrophysiologiques et comportementales. Contrairement aux études consistant à effectuer des ablations sélectives des ChIs striataux par la toxine diphtérique (Won et al., 2014) ou bien par immunotoxine (Kaneko et al., 2000; Hikida et al., 2001), l'approche optogénétique nous a permis d'inhiber mais aussi d'activer les ChIs striataux de manière réversible.

1.2.1. Approche virale

Les vecteurs viraux, AAV contenant les opsines encodées sous le contrôle de promoteurs (ChR2: pAAV-Ef1a-DIO-hChR2(H134R)-mCherry et eNpHR: pAAV-Ef1a-DIO-eNpHR3.0-EYFP), nous ont gracieusement été donné par le laboratoire de Karl Deisseroth (Université de Stanford, USA). La protéine fluorescente EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) a été remplacée par la protéine fluorescente RFP (Red Fluorescent Protein). Cette manipulation a été effectuée par le groupe de L. Kerkerian-Le Goff à l'IBDM.

Les différentes constructions utilisées sont présentées dans la [Figure 26](#). Elles contiennent soit le gène de la ChR2 associé à la protéine fluorescente mCherry, soit le gène l'eNpHR associé à la protéine fluorescente RFP, afin que l'expression des gènes soit détectable par microscopie à fluorescence. Ces constructions, flanquées par deux sites de reconnaissance lox (loxP et lox 2277), sont insérées dans le sens inverse de lecture, ce qui empêche leur transcription. L'expression des transgènes n'est possible qu'en présence de la Cre recombinase qui agit sur les sites lox et permet de remettre le transgène dans le sens de lecture et induire sa transcription. Les transgènes sont également placés sous le contrôle de promoteurs (EF-1 α et WPRE) qui permettent d'augmenter leur expression génique. Ainsi, quatre types de constructions sont utilisés dans nos expériences, deux constructions contenant les opsines associées aux protéines fluorescentes et deux constructions contenant uniquement les protéines fluorescentes servant, de ce fait, de contrôles.

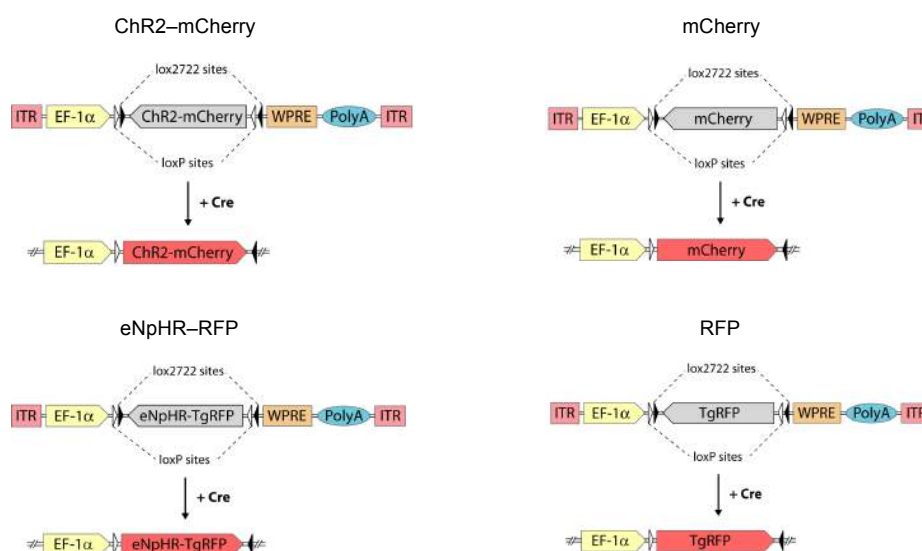


Figure 26 : Approche virale

Schéma des quatre constructions utilisées dans nos travaux. **ChR2-mCherry** : plasmide contenant le gène de la channelrhodopsine (ChR2) associé à la protéine fluorescente mCherry; **mCherry** : plasmide contrôle contenant uniquement la mCherry; **eNpHR-RFP** : plasmide contenant le gène de l'halorhodopsine (eNpHR) associé à la protéine fluorescente RFP ; **RFP** : plasmide contrôle contenant uniquement la RFP. Les constructions, flanquées par deux sites loxP et lox 2277, sont insérées dans le sens inverse de lecture. L'expression des transgènes n'est possible qu'en présence de la Cre recombinase qui agit sur les sites lox et permet de remettre le transgène dans le sens de lecture pour induire sa transcription. EF-1 α et WPRE sont des promoteurs qui permettent d'augmenter l'expression génique.

L'AAV est administré par injection stéréotaxique dans le striatum dorsal lors des chirurgies. Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale (10 ml/kg, i.p.) d'une solution de kétamine (100 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg) puis placées dans un appareil stéréotaxique (David Kopf Instruments). Un volume de 1 μ l d'AAV, contenant l'une des quatre constructions virales précédemment décrites, est injecté au niveau de deux sites dorso-ventraux, aux coordonnées suivantes : +1.0 mm AP, $\pm$ 1.5 mm ML, -3.4 et -3.0 mm DV, d'après l'atlas stéréotaxique de souris (Paxinos and Franklin, 2001), à l'aide d'un injecteur (33 gauge, Plastics One) relié à une micropompe (CMA/Microdialysis) permettant une perfusion à un débit régulier de 0.3 μ l/min. L'administration d'AAV est effectué sur des souris transgéniques *knock-in* C57BL/6 exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de la ChAT (« souris ChAT^{cre/cre} » ou souris *knock-in* ChAT-IRES-Cre, The Jackson Laboratory, USA). Ainsi, la transfection virale conduit à l'expression des opsines ChR2 ou eNpHR spécifiquement dans les ChIs du striatum dorsal.

1.2.2. Approche transgénique

Afin de générer des souris transgéniques exprimant l'opsine eNpHR exclusivement dans les neurones cholinergiques, des croisements ont été effectués dans notre laboratoire entre les souris ChAT^{cre/cre} et une nouvelle souche de souris transgéniques Ai39 (souris LoxP-stop-eNpHR3.0-EYFP, The Jackson Laboratory, USA) ([Figure 27](#)).

Les souris Ai39 expriment l'eNpHR, fusionnée au gène codant pour la protéine fluorescente EYFP, et intégrée au niveau du locus ubiquitaire Gt(ROSA)26Sor. L'expression de l'eNpHR n'est possible qu'après excision d'une séquence STOP par la Cre recombinase, qui permet de remettre le transgène dans le sens de lecture et d'induire ainsi la transcription de l'opsine. En croisant les souris Ai39 avec les souris ChAT^{cre/cre} c'est-à-dire exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de la ChAT, la lignée de souris descendantes (appelée dans nos travaux « souris transgéniques eNpHR ») exprime l'opsine eNpHR associée à l'EYFP spécifiquement dans les neurones cholinergiques. À l'inverse de l'approche virale dont l'expression est restreinte au striatum dorsal, l'approche transgénique permet une expression de l'opsine dans tous les neurones cholinergiques du cerveau de ces souris transgéniques.

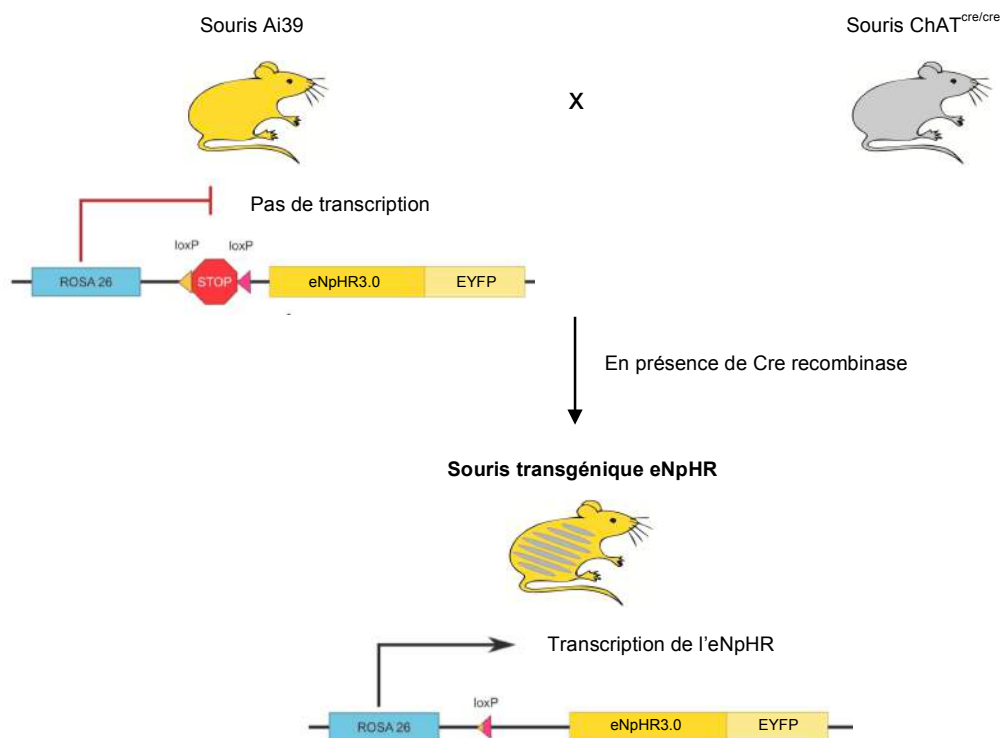


Figure 27 : Approche transgénique

Les souris Ai39 (jaune) expriment l'eNpHR fusionnée au gène codant pour la protéine fluorescente EYFP, intégré au niveau du locus ubiquitaire Gt(ROSA)26Sor. Les souris Ai39 sont ensuite croisées avec les souris Chat^{cre/cre} c'est-à-dire exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de la ChAT (grise). L'expression de l'eNpHR, n'est possible qu'après excision d'une séquence STOP par la Cre recombinase et qui permet de remettre le transgène dans le sens de lecture pour induire sa transcription : la lignée de souris descendantes exprime alors l'eNpHR spécifiquement dans les neurones cholinergiques.

Pour ces deux approches, l'efficacité de la stratégie d'expression des opsines dans les ChIs du striatum a été validée par Corinne Beurrier et Nicolas Maurice à l'IBDM, en électrophysiologie *in vitro* par une approche en patch-clamp sur tranches striatales exprimant les opsines et *in vivo* chez la souris anesthésiée (Cf. Article 1).

La **Figure 28** montre en immunofluorescence la co-expression de l'opsine eNpHR et de la ChAT, en immunofluorescence que ce soit dans le cas de l'utilisation de l'approche virale ou de l'approche transgénique, indiquant une spécificité similaire des deux approches dans nos études.

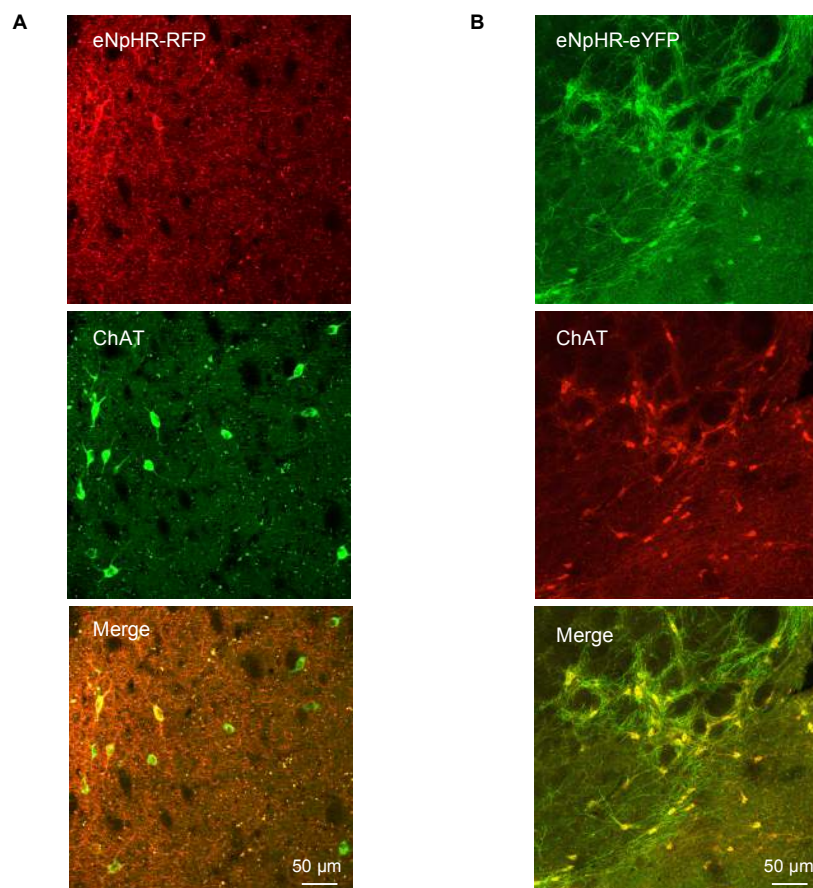


Figure 28 : Spécificité de l'expression de l'halorhodopsine

A. Approche virale. La localisation de l'immunomarquage de la ChAT, enzyme de synthèse de l'ACh (vert) est comparée à la fluorescence de la RFP (couplée à l'halorhodopsine eNpHR) (rouge). **B.** Approche transgénique. La localisation de l'immunomarquage la ChAT (rouge) est comparée à la fluorescence de l'EYFP (couplée à l'eNpHR) (vert). Dans les deux cas, la co-localisation de la ChAT et des marquages RFP ou EYFP donne un marquage jaune. Les immunomarquages sont effectués sur des coupes frontales striatales et observées à un objectif x20 (microscope Zeiss Imager).

1.2.3. Implantation des fibres optiques

Lors des chirurgies, des fibres optiques en verre appelées aussi ferrules (diamètre : 200 µm, longueur : 3 mm, Doric Lenses) sont implantées à demeure :

- **unilatéralement** (modèle de lésion 6-OHDA unilatérale totale) ou **bilatéralement** (modèle pharmacologique à l'halopéridol) dans le striatum dorsal aux coordonnées stéréotaxiques suivantes : +1.0 mm AP, ±1.5 mm ML, -2.8 mm DV, d'après l'atlas stéréotaxique de souris (Paxinos and Franklin, 2001), de souris ChAT^{cre/cre} ayant reçu les différentes transfections virales.
- **bilatéralement** (modèle de lésion 6-OHDA bilatérale partielle) dans le striatum dorsal aux

coordonnées stéréotaxiques suivantes : +0.5 mm AP, $\pm$ 1.5 mm ML, -2.8 mm DV, d'après l'atlas stéréotaxique de souris (Paxinos and Franklin, 2001), de souris transgéniques eNpHR.

Une colle dentaire (Super-bond, Phymep) recouverte de ciment dentaire permet de fixer solidement les fibres optiques à la surface du crâne.

1.2.4. Conditions de stimulation

Lors des tests comportementaux effectués chez la souris éveillée, les ferrules préalablement implantées dans le striatum sont reliées à des fibres plus longues (50-150 cm), elles-mêmes reliées à un dispositif rotatoire (Rotary joint, Doric Lenses) afin d'éviter que les fibres ne s'enroulent entre elles lorsque l'animal est en mouvement. Enfin, le dispositif est connecté à un laser permettant de délivrer les deux longueurs d'onde (473 nm pour le bleu et 589 nm pour le jaune) (Combined Dual Wavelength DPSS Laser System, Laserglow). Avant chaque stimulation, la puissance d'illumination à la sortie des fibres est mesurée par un puissance-mètre (Thorlabs).

Les conditions de stimulation ont été définies d'après le modèle, développé par le laboratoire de Deisseroth, basé sur des mesures directes prédisant les valeurs d'irradiance ou d'éclairement dans le tissu cérébral de mammifères (<http://www.stanford.edu/group/dlab/cgi-bin/graph/chart.php>). La stimulation par le laser bleu (473 nm, 118.5 mW) est réalisée à une fréquence de 10 Hz (10 pulses par seconde, chaque pulse durant 25 ms) de façon à se rapprocher de la fréquence de décharge spontanée des ChIs. La stimulation par le laser jaune (589 nm, 75.2 mW) est réalisée en continu afin d'inhiber l'activité tonique spontanée des ChIs. Les conditions de stimulation tiennent également compte de l'atténuation de la diffusion lorsque la lumière traverse le tissu cérébral. En effet, une perte de 90 à 95% de la puissance lumineuse émise à l'extrémité des fibres optiques est observée lorsque la lumière traverse une épaisseur de tissu d'environ 0.5 mm pour atteindre la structure cible (Tye et al., 2011). L'intensité lumineuse restante à 0.2 mm de la pointe de la ferrule, dans nos conditions expérimentales, a été évaluée à : 11.3 mW/mm² pour la stimulation bleue et 20.0 mW/mm² pour la stimulation jaune, ce qui correspond à 200 mW/mm² and 140 mW/mm² respectivement pour le laser bleu et jaune, en sortie à la pointe de la ferrule.

Enfin, les durées de stimulation diffèrent selon les tests comportementaux effectués (variant de quelques secondes à 10 minutes) et sont détaillées plus précisément dans la partie « matériels et méthodes » de chacune de nos études.

2. Lésion 6-OHDA

2.1. Animaux

Les animaux mâles et femelles utilisés sont âgés d'environ 8-10 semaines et ont un poids moyen de 20-25 g. Ils sont maintenus en groupe de 4-5 dans des cages avec accès à volonté à l'eau et à la nourriture, dans un local aux conditions contrôlées (température à 24°C, cycle jour nuit 12/12h), conformément aux réglementations en vigueur (Directive du Conseil européen 2010/63/UE). Les protocoles expérimentaux, réalisés de façon à limiter au maximum le stress et la souffrance des animaux, ont été validés par le comité national d'éthique (Autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques, agrément 00196.01).

Les lésions dopaminergiques sont réalisées sur différentes lignées de souris :

- pour les expérimentations en optogénétique, soit chez des souris C57BL/6 ChAT^{cre/cre} ayant reçu les différentes transfections virales, soit chez des souris transgéniques eNpHR
- pour les expérimentations pharmacologiques, soit chez des souris C57BL/6 *wild-type* (Charles River, France), soit chez des souris *knock-out* génétiquement modifiées n'exprimant pas de récepteurs post-synaptiques M4 spécifiquement sur les MSNs-D1 de la voie directe appelées souris D1-M4-KO (ou leurs souris contrôles issues de la même portée) (collaboration avec Jürgen Wess, National Institutes of Health Bethesda, USA).

2.2. Chirurgie

Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale (10 ml/kg, i.p.) au moyen d'une solution de kétamine (100 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg) puis placées dans un appareil stéréotaxique. La 6-OHDA (6-hydroxydopamine hydrochloride, Tocris Bioscience) est dissoute dans une solution contenant de l'acide ascorbique à 0,02% dans du NaCl 0.9% (l'acide ascorbique a pour but de réduire l'oxydation de la 6-OHDA) et est gardée à 4°C à l'abri de la lumière. La solution de

6-OHDA (ou son solvant pour les souris contrôles) est administrée à l'aide d'un injecteur (33 gauge, Plastics One) relié à une micropompe permettant une injection à un débit régulier de 0.3 µl/min.

Dans le cas de la lésion unilatérale totale, les souris reçoivent une injection unilatérale de 1.5 µl de 6-OHDA à 2.7 µg/µl, au niveau de la SNc : -3.0 mm AP, ±1.3 mm ML, -4.5 mm DV.

Dans le cas de la lésion bilatérale partielle, les souris reçoivent une injection bilatérale de 1.0 µl de 6-OHDA à 4.0 µg/µl, au niveau du striatum dorsal : +1.0 mm AP, ±1.5 mm ML, -3.2 mm DV.

Après la chirurgie, les souris sont placées dans une salle de post-chirurgie afin de surveiller l'évolution de leur état général (prostration, apathie, agitation, poils plus ou moins toilettés, porphyrine autour des yeux). Des soins post-opératoires comprenant du glucose 5% (10 ml/kg), un anti-inflammatoire non-stéroïdien (Carpofène, Rimadyl®, 5 mg/kg), un antalgique (Buprénorphine, Temgesic®, 0.05 mg/kg) sont injectés en sous-cutané, une fois par jour pendant 3 jours. En cas de besoin, un antibiotique à large spectre (Enrofloxacin, Baytril®, 5 mg/kg) peut être rajouté. Les soins post-opératoires prodigués nous ont permis de réduire considérablement la mortalité. Ainsi, on note environ 20-25% de mortalité dans le modèle de lésion unilatérale totale et 5-15% de mortalité dans le modèle de lésion bilatérale partielle.

3. Tests comportementaux

3.1. Tests moteurs

Les conséquences de la modulation des ChIs par stimulation optogénétique et des mAChRs M1 et M4 par traitement pharmacologique ont été évaluées dans différents tests moteurs sur deux modèles expérimentaux de la MP, le modèle pharmacologique (catalepsie induite par halopéridol, antagoniste des récepteurs dopaminergiques D2 et dans une moindre mesure des récepteurs D1) et le modèle de lésion unilatérale à la 6-OHDA injectée au niveau de la SNc.

3.1.1. Catalepsie

La catalepsie induite par une injection intrapéritonéale d'halopéridol (0,25 mg/kg, i.p.), antagoniste des récepteurs dopaminergiques D2 (et dans une moindre mesure des récepteurs D1), s'apparente à une akinésie parkinsonienne. Le test de la catalepsie est basé sur le fait que des souris

placées dans une position inconfortable modifient leur posture. À l'inverse, un animal rendu cataleptique conservera cette position anormale.

Les deux pattes antérieures de la souris sont placées sur une barre positionnée à 5 cm du sol (**Figure 29**). Le temps entre le moment où l'animal est placé sur la barre et le moment où il retire complètement les deux pattes de la barre est mesuré. Cette latence de descente est évaluée 20 min après l'injection d'halopéridol, puis toutes les 10 min durant les 100 min post-injection. Le temps imparti à l'animal pour réaliser la descente est limité à 120 s (« cut off »). Si l'animal reste sans bouger, il est descendu de la barre. Le nombre d'ébauches de mouvements de tête effectués sous l'emprise de l'halopéridol est également mesuré ; ils traduisent aussi une volonté de l'animal de sortir de l'état cataleptique.

L'expérience comprend des phases « ON » de 3 min pendant lesquelles les souris reçoivent une stimulation lumineuse bilatérale par le laser bleu ou jaune, selon la transfection virale reçue (ChR2 ou eNpHR). Au début de chaque phase « ON », les deux pattes antérieures des souris sont placées sur la barre afin d'évaluer l'état cataleptique des animaux. Les phases « ON » sont séparées par des phases « OFF » de 7 min pendant lesquelles les animaux ne reçoivent pas de stimulation lumineuse. Les mouvements spontanés de tête sont mesurés pendant la totalité de ces phases.

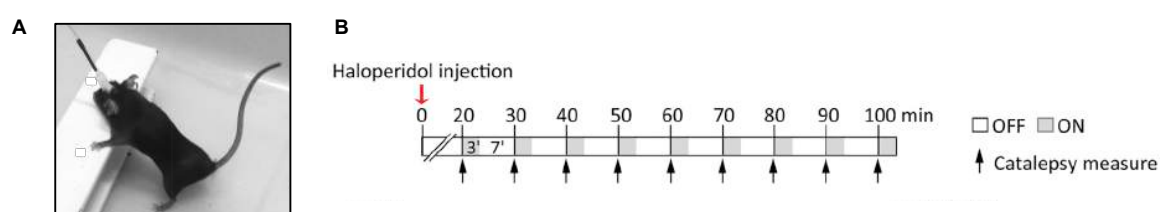


Figure 29 : Test de la catalepsie

A. Illustration d'une souris rendue cataleptique par l'injection d'halopéridol (0,25 mg/kg, i.p.). B. Plan expérimental du test de la catalepsie. L'expérience est réalisée pendant les 100 min qui suivent l'injection d'halopéridol. La catalepsie est évaluée toutes les 10 minutes. Le test comprend des phases « ON » de 3 min pendant lesquelles les souris reçoivent une stimulation lumineuse et des phases « OFF » de 7 min où le laser est éteint.

3.1.2. Openfield

L'activité locomotrice des animaux est évaluée dans une arène carrée (50 x 50 x 30 cm), appelée aussi « openfield », dans laquelle les animaux peuvent circuler librement. Le test démarre

lorsque l'animal est placé au centre de l'arène. La distance parcourue par les animaux est mesurée à l'aide d'un système de vidéotracking (Viewpoint Life Sciences).

L'expérience dure 18 min et comprend des phases « ON » de 3 min pendant lesquelles les souris reçoivent une stimulation lumineuse bilatérale par le laser bleu ou jaune, selon la transfection virale reçue (ChR2 ou eNpHR) et des phases « OFF » de 3 min pendant lesquelles le laser est éteint.

L'expérience dure 30 min pour les tests pharmacologiques. Elle est réalisée chez des souris non-lésées (contrôles), afin de tester si les doses de substances pharmacologiques injectées n'induisent pas d'effet propre sur l'activité locomotrice basale.

3.1.3. Cylindre

Le test du cylindre permet d'évaluer l'asymétrie posturale induite par une lésion 6-OHDA unilatérale. Les animaux sont placés dans un cylindre transparent en plexiglas d'une hauteur de 20 cm et d'un diamètre 9 cm (Figure 30). Lors de leur comportement exploratoire, les animaux se redressent sur leurs pattes arrière et s'appuient grâce à leurs pattes avant sur les parois du cylindre. Les souris non-lésées utilisent autant les pattes droite et gauche ou effectuent des doubles appuis. Après lésion 6-OHDA unilatérale, les troubles moteurs apparaissent du côté controlatéral à la lésion – du fait de la décussation des fibres au niveau du tronc cérébral – et se manifestent par une réduction des appuis effectués avec la patte controlatérale. Le nombre d'appuis controlatéraux ou ipsilatéraux à la lésion réalisés est comptabilisé pendant 5 min. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre d'appuis ipsilatéraux ou controlatéraux à la lésion sur le nombre total d'appuis effectués.

La stimulation optogénétique a lieu pendant toute la durée du test. Les injections intrapéritonéales (i.p.) ou intrastriatales (i.s.) des substances pharmacologiques sont réalisées 30 min ou 2 min, respectivement, avant le début du test du cylindre.

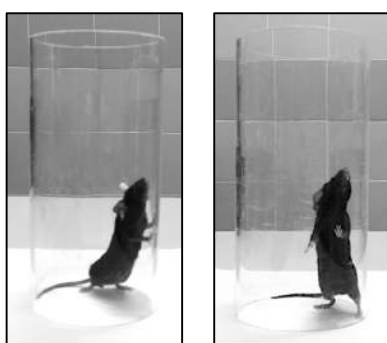


Figure 30 : Test du cylindre

Illustration de souris se redressant sur leurs pattes arrière et effectuant des appuis contre la paroi d'un cylindre transparent.

3.1.4. Cross maze

Le test du cross maze permet d'évaluer le déficit sensori-moteur induit par une lésion unilatérale à la 6-OHDA. Les animaux sont placés dans un labyrinthe en croix (« cross maze ») en plexiglas constitué de 4 bras identiques (45 x 7 x 15 cm) (**Figure 31**). Les souris sont placées dans la zone centrale face à un bras. Le nombre d'entrées dans chaque bras est comptabilisé pendant 5 min. Le comportement exploratoire normal des animaux non-lésés est de parcourir l'ensemble du dispositif en entrant de manière aléatoire dans tous les bras, avec une préférence toutefois pour un déplacement droit devant. Après une lésion 6-OHDA, les souris lésées unilatéralement ont un comportement exploratoire différent : elles ont tendance à entrer de préférence dans le bras ipsilatéral à la lésion. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre d'entrées dans les bras ipsilatéraux, controlatéraux à la lésion ou dans le bras en face, sur le nombre total d'entrées dans tous les bras.

La stimulation optogénétique a lieu pendant toute la durée du test. Les injections i.p. ou i.s. des substances pharmacologiques sont réalisées 30 min ou 2 min, respectivement, avant le début du test du cross maze.

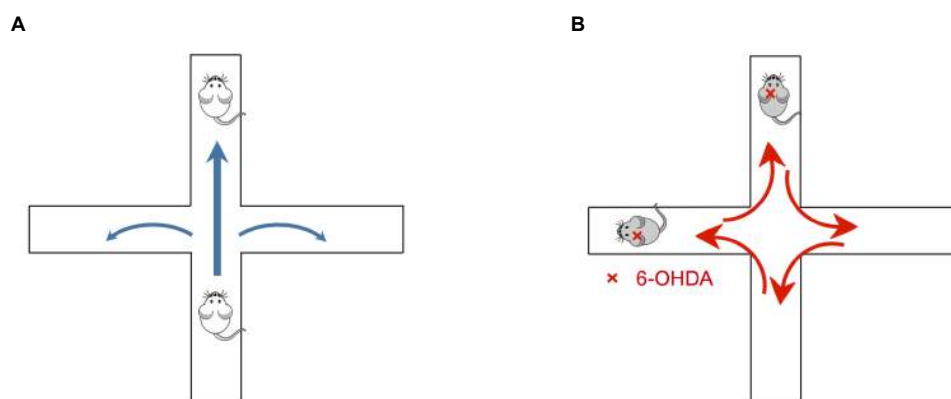


Figure 31 : Test du cross maze

A. Schéma illustrant le comportement exploratoire d'une souris non lésée. Lorsqu'une souris non-lésée entre dans un bras du cross maze, elle choisit ensuite d'aller préférentiellement dans le bras en face (dans 50% des cas) par rapport au bras gauche ou droit à sa position initiale. **B.** En revanche, une souris lésée unilatéralement à la 6-OHDA (par exemple, une lésion gauche ici) a tendance à entrer dans le bras ipsilatéral à la lésion. Elle parcourt ainsi l'ensemble du dispositif en tournant toujours du côté ipsilatéral à la lésion (ici, à gauche).

3.1.5. Pôle

Ce test permet d'évaluer les déficits d'équilibre, de coordination motrice, et la bradykinésie induites par une lésion unilatérale 6-OHDA. Les souris sont placées, tête vers le haut, en haut d'une potence (ou « pôle ») verticale en bois d'aspect rugueux, de 30 cm de hauteur et de 1 cm de diamètre. Elles doivent se retourner et descendre le long de la potence pour atteindre le sol. Les animaux sont entraînés pendant deux jours jusqu'à ce qu'ils réussissent à effectuer le test sans chuter, ni s'immobiliser sur le pôle. Le jour du test, la durée de descente de chacune des souris est mesurée au cours de deux essais consécutifs et la meilleure durée des deux essais est retenue.

La stimulation optogénétique a lieu pendant toute la durée du test (quelques secondes).

3.1.6. Rotation à l'amphétamine

Le test de rotation à l'amphétamine évalue le comportement rotationnel induit par une lésion unilatérale 6-OHDA. L'amphétamine, en stimulant la libération de DA, agit au niveau pré-synaptique du côté intact et exacerbe ainsi le comportement rotationnel des souris lésées unilatéralement. Après l'injection d'amphétamine (5 mg/kg, i.p.), les souris sont placées dans un bol transparent en plexiglas (8 cm de hauteur et 9 cm de diamètre). Leur comportement est enregistré par vidéo et les rotations ipsilatérales et contralatérales sont comptabilisées pendant 40 min. Les résultats sont représentés en pourcentage du nombre de rotations ipsilatérales sur le nombre total de rotations.

Les injections i.p. des substances pharmacologiques sont réalisées 30 min avant le début du test.

3.2. Tests non-moteurs

Le rôle des ChIs et des récepteurs M1 du striatum dorsal a été évalué dans une série de tests non-moteurs émotionnels et cognitifs sur un modèle de lésion partielle bilatérale à la 6-OHDA injectée au niveau du striatum dorsal qui mime les phases précoces de la MP.

L'ensemble des tests non-moteurs est réalisé sous éclairage faible et homogène (12 Lux).

3.2.1. Openfield

Ce test permet, en plus d'évaluer l'activité exploratoire des animaux, de mettre en évidence d'éventuels états anxieux des animaux. Les animaux sont placés dans un openfield (50 x 50 x 30 cm)

dans lequel ils peuvent circuler librement. L'openfield est virtuellement divisé en une zone centrale (25 x 25 cm) et une zone périphérique (Figure 32). Ce test est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer un nouvel environnement et à fuir un environnement stressant pour se protéger. La zone centrale de l'openfield est la plus anxiogène pour les animaux. Ainsi, l'exploration préférentielle de la périphérie de l'openfield est considérée comme un index d'anxiété (phénomène de thigmotactisme).

Le test démarre lorsque l'animal est placé au centre de l'arène et dure 10 min. La distance parcourue et le temps passé par les animaux dans chacune des zones est mesurée à l'aide d'un système de vidéotracking (Viewpoint Life Sciences). Les résultats sont exprimés en pourcentage de temps passé dans la zone centrale sur le temps total passé dans les deux zones.

L'injection i.s. des substances pharmacologiques est réalisée 2 min avant de placer les souris au centre de l'openfield.

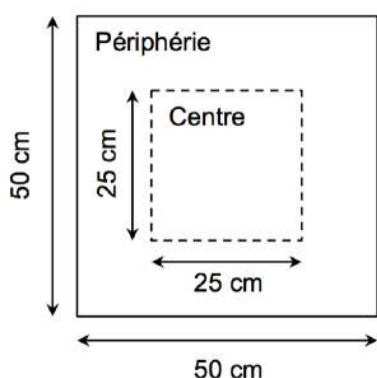


Figure 32 : Test de l'openfield

Représentation schématique de l'arène de l'openfield (50 cm x 50 cm) virtuellement délimitée en une zone centrale (25 x 25 cm) et une zone périphérique.

3.2.2. Labyrinthe en croix surélevé

Le labyrinthe en croix surélevé appelé aussi « Elevated plus maze » est un test permettant également d'évaluer l'état d'anxiété des animaux. Le dispositif est un labyrinthe en forme de croix constitué de deux bras ouverts et de deux bras fermés par des parois en plexiglas opaque, reliés par une plate-forme centrale, le tout surélevé de 50 cm par rapport au sol. Chaque bras mesure 37 cm de long et 6 cm de large. Les parois en plexiglas des deux bras fermés sont noires et ont une hauteur de 17.5 cm (Figure 33). Ce test repose sur la préférence naturelle des animaux pour les bras fermés par rapport aux bras ouverts considérés comme un environnement anxiogène. La surélévation de

l'appareil ajoute un niveau d'anxiété supplémentaire. Le test démarre lorsque la souris est placée dans la zone centrale du dispositif face à un bras ouvert. Le temps passé, la distance parcourue et le nombre d'entrée dans chacun des bras et dans la zone centrale sont mesurés à l'aide d'un système de vidéotracking (Viewpoint Life Sciences) pendant 5 min. Les résultats sont exprimés en pourcentage du temps passé, de la distance parcourue et du nombre d'entrées dans les bras ouverts sur le temps, la distance et le nombre d'entrées dans l'ensemble des zones du dispositif.

La stimulation optogénétique a lieu pendant toute la durée du test tandis que les injections i.p. des substances pharmacologiques sont réalisées 30 min avant le début du test.

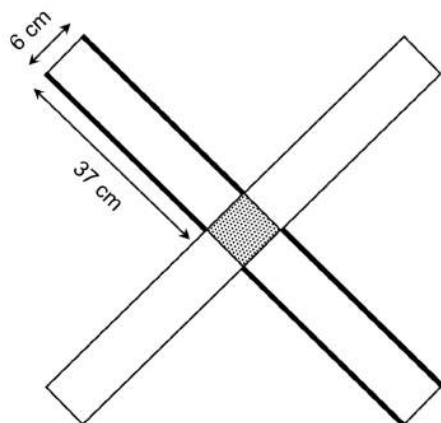


Figure 33 : Test du labyrinthe en croix surélevé

Représentation schématique du labyrinthe en croix surélevé. Le dispositif est composé de 2 bras ouverts et 2 bras fermés (traits épais) et est situé à 50 cm au-dessus du sol. La zone centrale est représentée en gris. Chaque bras mesure 37 cm de long et 6 cm de large. Les parois des bras fermés ont une hauteur de 17.5 cm.

3.2.3. Reconnaissance sociale

Le test de reconnaissance sociale permet d'évaluer la mémoire sociale à court terme. Il est réalisé dans un openfield (50 x 50 x 30 cm) et les déplacements sont mesurés à l'aide d'un système de vidéotracking (Viewpoint Life Sciences). Les souris adultes sont placées pendant 10 min dans l'openfield contenant en son centre une petite cage (8 x 8 x 10 cm) grillagée en acier inoxydable, pour les habituer à l'environnement. Après avoir placé une souris juvénile mâle dans la petite cage grillagée centrale, les souris adultes sont placées dans l'openfield et présentées une première fois au juvénile durant 4 min (Présentation 1) (Figure 34). Après un délai de 30 min pendant lequel les souris adultes sont replacées leur cage, les souris adultes sont de nouveau placées en présence du même juvénile pour une seconde présentation de 4 min (Présentation 2). Les souris adultes réexposées au même juvénile 30 min après une présentation initiale auront un comportement

investigateur vis-à-vis du juvénile réduit, ce qui reflète une reconnaissance active. Les résultats sont exprimés en nombre de contacts, et durée de ces contacts, réalisés par les souris adulte en direction du juvénile pendant les périodes P1 et P2.

La stimulation optogénétique est effectuée pendant toute la durée de la P2. Les injections i.p. ou i.s. des substances pharmacologiques sont réalisées 30 min ou 2 min, respectivement, avant le début de la P2.

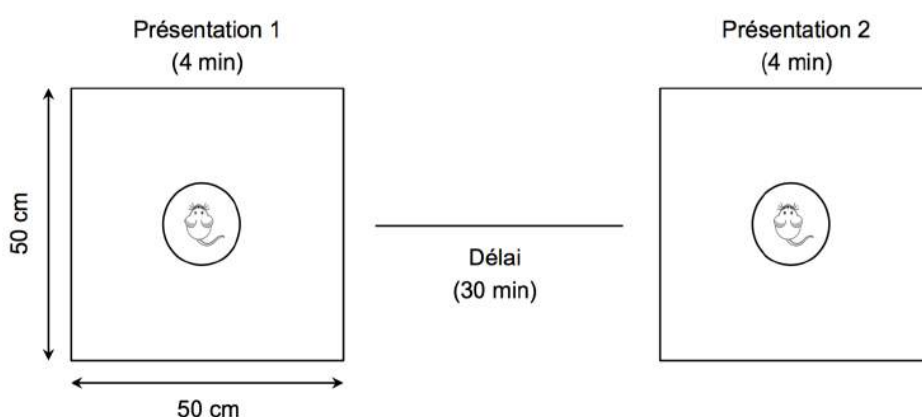


Figure 34 : Test de reconnaissance sociale

Représentation schématique du test de reconnaissance sociale réalisé dans un openfield. Lors d'une première présentation, une souris est présentée une première fois à une souris juvénile durant 4 min (Présentation 1). Après un délai de 30 min, la souris est placée de nouveau en présence du même juvénile pour une seconde présentation (Présentation 2).

3.2.4. Reconnaissance spatiale

Ce test permet d'évaluer la mémoire spatiale à court terme. La veille du test, les souris sont placées pendant 30 min dans un openfield (50 x 50 x 30 cm) pour les habituer à l'arène. Le lendemain, les animaux sont mis en présence de deux objets A et B strictement identiques lors d'une phase de familiarisation (ou phase d'acquisition) durant 10 min (**Figure 35**). Les souris sont replacées dans leur cage pendant 30 min. Pendant ce laps de temps, la configuration spatiale des objets est changée, l'objet B étant déplacé à l'opposé de l'arène. Après ce délai de 30 min, les souris sont ensuite de nouveau placées dans l'openfield pour la phase de test (ou phase de reconnaissance) pendant 10 min. Ce test est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer un nouvel environnement et à privilégier ainsi l'exploration de l'objet déplacé. Le déplacement des animaux est mesuré à l'aide

d'un système de vidéotracking (Viewpoint Life Sciences) et les temps passés au contact de l'objet A (T_2A) et au contact de l'objet B (T_2B) ont été comptabilisés lors de la phase de reconnaissance. Les résultats sont représentés sous forme d'un index de reconnaissance : $T_2B/(T_2A + T_2B) \times 100$.

La stimulation optogénétique a lieu pendant toute la durée de la phase de reconnaissance. Les injections i.p. ou i.s. des substances pharmacologiques sont réalisées 30 min ou 2 min, respectivement, avant le début de la phase de reconnaissance.

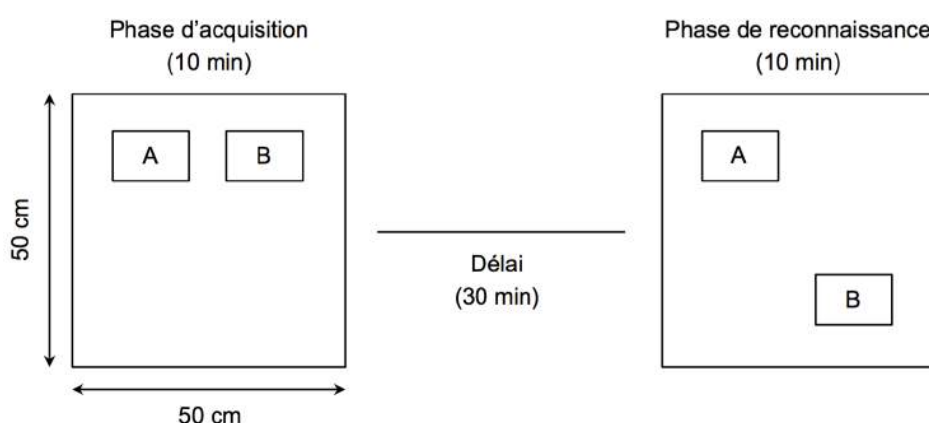


Figure 35 : Test de reconnaissance spatiale

Représentation schématique du test de reconnaissance spatiale. Lors de la phase d'acquisition, une souris est mise en présence de deux objets A et B identiques pendant 10 min. L'objet B est ensuite déplacé à l'opposé de l'arène. Après un délai de 30 min, la souris est placée de nouveau dans l'openfield pour la phase de reconnaissance.

3.2.5. Reconnaissance d'un nouvel objet

Ce test est une variante du précédent test et permet d'évaluer la mémoire de la nouveauté. La veille du test, les souris sont placées pendant 30 min dans l'openfield (50 x 50 x 30 cm) pour les habituer à l'arène. Le lendemain, l'animal est mis en présence de deux objets A et B strictement identiques lors d'une phase de familiarisation (ou phase d'acquisition) durant 10 min. Après un délai de 30 min, les souris sont de nouveau placées dans l'openfield pour la phase de test (ou phase de reconnaissance) durant 10 min où l'objet B a été remplacé par un nouvel objet B' (Figure 36). Le déplacement des animaux est mesuré à l'aide d'un système de vidéotracking (Viewpoint Life Sciences) et les temps passés au contact de l'objet A (T_2A) et au contact du nouvel objet B' (T_2B') ont été comptabilisés lors de la phase de reconnaissance. Les résultats sont représentés sous forme d'un index de reconnaissance : $T_2B'/(T_2A + T_2B') \times 100$.

La stimulation optogénétique a lieu pendant toute la durée de la phase de reconnaissance. Les injections i.p. ou i.s. de substances pharmacologiques sont réalisées 30 min ou 2 min, respectivement, avant le début de la phase de reconnaissance.

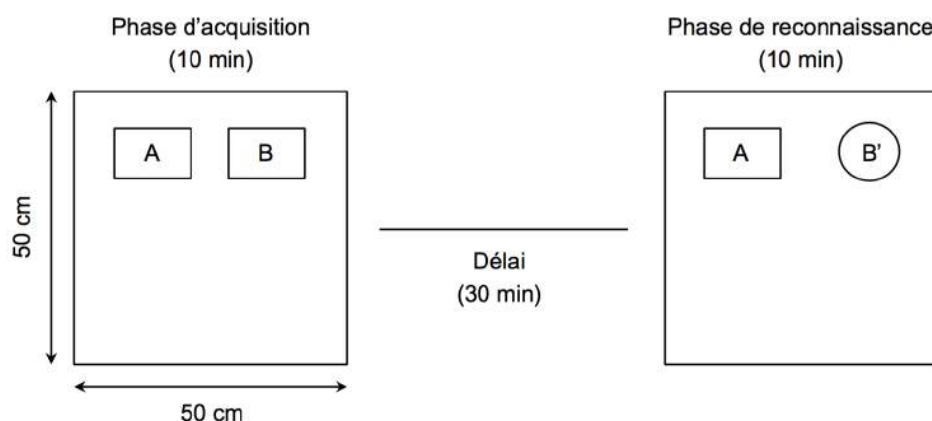


Figure 36 : Test de reconnaissance d'un nouvel objet

Représentation schématique du test de reconnaissance d'un nouvel objet. Lors de la phase d'acquisition, une souris est mise en présence de deux objets A et B identiques pendant 10 min. L'objet B est ensuite être remplacé par un nouvel objet B'. Après un délai de 30 min, la souris est placée de nouveau dans l'openfield pour la phase de reconnaissance.

Les tests moteurs et non-moteurs sont réalisés 2 semaines après les lésions dopaminergiques.

Le [Tableau 5](#) résume l'ensemble des expérimentations comportementales réalisées dans nos travaux.

Test comportemental	Type	Modèle expérimental	Evaluation	Durée	Optogénétique	Pharmacologie
Catalepsie	Moteur	Pharmacologique (halopéridol)	Akinésie	100 min	ChR2 - eNpHR	-
Openfield	Moteur	-	Locomotion basale	18 - 30 min	ChR2 - eNpHR	Scopolamine - Télénzépine Tropicamide - McN-A-434
Cylindre	Moteur	Lésion 6-OHDA SNc unilatérale	Asymétrie posturale	5 min	eNpHR	Scopolamine - L-DOPA Télénzépine - Tropicamide
Cross maze	Moteur	Lésion 6-OHDA SNc unilatérale	Déficit sensori-moteur	5 min	eNpHR	Scopolamine - L-DOPA Télénzépine - Tropicamide
Pôle	Moteur	Lésion 6-OHDA SNc unilatérale	Bradycinésie	≈ sec	eNpHR	-
Rotation à l'amphétamine	Moteur	Lésion 6-OHDA SNc unilatérale	Asymétrie	40 min	-	Télénzépine - Tropicamide
Dyskinésies L-DOPA induites	Moteur	Lésion 6-OHDA SNc unilatérale	Mouvements anormaux involontaires	80 min	eNpHR	-
Openfield	Non-moteur	Lésion 6-OHDA striatum bilatérale	Anxiété	10 min	-	McN-A-434
Labyrinthe en croix surélevé	Non-moteur	Lésion 6-OHDA striatum bilatérale	Anxiété	5 min	eNpHR	Télénzépine
Reconnaissance sociale	Non-moteur	Lésion 6-OHDA striatum bilatérale	Mémoire sociale à court terme	50 min	eNpHR	Télénzépine - McN-A-434
Reconnaissance spatiale	Non-moteur	Lésion 6-OHDA striatum bilatérale	Mémoire spatiale à court terme	50 min	eNpHR	Télénzépine - McN-A-434
Reconnaissance d'un nouvel objet	Non-moteur	Lésion 6-OHDA striatum bilatérale	Mémoire de reconnaissance à court terme/nouveauté	50 min	eNpHR	Télénzépine - McN-A-434

Tableau 5 : Récapitulatif des tests comportementaux effectués dans nos travaux

4. Substances pharmacologiques

Toutes les substances pharmacologiques sont diluées dans une solution de NaCl 0.9%. Le volume des injections i.p. est de 10 ml/kg et le volume des injections i.s. est de 0.5 μ l. Les injections i.s. sont effectuées à l'aide d'un injecteur (33 gauge, longueur 3.2 mm, Plastics One) relié à une micropompe (CMA/Microdialysis) permettant une perfusion à un débit régulier de 0.25 μ l/min, à travers :

- **une canule guide unilatérale** (modèle de lésion 6-OHDA unilatérale totale) préalablement implantée dans le striatum dorsal aux coordonnées stéréotaxiques suivantes : +1.0 mm AP, $\pm$ 1.5 mm ML, -2.5 mm DV, d'après l'atlas stéréotaxique de souris (Paxinos and Franklin, 2001)
- **une canule guide bilatérale** (modèle de lésion 6-OHDA bilatérale partielle) préalablement implantée dans le striatum dorsal aux coordonnées stéréotaxiques suivantes : +0.5 mm AP, $\pm$ 1.5 mm ML, -2.5 mm DV, d'après l'atlas stéréotaxique de souris (Paxinos and Franklin, 2001).

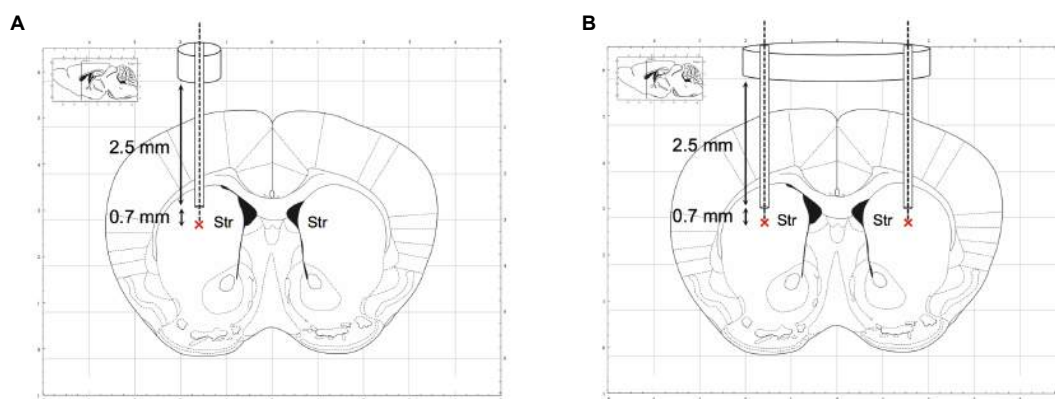


Figure 37 : Injections intrastriales des substances pharmacologiques

Représentation schématique des sites d'injections des substances pharmacologiques à travers des canules guides (2.5 mm) préalablement implantées à demeure dans le striatum. Les composés pharmacologiques sont injectés unilatéralement (A) ou bilatéralement (B) dans le striatum dorsal à l'aide d'injecteurs dépassant de 0.7 mm l'extrémité de la (ou des) canule(s) guide(s).

Les propriétés des substances pharmacologiques utilisées sont plus particulièrement détaillées dans la partie « matériels et méthodes » des différents articles, et sont récapitulées dans le [Tableau 6](#).

Substance	Nom complet	Action	Fournisseur	Injection	Concentration
Halopéridol (Haldol®)	4-[4-(p-chlorophényl)-4-hydroxypipéridino]-4-fluorobutyrophénone	Antagoniste des récepteurs dopaminergiques D2 (et D1)	Janssen	i.p.	0.25 mg/kg
D-amphétamine	(+)- α -méthylphényéthylamine	Inhibiteur de la recapture de la dopamine	Sigma-Aldrich	i.p.	5 mg/kg
L-DOPA méthyl ester	3,4-dihydroxy-L-phénylalanine	Précurseur de la dopamine	Sigma-Aldrich	i.p.	3 - 20 mg/kg
Benserazide chloride	DL-serine 2-(2,3,4-trihydroxybenzyl)hydrazide hydrochloride	Inhibiteur de la DOPA décarboxylase	Sigma-Aldrich	i.p.	10 - 12 mg/kg
Scopolamine hydrobromide	Hyoscine hydrobromide	Antagoniste non sélectif des mAChRs	Sigma-Aldrich	i.p.	1 mg/kg
Telenzepine dihydrochloride	5,11-dihydro-11-[(4-méthyl-1-piperazinyl)acetyl]-6H-pyrido[2,3-b][1,4]benzodiazépin-6-one dihydrochloride	Antagoniste des mAChRs M1	Sigma-Aldrich	i.p.	0.3 - 3 mg/kg
				i.s.	0.75 - 7.5 µg
Tropicamide	N-Ethyl-2-phényl-N-(4 pyridylméthyl)hydracrylamide	Antagoniste des mAChRs M4	Sigma-Aldrich	i.p.	2.5 - 10 mg/kg
				i.s.	0.1 - 1 - 6 µg
McN-A-343	(4-hydroxy-2-butyryl)-1-triméthyl-ammonium-3-chloro-carbanilate chloride, 4-[N-(3-chlorophényl)carbamoyloxy]-2-butyryl-triméthyl-ammonium chloride	Agoniste des mAChRs M1	Sigma-Aldrich	i.s.	5 nmol

Tableau 6 : Récapitulatif des substances pharmacologiques utilisées dans nos travaux

RÉSULTATS

Article 1

Article 1

But de l'étude

Afin de caractériser l'implication des ChIs striataux dans le contrôle des processus moteurs, nous avons évalué les effets comportementaux de leur activation (via l'expression de la ChR2) et de leur inhibition (via l'expression de l'eNpHR), en condition physiologique et dans deux modèles expérimentaux de la maladie de Parkinson : un modèle pharmacologique transitoire basé sur l'utilisation de l'halopéridol, un antagoniste des récepteurs dopaminergiques et un modèle de lésion unilatérale totale, plus durable, induite par l'injection de la 6-OHDA au niveau de la SNc. Pour cela, une série de tests moteurs a été effectuée afin d'évaluer, chez la souris, l'activité locomotrice de base (test de l'openfield), l'akinésie (test de la catalepsie), l'asymétrie posturale (test du cylindre), le déficit sensori-moteur (test du cross maze) et les dyskinésies induites par la L-DOPA.

D'autre part, afin de mieux comprendre les voies neuronales au travers desquelles les ChIs striataux interviennent dans la symptomatologie motrice, nous avons évalué l'impact fonctionnel de leur inhibition sur l'activité des deux populations de neurones de projection du striatum, les MSNs-D1 et MSNs-D2, et sur l'activité des neurones de sortie d'une structure des ganglions de la base, la SNr, en condition physiologique et dans le modèle de lésion unilatérale 6-OHDA.

Principaux résultats

Dans le modèle pharmacologique, la photoinhibition des ChIs après stimulation de l'eNpHR contrebalance l'état sédatif induit par une forte dose d'halopéridol, alors que leur photoactivation par stimulation de la ChR2 ne montre aucun effet. Ces données sont confirmées dans le modèle de lésion unilatérale 6-OHDA où seule la photoinhibition des ChIs réduit l'asymétrie posturale et le déficit sensori-moteur. De manière très intéressante, en condition physiologique, la photoactivation et la photoinhibition des ChIs n'induisent, tous deux, aucun effet sur l'activité locomotrice.

Des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* de neurones de la SNr montrent que la photoinhibition des ChIs normalise l'activité en bouffées des neurones de la SNr altéré suite à la lésion 6-OHDA. En condition physiologique, les enregistrements électrophysiologiques *in vivo* de neurones de la SNr, suite à une stimulation corticale, montrent une réponse triphasique typique composée d'excitations précoce puis tardive, séparées par une inhibition, représentant respectivement l'activation des voies hyperdirecte, directe et indirecte. Les données révèlent une action sélective de la photoinhibition des ChIs sur la composante inhibitrice de la réponse triphasique, c'est-à-dire sur la voie directe, uniquement en condition pathologique.

Des enregistrements électrophysiologiques *in vitro* en patch-clamp sur tranches striatales indiquent que la lésion unilatérale 6-OHDA, dans nos conditions expérimentales, n'induit pas une hyperactivité mais une hyperexcitabilité des ChIs. De plus, la lésion 6-OHDA affecte différemment les deux populations de MSNs : l'excitabilité des MSNs-D1 à l'origine de la voie directe est augmentée, alors que l'excitabilité des MSNs-D2 à l'origine de la voie indirecte est inchangée.

D'autre part, des données électrophysiologiques *in vitro* révèlent que la photoinhibition des ChIs striataux entraîne une diminution de la décharge neuronale similaire des MSNs-D1 et MSNs-D2 en condition physiologique et une diminution de la décharge neuronale plus contrastée des MSNs-D1 et MSNs-D2 en condition pathologique. En effet, après déplétion dopaminergique, la diminution de la décharge neuronale est plus faible pour les MSNs-D2 que les MSNs-D1, suggérant que les MSNs-D1 sont plus sensibles à la photoinhibition des ChIs striataux que les MSNs-D2.

Conclusion

Cette première étude montre que la photoinhibition des ChIs striataux réduit les déficits moteurs induits par l'halopéridol et la lésion unilatérale des neurones dopaminergiques de la SNC. Les corrélats cellulaires de ces effets antiparkinsoniens révèlent une action préférentielle des ChIs sur les MSNs-D1 à l'origine de la voie directe pour rétablir une transmission cortico-striato-corticale adéquate. De plus, l'implication des ChIs striataux dans les processus moteurs, uniquement en situation pathologique, suggère que leur action est fortement dépendante du tonus dopaminergique.

Striatal Cholinergic Interneurons Control Motor Behavior and Basal Ganglia Function in Experimental Parkinsonism

Nicolas Maurice,^{1,4} Martine Liberge,^{2,4} Florence Jaouen,¹ Samira Ztaou,² Marwa Hanini,¹ Jeremy Camon,² Karl Deisseroth,³ Marianne Amalric,^{2,5} Lydia Kerkerian-Le Goff,^{1,5} and Corinne Beurrier^{1,5,*}

¹Aix-Marseille Université (AMU), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7288, Institut de Biologie du Développement de Marseille (IBDM), 13288 Marseille cedex 9, France

²Aix-Marseille Université (AMU), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7291, FR3C 3512, Laboratoire de Neurosciences Cognitives, 13331 Marseille cedex 3, France

³Departments of Bioengineering and Psychiatry and Howard Hughes Medical Institute, Stanford University, Palo Alto, CA 94305, USA

⁴Co-first author

⁵Co-senior author

*Correspondence: corinne.beurrier@univ-amu.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.034>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

SUMMARY

Despite evidence showing that anticholinergic drugs are of clinical relevance in Parkinson's disease (PD), the causal role of striatal cholinergic interneurons (CINs) in PD pathophysiology remains elusive. Here, we show that optogenetic inhibition of CINs alleviates motor deficits in PD mouse models, providing direct demonstration for their implication in parkinsonian motor dysfunctions. As neural correlates, CIN inhibition in parkinsonian mice differentially impacts the excitability of striatal D1 and D2 medium spiny neurons, normalizes pathological bursting activity in the main basal ganglia output structure, and increases the functional weight of the direct striatonigral pathway in cortical information processing. By contrast, CIN inhibition in non-lesioned mice does not affect locomotor activity, equally modulates medium spiny neuron excitability, and does not modify spontaneous or cortically driven activity in the basal ganglia output, suggesting that the role of these interneurons in motor function is highly dependent on dopamine tone.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a debilitating neurodegenerative movement disorder resulting from the loss of nigral dopaminergic (DA) neurons that project massively to the striatum, the main basal ganglia input structure. The hypokinetic parkinsonian syndrome is thought to be the consequence of opposite changes in the activity of the two populations of GABAergic striatal projection neurons, also called medium spiny neurons (MSNs), which control the basal ganglia output nuclei, mainly the substantia nigra pars reticulata (SNr) in rodent. Dopamine D1 receptor-expressing MSNs (D1 or direct MSNs), giving rise

to a monosynaptic inhibitory projection (direct pathway) onto SNr, become hypoactive, whereas dopamine D2 receptor-expressing MSNs (D2 or indirect MSNs), at the origin of a polysynaptic projection with excitatory influence onto SNr (indirect pathway), become hyperactive (Albin et al., 1989; Mallet et al., 2006). This imbalance leads to pathological activation of SNr, reinforcing its inhibitory tone onto the thalamocortical circuit and, hence, on motor cortical outflow. The pathological changes in the activity of the two striatal pathways, whose functional relationship with movement control is still debated (Calabresi et al., 2014; Cui et al., 2013), may involve profound reorganizations within the striatal circuitry.

Striatal cholinergic interneurons (CINs), which correspond to the tonically active neurons recorded in vivo, constitute 1%–3% of all striatal neurons. Despite being few in numbers, they are the main source of acetylcholine (ACh) within the striatum, and their dense terminal fields are primarily directed to MSNs (Phelps et al., 1985). The improvement of parkinsonian tremor by both DA agonists and anticholinergic drugs led to the DA-ACh balance hypothesis, where DA and ACh are believed to play opposite roles in the striatum (Barbeau, 1962). This clinical observation particularly underlines the functional impact of ACh as DA levels fall. There is indeed compelling evidence showing that DA depletion triggers complex alterations in striatal cholinergic signaling and activity (Aosaki et al., 1994; Ding et al., 2006), leading, among other things, to morphofunctional alterations of striatal output neurons (Pisani et al., 2007; Shen et al., 2007). However, whether and how this cholinergic-dependent disruption of striatal properties contributes to motor symptoms in PD and affects basal ganglia circuitry remain an open question.

The diversity of cholinergic receptors expressed in the striatum, located both at the presynaptic and postsynaptic levels (Goldberg et al., 2012), suggests that CINs exert complex and powerful influence on striatal functioning and, hence, on basal ganglia outflow. An additional level of complexity in understanding cholinergic regulation of striatal function comes from recent studies showing the following: (1) CINs co-release glutamate able to evoke fast glutamatergic responses in MSNs (Higley

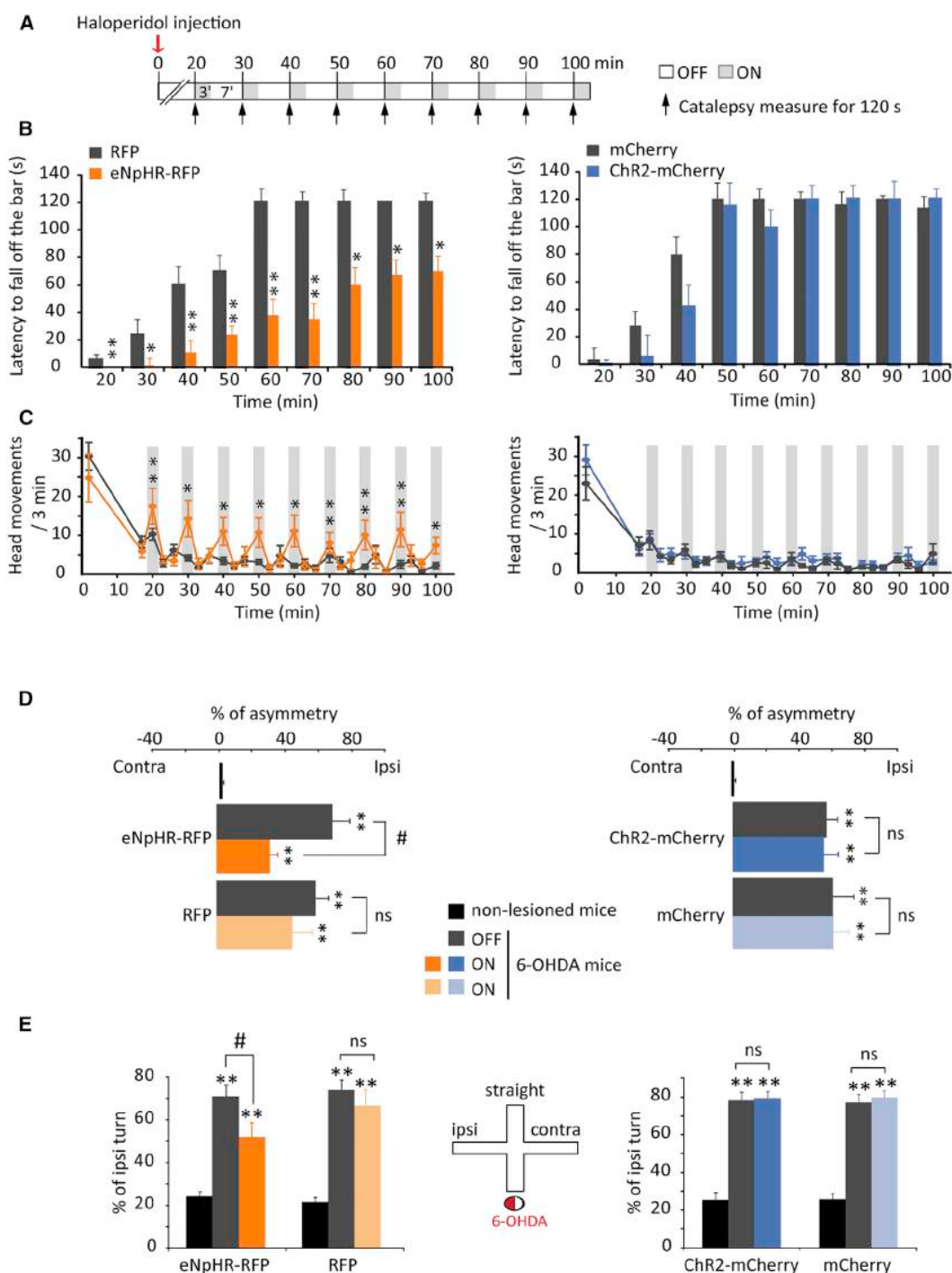


Figure 1. Photoinhibition of CINs rReduces Haloperidol-Induced Catalepsy and Relieves Parkinsonian-like Motor Deficits
(A) Experimental design. Mice received haloperidol (0.25 mg/kg) and the latency to step down the bar was measured 20 min later, then every 10 min, with a 120-s cutoff. Light was turned on (blue light: 10 Hz, 25-ms pulse width; yellow light: continuous illumination) for 3 min when placing the mice on the bar and was turned off afterward for 7 min, until next measure.
(B) Yellow light reduced haloperidol-induced catalepsy in eNpHR-RFP mice versus RFP mice ($p < 0.05$, $**p < 0.01$, U-Mann-Whitney after significant Kruskal-Wallis test), whereas blue light illumination in ChR2-mCherry mice had no effect versus mCherry mice ($p = 0.3$).

(legend continued on next page)

et al., 2011), (2) CIN activation can drive GABA release from dopaminergic terminals (Nelson et al., 2014; Tritsch et al., 2014) and neuropeptide Y-expressing interneurons (English et al., 2011), and (3) their synchronous activation triggers striatal DA release (Threlfell et al., 2012). While we do not know yet how these different actions are coordinated in vivo, these results suggest that DA/ACh interactions are more complex than the traditional antagonistic model would predict. Therefore, the contribution of CINs to basal ganglia function cannot be fully understood unless an approach mimicking the diversity of their actions is used. Optogenetics that allows precise control of circuit function, was, for example, used successfully to demonstrate the role of CINs in the nucleus accumbens during cocaine conditioning (Witten et al., 2010).

Here, using a combination of optogenetic, behavioral, and electrophysiological approaches, we demonstrate a major role of CINs in PD pathophysiology. We show that selective inhibition of CINs alleviates motor deficits and corrects dysfunctions at the main input and output stages of the basal ganglia network in PD mouse models, with a preferential action on the direct striatonigral pathway.

RESULTS

Inhibition of Striatal Cholinergic Interneurons Reduces Parkinsonian-like Motor Deficits

We expressed ChR2-mCherry or eNpHR-RFP in choline acetyltransferase (ChAT)-expressing neurons by injecting a Cre-dependent adeno-associated virus (AAV) carrying the opsins or their reporter genes into the dorsal striatum of ChAT^{cre/cre} mice (subsequently referred to as ChR2-mCherry and eNpHR-RFP mice). Quantifying the proportion of neurons expressing opsins that were also ChAT positive and vice versa demonstrated the specificity and efficiency of the targeting strategy (Figure S1). Recordings of optogenetically identified CINs in striatal slices and anesthetized mice showed that opsins were functional (Figure S2).

CIN photoinhibition or photoactivation had no significant effect on locomotor activity of non-lesioned RFP, eNpHR-RFP, mCherry, and ChR2-mCherry mice in an open field (Figure S3A). To determine whether CINs affect parkinsonian akinesia, the effects of CIN modulation were examined in the haloperidol-induced catalepsy model (Figure 1A). The eNpHR-RFP haloperidol-treated mice removed their forepaws from the bar significantly faster under yellow illumination than did the RFP-treated mice (Figure 1B). Consistently, yellow light restored head move-

ments in a light-locked manner in haloperidol-injected eNpHR-RFP mice, demonstrating a robust anti-akinetic action of CIN inhibition (Figure 1C). In contrast, ChR2-mCherry mice under blue illumination exhibited a long-lasting cataleptic state, similar to mCherry mice (Figures 1B and 1C).

We next tested whether CIN inhibition could alleviate motor dysfunction in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesional model of PD. Unilateral 6-OHDA injection into the substantia nigra pars compacta (SNc) resulted in a near-total loss of DA cells after 2 weeks. In the cylinder test (Figure 1D), RFP and mCherry non-lesioned mice used their two forepaws indifferently during exploratory rearing (asymmetry score close to zero). The 6-OHDA lesions produced a significant shift toward ipsilateral forepaw use due to contralateral forelimb akinesia. Photoinhibition of CINs ipsilateral to the lesioned side in eNpHR-RFP mice induced a significant reduction in the asymmetry score. In contrast, CIN photoactivation in ChR2-mCherry 6-OHDA mice did not affect asymmetry (Figure 1D). In the cross maze test (Figure 1E), the 6-OHDA-induced bias toward ipsilateral turns, which reflects sensorimotor neglect, was significantly reduced by CIN inhibition in eNpHR-RFP mice, while CIN activation had no effect in ChR2-mCherry mice. The non-selective muscarinic receptor antagonist scopolamine (1 mg/kg) also reduced the asymmetry in the cylinder and cross maze tests in 6-OHDA mice (Figures S3B and S3C). Finally, we examined the effect of CIN photoinhibition on L-DOPA-induced dyskinesia, a main side effect of long-term DA treatment. CIN inhibition in eNpHR-RFP mice failed to affect the severity of dyskinesia once expressed (Figure S4). Taken together, these data show that CIN inhibition has no effect on spontaneous locomotion and L-DOPA-induced dyskinesia in our lesion and treatment conditions, but significantly alleviates parkinsonian-like motor deficits.

Inhibition of Striatal CINs Regulates the Basal Ganglia Output Structure in Parkinsonian Condition Only

A leading hypothesis on the origin of motor dysfunction in PD is that DA loss induces abnormal bursting activity in basal ganglia output nuclei, leading to pathological inhibitory tone onto the thalamocortical circuit that disrupts motor planning and execution. We tested whether striatal CIN inhibition modifies the activity of SNr neurons recorded in vivo in anesthetized transgenic eNpHR mice. CIN photoinhibition in non-lesioned animals did not affect spontaneous activity of SNr neurons (Table S1). The 6-OHDA mice showed altered burst firing, with significant increases in burst duration and number of spikes per burst (Figure 2A). CIN photoinhibition normalized these changes, without

(C) Light partially restored head movements in eNpHR-RFP mice (ON versus OFF preceding light: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, paired Student's t test after significant two-way ANOVA), but not in ChR2-mCherry mice or in control RFP and mCherry mice ($n = 10$ – 13 per group).

(D) In the cylinder test, 6-OHDA mice showed marked forelimb asymmetry compared to non-lesioned mice (** $p < 0.01$, Fisher's least significant difference [LSD] test after significant ANOVA). (Left) This asymmetry was significantly improved by yellow light in eNpHR-RFP mice (ON versus OFF: # $p < 0.05$, Student's t test). Light did not affect asymmetry in RFP control mice ($n = 7$ – 8 per group). (Right) The significant forelimb asymmetry measured in 6-OHDA versus non-lesioned mice (** $p < 0.01$, Fisher's LSD test after significant ANOVA) was not affected by blue light illumination in ChR2-mCherry (ON versus OFF: ns, Student's t test) and mCherry (ON versus OFF: ns, Student's t test) mice ($n = 7$ – 8 per group).

(E) (Left) Ipsilateral turn bias induced by 6-OHDA lesion in the cross maze (6-OHDA versus non-lesioned: ** $p < 0.01$, one-way ANOVA) was partially corrected by photoinhibition in eNpHR-RFP mice (ON versus OFF: # $p < 0.05$, paired Student's t test), but not in RFP control mice ($n = 14$ per group). (Right) Photoactivation did not affect the ipsilateral turn bias induced by 6-OHDA lesion (6-OHDA versus non-lesioned: ** $p < 0.01$, one-way ANOVA) in ChR2-mCherry mice nor in mCherry mice (ON versus OFF: ns, Student's t test, $n = 12$ per group). In (D) and (E), continuous illumination was for 5 min with yellow light and 25-ms pulse width was at 10 Hz for blue light. Circle under the cross maze symbolizes a mouse with the 6-OHDA-injected side in red. Errors bars, SEM.

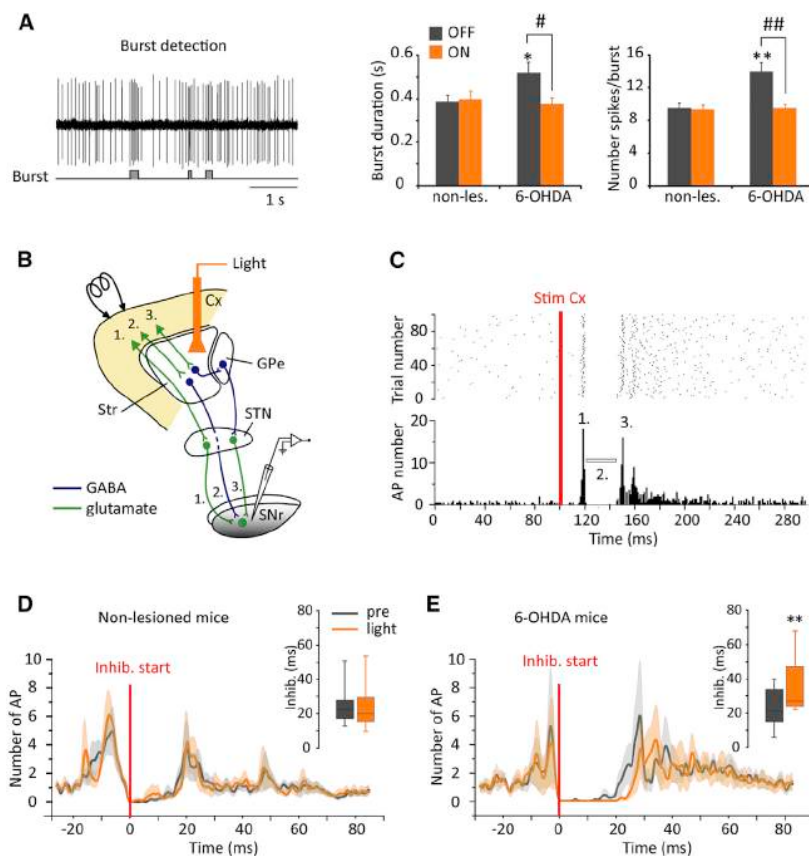


Figure 2. Photoinhibition of CINs Normalizes SNr Burst Firing and Strengthens the Inhibitory Influence of the Striatonigral Direct Pathway in 6-OHDA Mice

(A) Detection of bursts according to Poisson Surprise analysis in a spontaneously firing SNr neuron recorded in 6-OHDA transgenic eNpHR mice. The histograms show that the 6-OHDA induced increases in burst duration and number of spikes per burst (6-OHDA versus non-lesioned: *p < 0.05, **p < 0.01, Student's t test) were normalized by CIN photoinhibition (light was delivered for 1 min; 6-OHDA ON versus OFF: #p < 0.05, ##p < 0.01, Holm-Sidak test after significant one-way ANOVA). Non-lesioned mice, n = 18 cells from six mice; 6-OHDA mice, n = 13 cells from six mice.

(B) Schematic representation shows pathways activated by cortical stimulation that project to SNr neurons. Cx, cortex; Str, striatum; GPe, external globus pallidus; STN, subthalamic nucleus.

(C) Raster plot and peristimulus time histogram (PSTH) show the typical triphasic response evoked by motor cortex stimulation in one SNr neuron recorded from a 6-OHDA transgenic eNpHR mouse.

(D and E) Population PSTHs of the cortically evoked responses recorded in SNr neurons in non-lesioned (D, n = 17 cells from six mice) and 6-OHDA (E, n = 7 cells from five mice) mice. The same neuron was recorded before (pre, gray line) and during (light, orange line) CIN photoinhibition. Light was delivered for 1 s at the beginning of each trial. PSTHs are aligned on the beginning of the inhibitory component (red lines) and the light-shaded colors represent

SEM. CIN photoinhibition induced a significant increase of the inhibitory component duration only in 6-OHDA mice, as illustrated by the box plots (insets) (**p < 0.01, Holm-Sidak test after significant one-way RM ANOVA). Errors bars, SEM.

modifying the parameters unaltered by the lesion (firing frequency and burst recurrence) (Table S1).

Next, to examine whether CINs influence the processing of cortical information through the trans-striatal pathways, we recorded the responses of individual SNr neurons to cortical stimulation (Figures 2B and 2C). As previously reported, such stimulation triggers a complex response composed, in most cases, of an early excitation followed by an inhibition and a late excitation, which has been attributed to the respective activation of the hyperdirect corticosubthalamic, the direct and indirect striatonigral pathways (Maurice et al., 1999; Ryan and Sanders, 1994; Sano et al., 2013; Tachibana et al., 2008). Because the characteristics of the evoked responses greatly vary among cells depending on the stimulation (e.g., location and number of stimulated fibers) but remain stable in a given cell over time, comparisons were made for a same cell under successive light conditions and not between cells from 6-OHDA versus non-lesioned mice. CIN photoinhibition had no effect on cortical information transfer in non-lesioned mice, whereas, in 6-OHDA mice, it increased the duration of the inhibitory component of the triphasic response without significantly affecting the excitatory components (Figures 2D and 2E; Table S2). Since parkinsonian akinesia is classically associated with overactive indirect pathway

and hypoactive direct pathway, our results suggest that CIN inhibition might partially restore balance in striatal outputs by increasing the functional impact of the direct pathway. In contrast, CIN photoinhibition had no effect on SNr spontaneous activity and cortical information transfer in non-lesioned transgenic eNpHR mice.

Dopamine Depletion Affects the Intrinsic Excitability of D1 MSNs

We first determined whether CINs themselves were affected by 6-OHDA lesion, as there is no consensus on whether CIN activity or striatal ACh release increases in PD models. Optogenetically identified CINs recorded either in slices or in anesthetized mice exhibited similar firing frequency in non-lesioned and 6-OHDA conditions (Figure 3), showing that they are not hyperactive in our experimental conditions. However, CINs were more excitable in slices from 6-OHDA mice, as illustrated by a lower rheobase current (non-lesioned: 137.7 ± 16.7 pA, n = 17; 6-OHDA: 87.1 ± 16.5 pA, n = 17; p < 0.05, Mann-Whitney test).

We then tested whether CIN modulation of striatal functions could be altered in PD state, by examining its impact on identified D1 and D2 MSNs that form the direct and indirect striatal projection systems, 2–3 weeks after 6-OHDA lesion. The

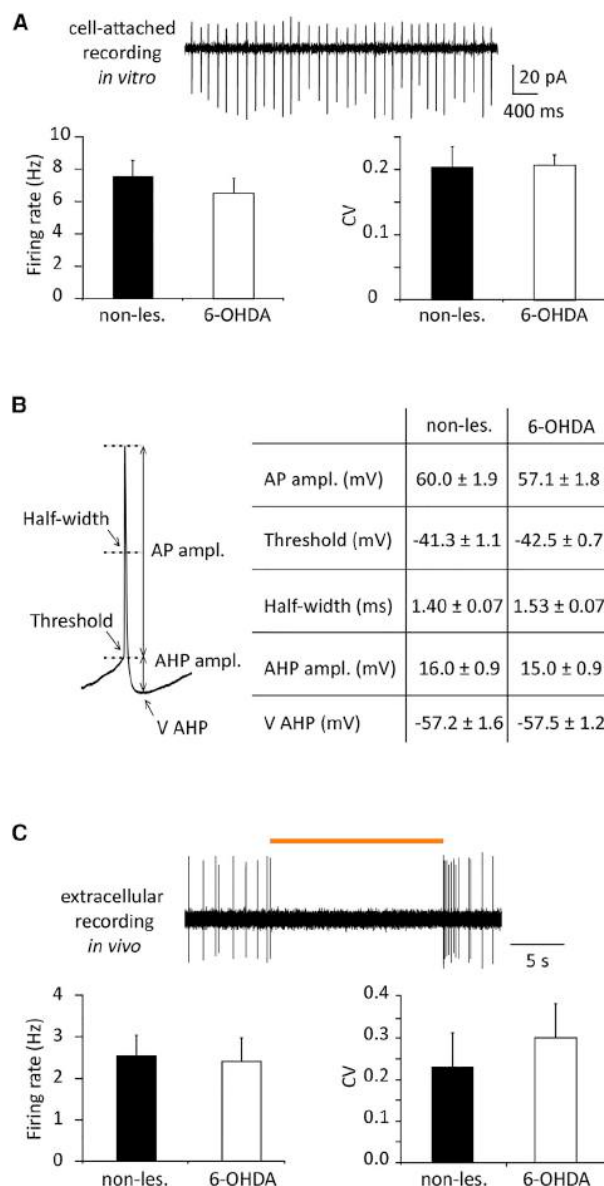


Figure 3. Impact of 6-OHDA Lesion on CIN Electrophysiological Properties

(A) Spontaneous activity from a CIN recorded in cell-attached configuration. Histograms show the mean firing rate and coefficients of variation (CV = firing rate SD/firing rate mean) in non-lesioned ($n = 12$ cells) and 6-OHDA ($n = 20$ cells) transgenic eNpHR mice (ns, Mann-Whitney test). (B) Action potential characteristics of CINs recorded in non-lesioned ($n = 13$ cells) and 6-OHDA ($n = 22$ cells) mice. No significant differences were observed between the two groups (ns, Student's t test). (C) Spontaneous activity and optogenetic identification of a CIN recorded *in vivo*. Histograms show the mean frequency rate and CVs (firing rate SD/firing rate mean) in non-lesioned ($n = 8$ cells) and 6-OHDA ($n = 7$ cells) transgenic eNpHR mice (ns, Mann-Whitney test). Errors bars, SEM.

resting membrane potentials of D1 and D2 MSNs were similar in non-lesioned and 6-OHDA mice (data not shown). However, in non-lesioned mice, D2 MSNs were more excitable than D1 MSNs, in agreement with previous reports (Gertler et al., 2008; Kreitzer and Malenka, 2007; Figure 4A). After DA depletion, D2 MSN excitability was not changed, while that of D1 MSNs greatly increased. D1 MSNs fired at higher frequency at each depolarizing current step, and the rheobase current was significantly lower in 6-OHDA versus non-lesioned mice (Figure 4). These results show that DA depletion reduces the dichotomy between D1 and D2 MSN excitability by increasing D1 MSN excitability.

Striatal CINs Differentially Modulate the Excitability of D1 and D2 MSNs in Parkinsonian Condition

Changes in intrinsic membrane excitability can occur either independently or in concert with changes in synaptic inputs. As cortical inputs strongly drive MSN activity and are modulated by presynaptic muscarinic receptors (Hernández-Echeagaray et al., 1998; Malenka and Kocsis, 1988; Pakhotin and Bracci, 2007), we investigated whether CIN inhibition affects corticostriatal transmission. Recordings were made 2–3 weeks after 6-OHDA lesion in transgenic eNpHR/D1 mice expressing both eNpHR in CINs and the fluorescent reporter tdTomato in DA D1 receptor-containing neurons (Figure S5A). In non-lesioned mice, excitatory postsynaptic currents (EPSCs) were not significantly altered by CIN inhibition, both in D1 and D2 MSNs (D1 MSNs, light versus pre-light: 325.99 ± 57.92 pA versus 311.16 ± 53.47 pA, not significant [ns], paired Student's t test, $n = 14$ cells; D2 MSNs, light versus pre-light: 214.98 ± 30.07 pA versus 214.59 ± 26.44 pA, ns, paired Student's t test, $n = 11$ cells) (Figure S5B). In contrast, CIN inhibition in 6-OHDA mice significantly potentiated EPSCs in both D1 and D2 MSNs (D1 MSNs, light versus pre-light: 262.22 ± 24.93 pA versus 240.76 ± 23.84 pA, $p < 0.05$, Wilcoxon test, $n = 15$ cells; D2 MSNs, light versus pre-light: 231.06 ± 34.00 pA versus 198.06 ± 24.07 pA, $p < 0.05$, Wilcoxon test, $n = 9$ cells) (Figure S5B). This potentiation was blocked by scopolamine (10 μ M) (data pooled for D1 and D2 MSNs: light versus pre-light: 181.24 ± 35.92 pA versus 178.31 ± 33.35 pA, ns, paired Student's t test, $n = 8$ cells, data not shown). These results show that CIN inhibition potentiates corticostriatal transmission onto both D1 and D2 MSNs in parkinsonian condition. Therefore, corticostriatal transmission is unlikely to contribute to a differential impact of CIN inhibition on D1 and D2 MSNs.

In the healthy striatum, cholinergic modulation facilitates the firing of MSNs through M1 receptors (Galarraga et al., 1999; Goldberg et al., 2012; Pisani et al., 2007). What happens after chronic DA depletion is still unclear. We therefore examined whether and how CIN photoinhibition impacts MSN excitability in non-lesioned and 6-OHDA mice. D1 and D2 MSNs fired significantly less action potential during light illumination in both non-lesioned and 6-OHDA mice (Figures 5A and 5B). However, while the magnitude of firing inhibition was similar in D2 and D1 MSNs in non-lesioned mice, firing inhibition was weaker in D2 MSNs compared to D1 MSNs in 6-OHDA mice (Figure 5C). This result shows that D2 MSNs are less sensitive to CIN inhibition than D1 MSNs after DA depletion.

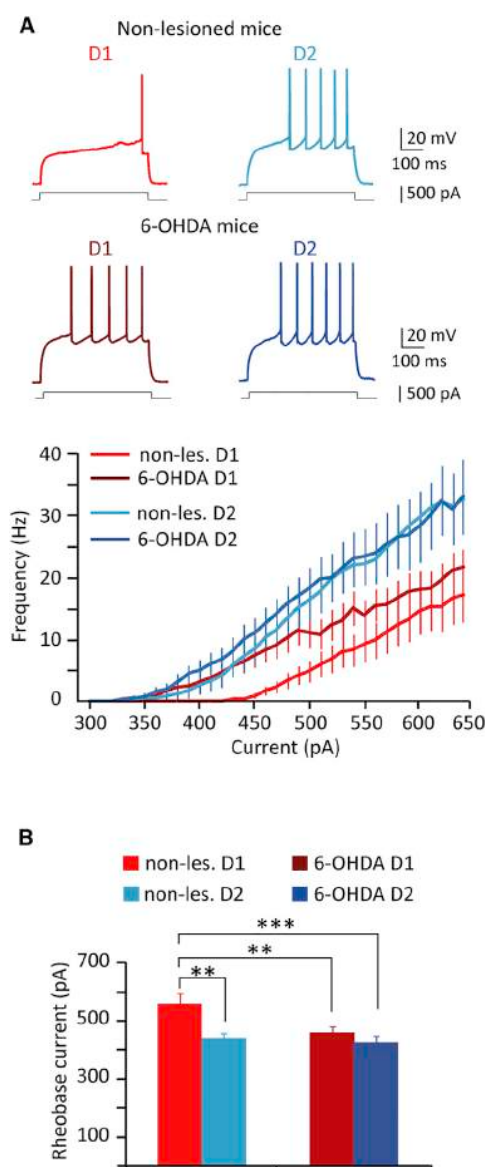


Figure 4. Impact of 6-OHDA Lesion on D1 and D2 MSN Excitability

(A) Current-clamp recordings showing the responses of D1 and D2 MSNs to depolarizing current pulses in non-lesioned (+450 pA) and 6-OHDA (+400 pA) mice. Summary graph illustrates the number of action potentials as a function of injected current in D1 MSNs (non-lesioned mice, $n = 14$ cells; 6-OHDA mice, $n = 23$ cells) and D2 MSNs (non-lesioned mice, $n = 13$ cells; 6-OHDA mice, $n = 13$ cells).

(B) Bars graph shows the mean rheobase current in D1 MSNs (non-lesioned mice, $n = 14$ cells; 6-OHDA mice, $n = 23$ cells) and D2 MSNs (non-lesioned mice, $n = 13$ cells; 6-OHDA mice, $n = 13$ cells) (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Holm-Sidak test after significant one-way ANOVA). Error bars, SEM.

DISCUSSION

Although ACh is undeniably a critical player in striatal functioning, the role of CINs in PD pathophysiology has remained un-

solved. We tackled this issue by combining optogenetics with in vitro and in vivo electrophysiology and behavioral analyses. We first showed that selective inhibition of CINs in the dorsal striatum reduces parkinsonian motor dysfunction in pharmacological and lesional PD models, attesting to their causal involvement in PD symptomatology. This provides a functional support for the long-standing hypothesis that poses PD as a striatal cholinergic disorder. Second, we identified several physiological parameters affected by CIN inhibition in the parkinsonian condition at both the input (striatum) and output (SNr) levels of the basal ganglia network. In addition, we found that CIN inhibition does not significantly impact basic motor function nor the spontaneous and cortically driven activity of SNr neurons in non-lesioned mice. This lack of effect in SNr is consistent with previous results from selective CIN ablation (Sano et al., 2013). Also, CIN inhibition does not modify the severity of dyskinesia in 6-OHDA mice. Altogether, these data suggest that CIN actions are highly dependent on DA tone.

CIN inhibition in vivo efficiently alleviates parkinsonian deficits measured after 6-OHDA lesions and neuroleptic-induced catalepsy, two different models widely used to assess motor symptoms reminiscent of parkinsonian akinesia. As neural correlates of PD symptoms' improvement by CIN inhibition, our in vivo recordings showed that it normalized the 6-OHDA-induced changes in SNr burst firing. Over the last few years, an abundant literature has clearly reported that parkinsonism is associated with increased bursting activity in the basal ganglia, including SNr (Lobb, 2014; Rivlin-Etzion et al., 2006; Wichmann et al., 1999). Even though the mechanisms leading to this abnormal activity are still elusive, its normalization by efficient antiparkinsonian treatments, such as dopaminy or subthalamic nucleus deep brain stimulation (Brown, 2003; Degos et al., 2005; Eusebio et al., 2011), suggests that such change may contribute importantly to the development of the behavioral manifestations of the disease. Thus, it is likely that the decrease in burst activity of SNr neurons elicited by CIN inhibition contributes to the improvement of parkinsonian symptoms that we observed in 6-OHDA mice. Future studies will be required to understand fully how CINs influence SNr burst firing in PD.

The second effect of CIN inhibition revealed by our in vivo recordings in 6-OHDA mice was an increase in the inhibitory component of the cortically evoked triphasic response in SNr neurons, suggesting that CIN silencing strengthens the inhibitory influence of the direct striatonigral pathway in parkinsonian condition. Although the relationship between the activity of the direct and indirect pathways and movement generation is still under debate, it has been demonstrated that specific activation of D1 MSNs by optogenetics efficiently relieves parkinsonian deficits (Kravitz et al., 2010). In this context, it is likely that the increased duration of the cortically evoked inhibition induced by CIN inhibition contributes importantly to the improvement of parkinsonian-like motor symptoms induced by DA depletion.

What are the striatal targets modulated by CINs that could mediate their preponderant action on basal ganglia function in PD state? We showed that CIN inhibition in 6-OHDA mice potentiates corticostriatal transmission onto both types of MSNs. However, our recordings in the SNr of 6-OHDA mice clearly showed that CIN inhibition increases the cortically evoked

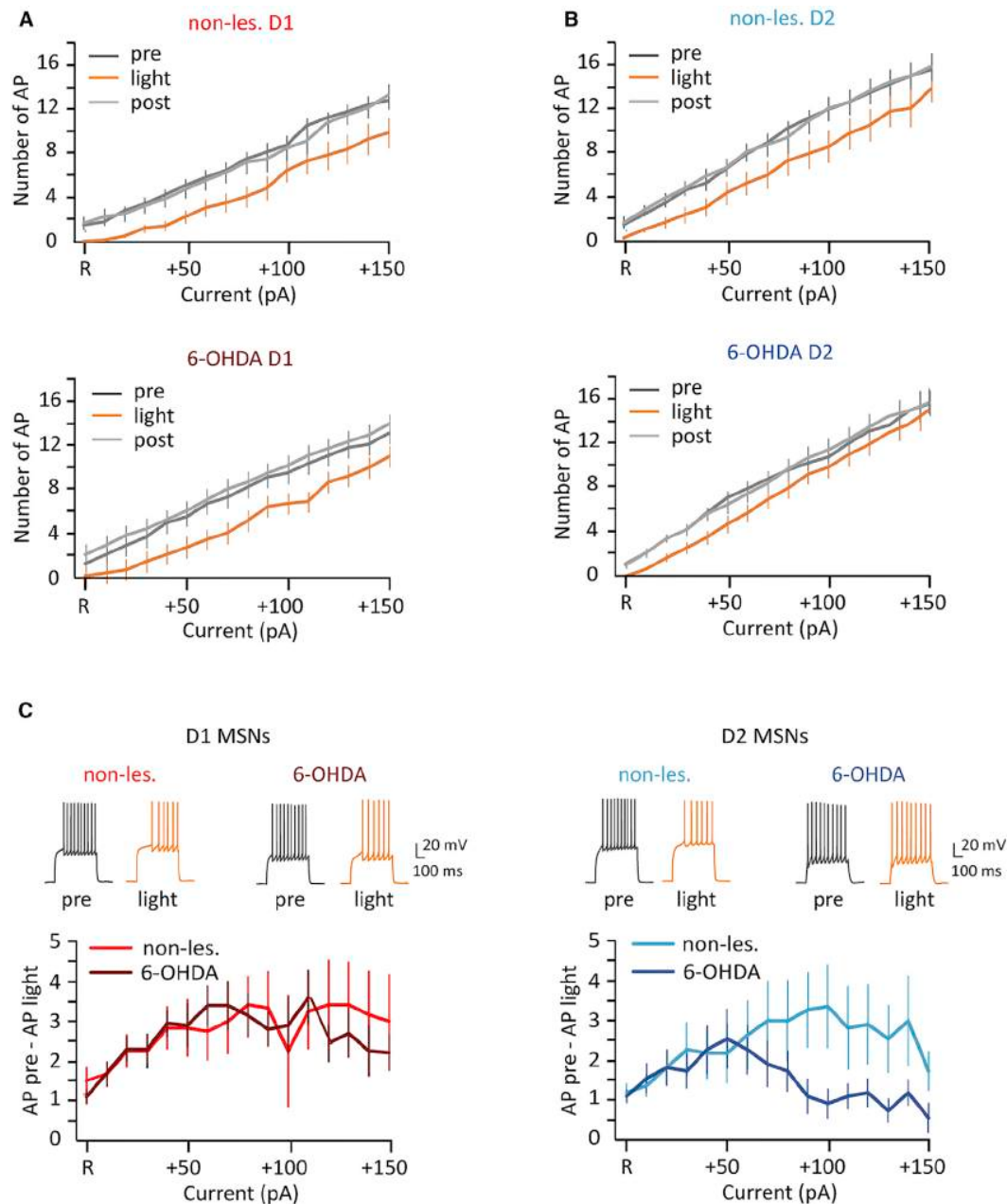


Figure 5. Photoinhibition of CINs Differentially Decreases D1 and D2 MSN Excitability in 6-OHDA Mice

(A and B) The graphs illustrate the decreased excitability of MSNs during light illumination versus pre and post conditions in non-lesioned (A, top; D1 MSNs: $F(2, 572) = 55.26$, $p < 0.0001$, $n = 12$; B, top; D2 MSNs: $F(2, 524) = 37.97$, $p < 0.0001$, $n = 11$, linear regression analysis) and 6-OHDA (A, bottom; D1 MSNs: $F(2, 953) = 209.72$, $p < 0.0001$, $n = 20$; B, bottom; D2 MSNs: $F(2, 524) = 17.09$, $p < 0.0001$, $n = 11$, linear regression analysis) mice. R is the minimal current intensity to trigger a spike in pre-light condition. From R, current intensity increased by +10-pA increment.

(C) (Top) Representative traces showing the responses to 500-ms depolarizing current steps (R+80 for D1 MSN non-les., D2 MSN non-les., and D2 MSN 6-OHDA) and R+110 (D1 MSN 6-OHDA). Light was delivered 200 ms before and continued 200 ms after the 500-ms depolarizing current step. (Bottom) The graphs show the difference in the number of action potentials evoked in pre versus light conditions in D1 MSNs (left; non-les., $n = 12$; 6-OHDA, $n = 20$) and D2 MSNs (right; non-les., $n = 11$; 6-OHDA, $n = 11$). There is a significant effect of current intensity in D1 MSNs ($F[15,450] = 3.67$, $p < 0.005$) and D2 MSNs ($F[15,300] = 2.02$, $p < 0.01$). From R+80 pA, D2 MSNs in 6-OHDA mice are less inhibited during light illumination, as shown by a significant interaction between lesion $\times$ current intensity for D2 MSNs ($F[15,300] = 2.39$, $p < 0.05$), but not for D1 MSNs. Errors bars, SEM.

inhibition linked to the activation of the direct (D1) pathway, but not the late excitation linked to the activation of the indirect (D2) pathway. The high degree of convergence of the direct pathway at the level of the SNr (48 striatal neurons converge into one SNr cell; [Smith et al., 1998](#)) may explain how a modest increase in corticostriatal transmission onto D1 MSNs impacts the cortically evoked inhibition in the SNr. In contrast, complex information processing at each stage of the polysynaptic indirect pathway might minimize the outcome of EPSC potentiation on D2 MSNs.

Another interesting result of our study is that DA depletion tends to erase the dichotomy in MSN excitability by inducing a specific increase in D1 MSN excitability. A recent study also reported increased D1 MSN excitability after DA lesion, but associated with a slight decrease in D2 MSN excitability ([Fieblinger et al., 2014](#)), whereas we failed to detect any change for D2 MSNs. This apparent discrepancy might be due to different lesion models or post-lesion delay, since opposite changes in D2 MSN excitability have been described after acute or chronic DA depletion ([Day et al., 2006](#); [Fieblinger et al., 2014](#); [Shen et al., 2007](#)). Elevated excitability in D1 MSNs might be considered as a homeostatic response counteracting the decreased activity triggered by the loss of dopaminergic excitatory drive on these neurons. However, if we assume that the dichotomy between D1 and D2 MSN excitability is a fundamental process for normal striatal function, making both MSNs more alike after DA depletion might be more harmful than beneficial. In favor of this hypothesis, we showed that CIN inhibition decreases the excitability more in D1 than in D2 MSNs after DA depletion, whereas it has similar impact on the two populations in control condition. Thus, restoring the dichotomy between D1 and D2 MSN excitability might be one component of the anti-parkinsonian effect of CIN inhibition. What happens following DA depletion to explain the reduced sensitivity of D2 MSNs to CIN inhibition remains an open and challenging question. It will be also interesting to investigate whether the cholinergic projection from the brainstem to the striatum ([Dautan et al., 2014](#)) cooperates with CINs to modulate striatal output.

Our results show that CINs are critical players in the host of cellular and synaptic changes induced in MSNs by DA depletion. Without excluding indirect pathway contributions, our findings point to CIN control of the direct striatonigral pathway as a critical component involved in the control of striatal output and motor dysfunction in PD state. These results should stimulate the development of therapeutic strategies targeting striatal CIN activity in PD.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

All procedures were approved by the French National Ethical Committee (45-29102012) and were in accordance with the recommendations of the European Commission (2010/63/EU) for care and use of laboratory animals. See the [Supplemental Experimental Procedures](#) for a detailed description of the mice used.

Stereotaxic Surgery

All coordinates were adapted from the mouse stereotaxic atlas by [Paxinos and Franklin \(2001\)](#) with bregma and dura as references. See the [Supplemental Experimental Procedures](#) for details.

In Vitro Electrophysiology

Patch-clamp recordings on brain slices and data analysis were performed as described in the [Supplemental Experimental Procedures](#). Excitation of opsins was achieved with a light-emitting diode source (Spectra light engine, Lumen-cor) connected to a 3-mm liquid core fiber. Statistical analyses were performed using paired or unpaired Student's *t* test. Nonparametric tests (Mann-Whitney test for unpaired data or Wilcoxon test for paired data) were used if the normality or equal variance test failed. For multiple group comparisons, one- or two-way ANOVA was used. We applied the log2 transformation to make the data normal if necessary. Linear regression analysis was used to compare the effect of CIN inhibition on MSN excitability. A significance of *p* < 0.05 was required for rejection of the null hypothesis.

Behavioral Testing

All behavioral analyses were conducted on littermates that entered the study at around 3–5 months of age. See the [Supplemental Experimental Procedures](#) for a detailed description of the behavioral tests. For open field, data were analyzed using two-way ANOVA followed by paired Student's *t* test, when appropriate. For haloperidol-induced catalepsy, median latencies ($\pm$ semi-quartile) were compared among groups over time using the nonparametric Kruskal-Wallis test, followed by U-Mann-Whitney for pairwise comparisons at each time. Head movements were summed for the 3-min ON periods and compared to those measured 3-min OFF periods, using a two-way ANOVA. For cylinder and cross maze tests, data were analyzed using one-way ANOVA, followed by Student's *t* test. For L-DOPA-induced dyskinesia, data were analyzed by two-way repeated-measures (RM) ANOVA with opsins (eNpHR-RFP versus RFP) as between factor and time as within factor.

In Vivo Recordings in Anesthetized Mice

Extracellular recordings in the striatum and the SNr were performed as described in the [Supplemental Experimental Procedures](#). The patterns of cortically evoked discharges in the same SNr neuron were analyzed before, during, and after CIN photoinhibition in the striatum. Results are given as means $\pm$ SEM of the individual responses per condition. Spontaneous activity in the three conditions was compared using one-way ANOVA followed by comparison versus pre-light condition (Holm-Sidak method). Cortically evoked responses of the same SNr neurons in the three light conditions were compared using one-way RM ANOVA, followed by comparison versus pre-light condition (Holm-Sidak method).

Histology and Immunohistochemistry

For primary antibody exposure, brain sections were incubated overnight at 4°C in rabbit anti-RFP (1/1,000, tebu-bio, 600-401-379) and goat anti-ChAT (1/100, Millipore, AB144P) for colocalization experiments and in mouse anti-tyrosine hydroxylase (1/1,000, Millipore, MAB318) to control DA lesion. Sections were then incubated, respectively, in Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit (1/500, Invitrogen, A31572), Alexa Fluor 488 donkey anti-goat (1/500, Invitrogen, A11055), and Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse (1/500, Invitrogen, A31570) for 1 hr 30 min at room temperature. Rabbit anti-GFP (1/500, Invitrogen, A11122) and Alexa fluor 488 donkey anti-rabbit (1/500, Invitrogen, A21206) were used the same way to reveal eNpHR expression in transgenic mice.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, five figures, and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.034>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

N.M., M.L., M.A., L.K.-L., and C.B. designed the study. N.M., M.L., F.J., S.Z., M.H., J.C., and C.B. performed experiments. K.D. provided reagents and critical feedback. N.M., M.L., F.J., S.Z., J.C., L.K.-L., M.A., and C.B. analyzed the results. N.M., M.L., M.A., L.K.-L., and C.B. wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNRS, Aix-Marseille Université, Fondation de France (2013 00043175), France Parkinson Association, and Agence Nationale de la Recherche (ANR-2010-1416). We thank C. Melon, C. Marra, and D. Paleressompoulle for their excellent technical assistance. Microscopy was performed at PICSL-FBI core facility, member of the France-BioImaging national research infrastructure. We thank R. Ragheb, B. Burle, and P. Gubellini for statistical analysis; and A. Moqrich and P. Marcaggi for their critical comments on the manuscript.

Received: October 23, 2014

Revised: August 25, 2015

Accepted: September 10, 2015

Published: October 15, 2015

REFERENCES

- Albin, R.L., Young, A.B., and Penney, J.B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366–375.
- Aosaki, T., Graybiel, A.M., and Kimura, M. (1994). Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys. *Science* 265, 412–415.
- Barbeau, A. (1962). The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Can. Med. Assoc. J.* 87, 802–807.
- Brown, P. (2003). Oscillatory nature of human basal ganglia activity: relationship to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 18, 357–363.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V., and Di Filippo, M. (2014). Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat. Neurosci.* 17, 1022–1030.
- Cui, G., Jun, S.B., Jin, X., Pham, M.D., Vogel, S.S., Lovinger, D.M., and Costa, R.M. (2013). Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494, 238–242.
- Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Witten, I.B., Deisseroth, K., Bolam, J.P., Gerdjikov, T., and Mena-Segovia, J. (2014). A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the brainstem. *J. Neurosci.* 34, 4509–4518.
- Day, M., Wang, Z., Ding, J., An, X., Ingham, C.A., Shering, A.F., Wokosin, D., Ilijic, E., Sun, Z., Sampson, A.R., et al. (2006). Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat. Neurosci.* 9, 251–259.
- Degos, B., Deniau, J.M., Thierry, A.M., Glowinski, J., Pezard, L., and 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.
- Ding, J., Guzman, J.N., Tkatch, T., Chen, S., Goldberg, J.A., Ebert, P.J., Levitt, P., Wilson, C.J., Hamm, H.E., and Surmeier, D.J. (2006). RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat. Neurosci.* 9, 832–842.
- English, D.F., Ibanez-Sandoval, O., Stark, E., Tecuapetla, F., Buzsáki, G., Deisseroth, K., Tepper, J.M., and Koos, T. (2011). GABAergic circuits mediate the reinforcement-related signals of striatal cholinergic interneurons. *Nat. Neurosci.* 15, 123–130.
- Eusebio, A., Thevathasan, W., Doyle Gaynor, L., Poghosyan, A., Bye, E., Foltynie, T., Zrinzo, L., Ashkan, K., Aziz, T., and Brown, P. (2011). Deep brain stimulation can suppress pathological synchronisation in parkinsonian patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 82, 569–573.
- Fieblinger, T., Graves, S.M., Sebel, L.E., Alcacer, C., Plotkin, J.L., Gertler, T.S., Chan, C.S., Heiman, M., Greengard, P., Cenci, M.A., and Surmeier, D.J. (2014). Cell type-specific plasticity of striatal projection neurons in parkinsonism and L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Commun.* 5, 5316.
- Galarraga, E., Hernández-López, S., Reyes, A., Miranda, I., Bermudez-Rattoni, F., Vilchis, C., and Bargas, J. (1999). Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J. Neurosci.* 19, 3629–3638.
- Gertler, T.S., Chan, C.S., and Surmeier, D.J. (2008). Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 28, 10814–10824.
- Goldberg, J.A., Ding, J.B., and Surmeier, D.J. (2012). Muscarinic modulation of striatal function and circuitry. *Handb. Exp. Pharmacol.* 208, 223–241.
- Hernández-Echeagaray, E., Galarraga, E., and Bargas, J. (1998). 3-Alpha-chloro-imperialine, a potent blocker of cholinergic presynaptic modulation of glutamatergic afferents in the rat neostriatum. *Neuropharmacology* 37, 1493–1502.
- Higley, M.J., Gittis, A.H., Oldenburg, I.A., Balthasar, N., Seal, R.P., Edwards, R.H., Lowell, B.B., Kreitzer, A.C., and Sabatini, B.L. (2011). Cholinergic interneurons mediate fast VGLUT3-dependent glutamatergic transmission in the striatum. *PLoS ONE* 6, e19155.
- Kravitz, A.V., Freeze, B.S., Parker, P.R., Kay, K., Thwin, M.T., Deisseroth, K., and Kreitzer, A.C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622–626.
- Kreitzer, A.C., and Malenka, R.C. (2007). Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* 445, 643–647.
- Lobb, C. (2014). Abnormal Bursting as a Pathophysiological Mechanism in Parkinson's Disease. *Basal Ganglia* 3, 187–195.
- Malenka, R.C., and Kocsis, J.D. (1988). Presynaptic actions of carbachol and adenosine on corticostriatal synaptic transmission studied in vitro. *J. Neurosci.* 8, 3750–3756.
- Mallet, N., Ballion, B., Le Moine, C., and Gonon, F. (2006). Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *J. Neurosci.* 26, 3875–3884.
- Maurice, N., Deniau, J.M., Glowinski, J., and Thierry, A.M. (1999). Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat: physiology of the cortico-nigral circuits. *J. Neurosci.* 19, 4674–4681.
- Nelson, A.B., Hammack, N., Yang, C.F., Shah, N.M., Seal, R.P., and Kreitzer, A.C. (2014). Striatal cholinergic interneurons Drive GABA release from dopamine terminals. *Neuron* 82, 63–70.
- Pakhotin, P., and Bracci, E. (2007). Cholinergic interneurons control the excitatory input to the striatum. *J. Neurosci.* 27, 391–400.
- Paxinos, G., and Franklin, K.B.J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition (San Diego: Academic Press).
- Phelps, P.E., Houser, C.R., and Vaughn, J.E. (1985). Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. *J. Comp. Neurol.* 238, 286–307.
- Pisani, A., Bernardi, G., Ding, J., and Surmeier, D.J. (2007). Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci.* 30, 545–553.
- Rivlin-Etzion, M., Marmor, O., Heimer, G., Raz, A., Nini, A., and Bergman, H. (2006). Basal ganglia oscillations and pathophysiology of movement disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 629–637.
- Ryan, L.J., and Sanders, D.J. (1994). Subthalamic nucleus and globus pallidus lesions alter activity in nigrothalamic neurons in rats. *Brain Res. Bull.* 34, 19–26.
- Sano, H., Chiken, S., Hikida, T., Kobayashi, K., and Nambu, A. (2013). Signals through the striatopallidal indirect pathway stop movements by phasic excitation in the substantia nigra. *J. Neurosci.* 33, 7583–7594.
- Shen, W., Tian, X., Day, M., Ulrich, S., Tkatch, T., Nathanson, N.M., and Surmeier, D.J. (2007). Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat. Neurosci.* 10, 1458–1466.
- Smith, Y., Bevan, M.D., Shink, E., and Bolam, J.P. (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86, 353–387.

Tachibana, Y., Kita, H., Chiken, S., Takada, M., and Nambu, A. (2008). Motor cortical control of internal pallidal activity through glutamatergic and GABAergic inputs in awake monkeys. *Eur. J. Neurosci.* 27, 238–253.

Threlfell, S., Lalic, T., Platt, N.J., Jennings, K.A., Deisseroth, K., and Cragg, S.J. (2012). Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron* 75, 58–64.

Tritsch, N.X., Oh, W.J., Gu, C., and Sabatini, B.L. (2014). Midbrain dopamine neurons sustain inhibitory transmission using plasma membrane uptake of GABA, not synthesis. *eLife* 3, e01936.

Wichmann, T., Bergman, H., Starr, P.A., Subramanian, T., Watts, R.L., and DeLong, M.R. (1999). Comparison of MPTP-induced changes in spontaneous neuronal discharge in the internal pallidal segment and in the substantia nigra pars reticulata in primates. *Exp. Brain Res.* 125, 397–409.

Witten, I.B., Lin, S.-C., Brodsky, M., Prakash, R., Diester, I., Anikeeva, P., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., and Deisseroth, K. (2010). Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science* 330, 1677–1681.

Cell Reports

Supplemental Information

**Striatal Cholinergic Interneurons Control
Motor Behavior and Basal Ganglia Function
in Experimental Parkinsonism**

**Nicolas Maurice, Martine Liberge, Florence Jaouen, Samira Ztaou, Marwa Hanini,
Jeremy Camon, Karl Deisseroth, Marianne Amalric, Lydia Kerkerian-Le Goff, and
Corinne Beurrier**

SUPPLEMENTAL DATA

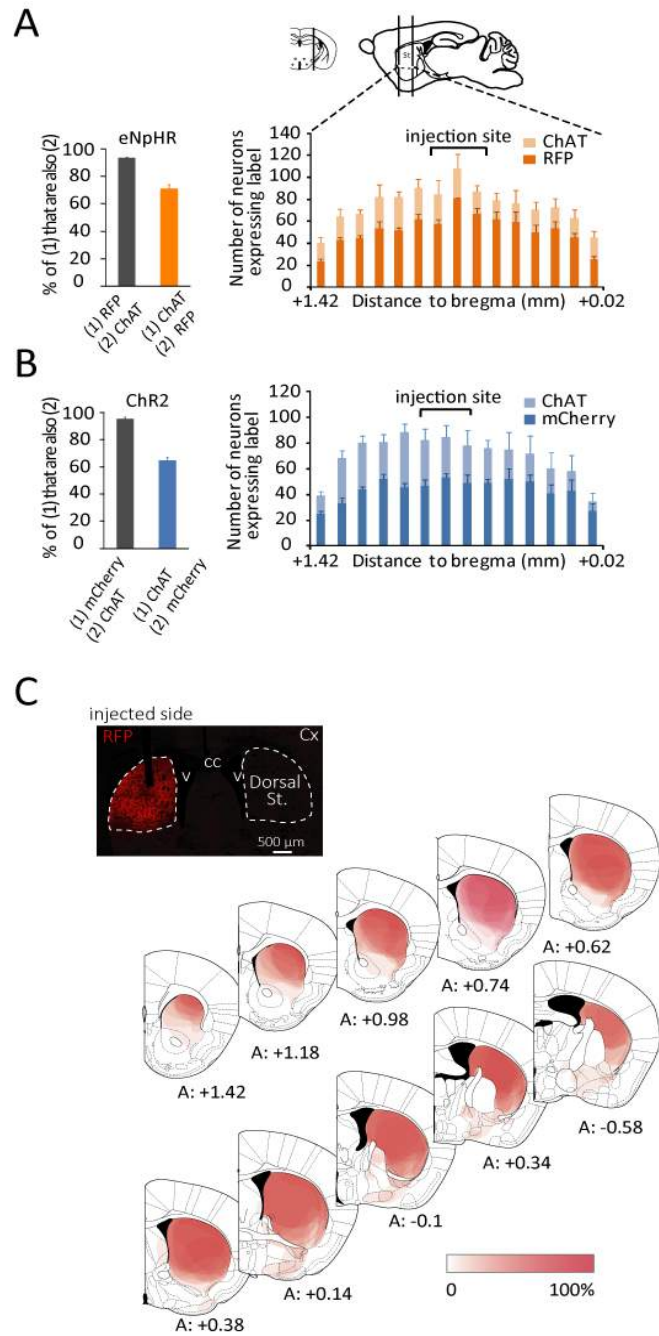


Figure S1, Related to Supplemental Experimental Procedures: Specific expression of opsins in CINs (A and B) and topography of RFP staining in eNpHR-RFP-injected mice (C).

(A, B) Left, histograms represent the mean coexpression in the whole dorsal striatum in eNpHR-RFP (n=2) or ChR2-mCherry (n=2) mice. Virtually all opsin-expressing neurons were ChAT-positive. The majority of neurons that expressed ChAT also expressed eNpHR-RFP ($71.0 \pm 2.9\%$) or ChR2-mCherry ($64.7 \pm 2.6\%$). Right, quantification of co-expression of RFP and mCherry and ChAT

immunofluorescence from two bilaterally eNpHR-RFP-injected and ChR2-mCherry-injected mice, from the rostral-to-caudal ends of the dorsal striatum (from +1.42 to +0.02 mm). Errors bars, SEM. (C) Top, coronal section showing a representative RFP staining from an eNpHR-RFP-injected mouse. The track shows the location at which viral injection, followed by implantation of optical fiber, was made. Note the large diffusion of eNpHR-RFP in nearly the whole dorsal striatum. Cx: cortex, cc: corpus callosum, v: ventricle, St: striatum. Bottom, coronal schematic sections from the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson showing the topography of RFP staining in eNpHR-RFP mice (from +1.42 to -0.58 mm with bregma as reference, n=14 mice). The intensity of the gradient of color (white to red) corresponds to the measured RFP positive area in the different brain structures studied for each injection performed. The highest intensity of red (100%) indicates that all animals had signal in the corresponding area, whereas the lowest color intensity (white, 0%) corresponds to non-stained areas. RFP labeling outside the striatum was very scarce and localized ventrally in the nucleus accumbens or caudally in the ventral pallidum and the bed nucleus of the stria terminalis.

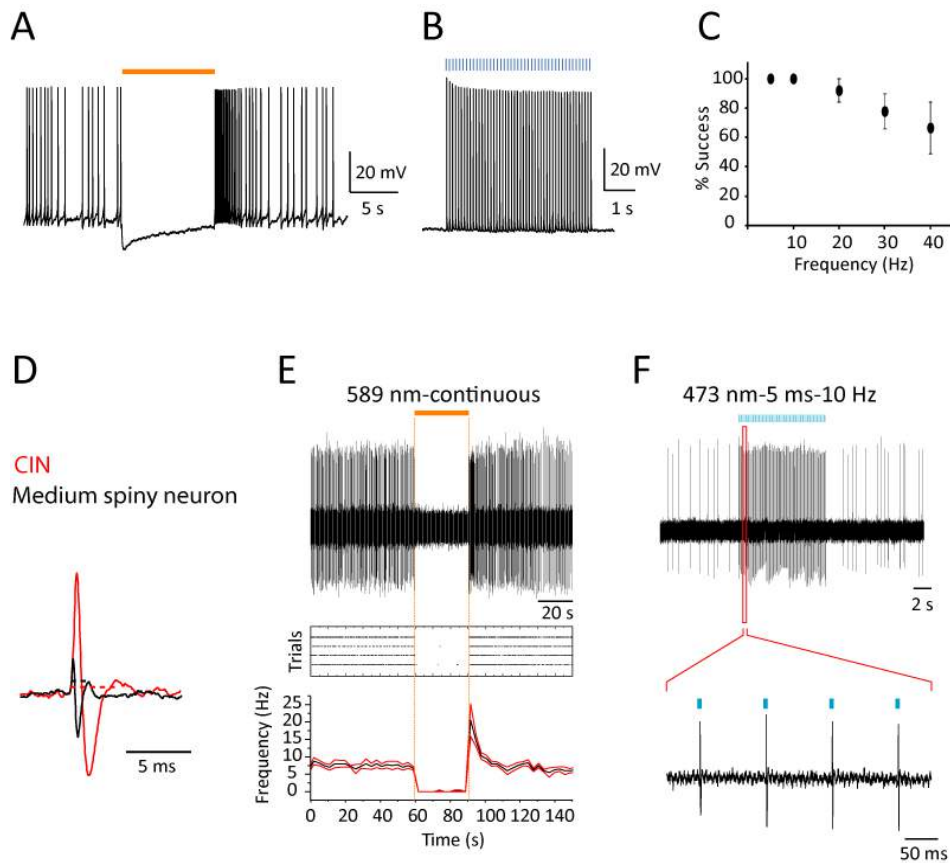


Figure S2: Functional expression of ChR2-mCherry and eNpHR-RFP in CINs both *in vitro* (A, B and C) and *in vivo* (D, E and F).

(A) Action potential inhibition induced by 10 s yellow light illumination in a eNpHR-RFP-expressing neuron. (B) Action potentials in a ChR2-mCherry-expressing neuron evoked by 5-ms blue light pulses (10 Hz). (C) Average success probability for generating action potentials in neurons expressing ChR2-mCherry at different stimulation frequencies ($n=4-5$, 5-ms pulse width). (D) Superimposed recordings of a CIN and a medium spiny neuron. CINs were distinguished from medium size spiny neurons by their typical tonic activity and spike duration. Dotted lines indicate spike duration. (E) Raw trace (top) of an isolated unit, identified as a CIN, inhibited by yellow light continuous stimulation. Raster plot (middle) displaying the response of the same unit to four repetitions of the light stimulation, with each action potential represented as a dot. Average and SEM of the firing rate over time (bottom) for the same unit. (F) Raw trace (top) of another putative CIN that is excited by 5ms-blue light pulses (10 Hz). Note at higher magnification that every light pulse drives a spike (bottom). Errors bars, SEM.

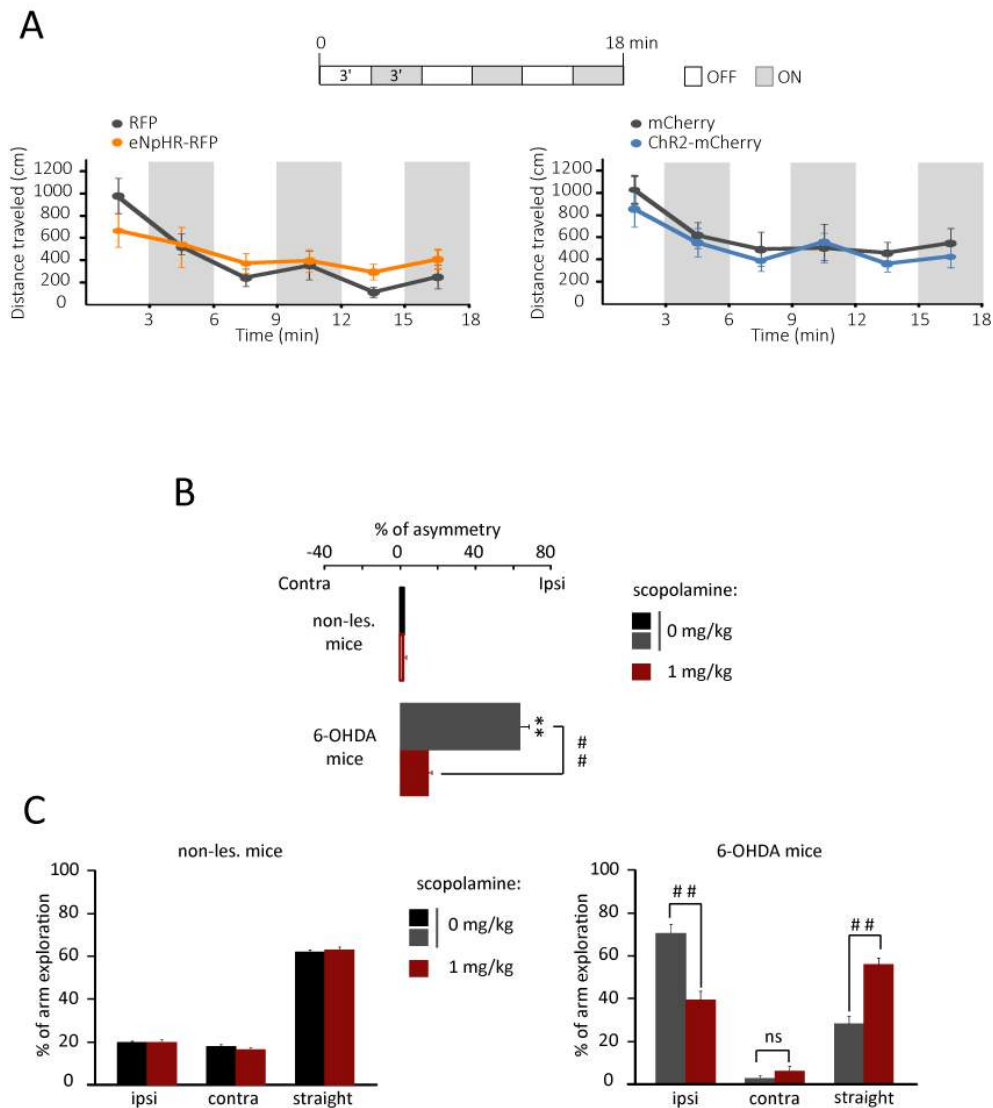


Figure S3, related to Figure 1: (A) Effects of CIN manipulation on the spontaneous locomotor activity in non-lesioned mice. Top, experimental design. Graphs show the locomotor activity before (OFF) and during (ON) bilateral striatal illumination in RFP, eNpHR-RFP, mCherry and ChR2-mCherry mice, in 3-min period. No change in ambulation was observed in response to photoinhibition or photoactivation of CINs in either group (two-way ANOVA, ns), $n=6-9$ per group. (B, C) Muscarinic receptors blockade with scopolamine relieves parkinsonian-like motor deficits. B, in the cylinder test, 6-OHDA mice ($n=14$) showed a marked forelimb asymmetry compared to non-lesioned mice ($*p<0.01$, Fisher PLSD test after significant ANOVA $F_{3,40}=76.66$). This asymmetry was significantly improved by intraperitoneal (i.p.) scopolamine injection (scopolamine 1 mg/kg vs. 0 mg/kg: $\# p<0.01$, Student's t test). Scopolamine did not affect asymmetry in non-lesioned mice ($n=8$). C, non-lesioned mice ($n=8$) placed in the cross-maze perform mainly straight-arm exploration with equivalent percentage of ipsi- or contralateral arms

exploration (* $p < 0.01$, Fisher PLSD test after significant ANOVA $F_{5,35}=402.9$). 6-OHDA lesion induced a bias in arms exploration with a dramatic increase in ipsilateral turns and decrease in contralateral and straight exploration. Scopolamine significantly modified the performance of 6-OHDA mice ($n=14$) in the cross-maze (significant one-way ANOVA $F_{5,65}=48.58$, $p < 0.01$). It significantly decreased ipsilateral arm exploration (# $p < 0.01$, Student's t test) and increased straight exploration (# $p < 0.01$, Student's t test) while not affecting contralateral bias (ns, Student's t test). Errors bars, SEM.

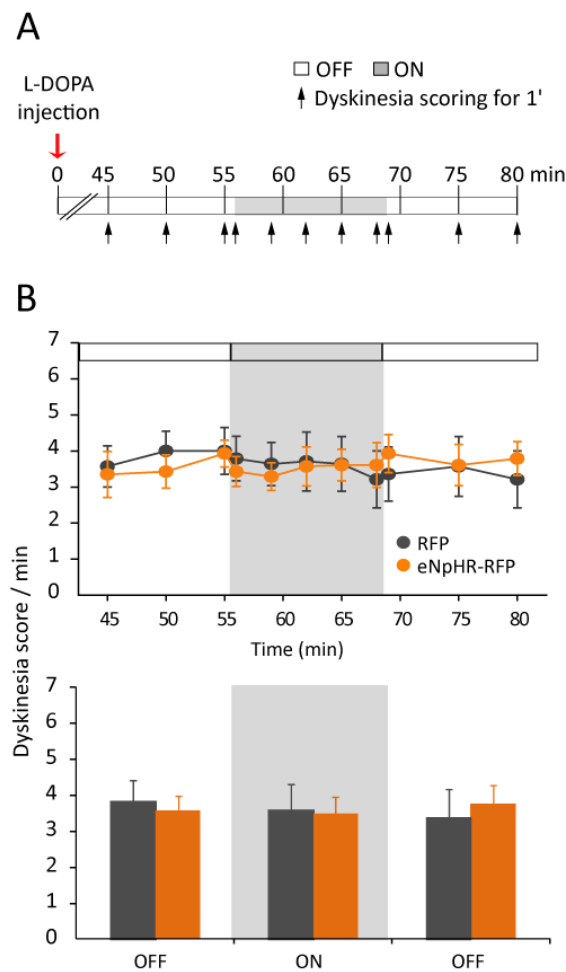


Figure S4: Photoinhibition of CINs does not affect L-DOPA-induced dyskinesia.

(A) Experimental design. Two weeks after intranigral injection of 6-OHDA, RFP and eNpHR-RFP mice received a chronic L-DOPA treatment for 21 days and dyskinesia were quantified at day 21. (B) Time profile of dyskinesia score (sum of the mean scores for axial and forelimb dyskinesia over 35 min; maximum score 8) after L-DOPA injection on day 21 of chronic treatment. Light did not produce a significant difference in dyskinesia score (two-way repeated measure ANOVA, ns, $n = 7$ per group). Errors bars, SEM.

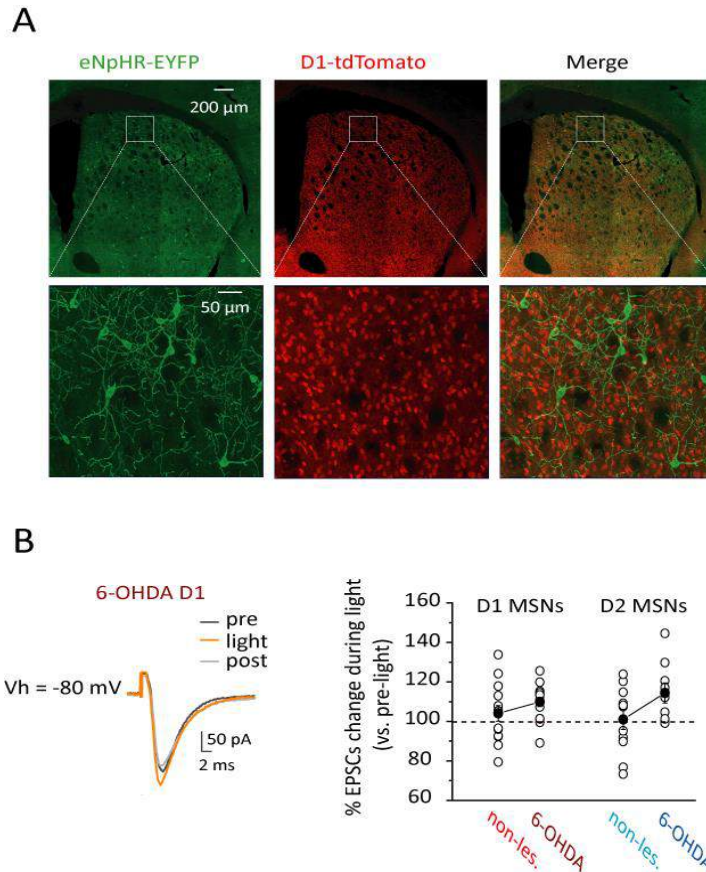


Figure S5, related to Figures 4 and 5: (A) Representative photomicrographs of a transgenic eNpHR/D1 mouse. Dorsal striatum sections showing eNpHR-EYFP expressing cells that are immunostained with antibodies against GFP (green) and D1-MSNs which are visualized by the direct fluorescence of tdTomato (red). Merge image shows no colocalization. (B) Photoinhibition of CINs potentiates corticostriatal transmission onto both populations of MSNs in 6-OHDA mice. EPSCs traces from a D1 MSN recorded in a 6-OHDA mouse before, during and after light illumination. Light was sent 50 ms before cortical stimulation and continue 250 ms after. Graph illustrates the value of EPSCs change during light illumination compared to pre-light condition in all cells. Black circles represent the mean. Errors bars, SEM.

	Frequency of discharge (Hz)		Burst recurrence (burst/s)		Burst duration (s)		Number of spikes/burst	
	Non-lesioned (n = 18)	6-OHDA (n = 13)	Non-lesioned	6-OHDA	Non-lesioned	6-OHDA	Non-lesioned	6-OHDA
Pre	14.4 ± 1.7	12.3 ± 1.4	0.218 ± 0.057	0.258 ± 0.070	0.384 ± 0.033	0.517 ± 0.052*	9.5 ± 0.6	14.0 ± 1.1**
Light	13.2 ± 1.8	11.1 ± 1.5	0.247 ± 0.053	0.315 ± 0.068	0.398 ± 0.036	0.374 ± 0.031#	9.4 ± 0.5	9.5 ± 0.5##
Post	13.0 ± 1.7	11.9 ± 2.1	0.255 ± 0.046	0.290 ± 0.075	0.460 ± 0.030	0.404 ± 0.028	10.6 ± 0.5	11.9 ± 0.6

Table S1, related to Figure 2: Effect of 6-OHDA lesion and impact of CIN photoinhibition on spontaneous activity of SNr neurons in transgenic eNpHR mice.

* p<0.05, ** p<0.01, unpaired Student's *t* test, 6-OHDA vs. non-lesioned mice. #p<0.05, ##p<0.01, one-way ANOVA followed by Holm-Sidak post-hoc test, vs. pre-light condition.

		Early excitation			Inhibition		Late excitation		
		L (ms)	D (ms)	Nb Sp	L (ms)	D (ms)	L (ms)	D (ms)	Nb Sp
Non-lesioned	Pre-Light	11.0 ± 0.9 (n = 13)	7.5 ± 0.7	45.5 ± 8.3	22.8 ± 1.2 (n = 18)	25.4 ± 3.2	45.1 ± 3.4 (n = 13)	8.5 ± 1.0	44.0 ± 6.3
	Light	10.9 ± 0.9	8.1 ± 1.2	47.6 ± 7.7	21.8 ± 1.1	25.4 ± 3.9	43.9 ± 3.4	9.2 ± 1.2	44.9 ± 7.1
	Post-Light	11.5 ± 0.8	8.7 ± 0.8	54.0 ± 8.8	22.0 ± 1.2	25.3 ± 2.4	44.0 ± 2.3	9.6 ± 1.0	47.5 ± 8.6
6-OHDA	Pre-Light	11.0 ± 2.5 (n = 6)	9.0 ± 2.9	60.3 ± 13.4	22.3 ± 1.5 (n = 9)	23.0 ± 4.3	58.0 ± 7.1 (n = 10)	33.8 ± 5.9	133.4 ± 32.1
	Light	10.0 ± 3.0	8.0 ± 2.5	55.0 ± 17.1	19.3 ± 1.7	36.3 ± 6.4**	62.2 ± 10.2	35.8 ± 9.2	137.6 ± 26.7
	Post-Light	10.0 ± 2.6	9.3 ± 2.1	50.0 ± 23.3	20.0 ± 2.6	32.4 ± 4.8	61.2 ± 8.5	38.2 ± 4.8	119.2 ± 32.4

Table S2, related to Figure 2: Characteristics of the responses evoked on the same SNr cells by electrical stimulation of the motor cortex in non-lesioned and 6-OHDA transgenic eNpHR mice, before, during and following CINs photoinhibition.

The latency (L) and duration (D) of the different components of the cortically evoked response were measured on the basis of post-stimulus time histograms generated from 100 cortical stimulations. Nb Sp: number of spikes of the excitatory component.

**p≤0.01, one-way repeated measure ANOVA followed by Holm-Sidak post-hoc test, vs. pre-light condition.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice. All mice strains used in this study were purchased from Jackson Laboratory. We used Choline acetyltransferase ChAT-IRES-Cre knock-in mice (ChAT^{cre/cre} mice, stock number: 006410), LoxP-stop-eNpHR3.0-EYFP mice (Ai39 mice, stock number: 014539) and BAC Drd1a-tdTomato mice (Tg^{D1-tdTomato} mice, stock number: 016204). Ai39 mice were crossed with ChAT^{cre/cre} mice to induce eNpHR3.0 expression in cholinergic neurons and were used for *in vivo* electrophysiology (Rosa^{eNpHR/+::ChAT^{cre/+}} mice that were called transgenic eNpHR mice in this study). For *in vitro* electrophysiological experiments requiring distinguishing D1 and D2 MSNs, Rosa^{eNpHR/+::ChAT^{cre/+}} mice were crossed with Tg^{D1-tdTomato} mice to obtain both eNpHR expression in the cholinergic neurons and dtTomato expression in the direct(D1)-MSNs (Rosa^{eNpHR/+::ChAT^{cre/+}}:Tg^{D1-tdTomato} mice that were called transgenic eNpHR/D1 mice in this study) (Figure S5).

Stereotaxic surgery. Mice were anaesthetized with intraperitoneal (i.p.) injections of ketamine and xylazine (100 and 10 mg/kg, respectively) and mounted on a stereotaxic apparatus (Kopf Instruments). Injections were made with a 10- μ l syringe, connected to the injector by a polyethylene tubing, and controlled by an injection pump at 0.3 μ l/min.

Viral expression of opsins in CINs. pAAV vectors containing opsins transgenes (ChR2: pAAV-Ef1a-DIO-hChR2(H134R)-mCherry and eNpHR: pAAV-Ef1a-DIO-eNpHR3.0-EYFP) were provided by Dr. Deisseroth (Stanford University). For practical consideration, we switched EYFP by TagRFP by overlap extension PCR cloning method. The recombinant AAV vectors were serotyped with AAV5 coat proteins and packaged by the viral vector core at the University of North Carolina. To achieve Cre-dependent expression of opsins in CINs, we microinjected 1 μ l of AAV at two dorso-ventral sites into the dorsal striatum of ChAT^{cre/cre} mice (+1.0 mm AP, $\pm$ 1.5 mm ML, -2.7 and -2.1 mm DV). Opsin-expressing neurons were largely confined to the dorsal striatum (Figure S1B). Mice that were used in behavioral experiments were then implanted with a bilateral guide cannula (+1.0 mm AP, $\pm$ 1.5 mm ML, 26 gauge, positioned 2.5-mm below skull; PlasticsOne). All viral injections were made unilaterally except for *in vitro* recordings and haloperidol-induced catalepsy.

6-OHDA lesions. Mice received one unilateral injection of 6-OHDA hydrochloride (1.5 μ l at 2.7 μ g/ μ l diluted in 0.9% sterile NaCl containing 0.1% ascorbic acid, Sigma-Aldrich) into the substantia nigra pars compacta: -3.0 mm AP, $\pm$ 1.3 mm ML, -4.3 mm DV. 6-OHDA injection was immediately followed by unilateral intrastriatal viral injection and experiments were performed at least two weeks later. DA lesion extent was systematically assessed by anti-tyrosine hydroxylase immunohistochemistry.

Optic fiber implantation. For L-DOPA-induced dyskinesia experiments that required long-term treatment, we used implantable optical fibers consisting of a zirconia ferrule with a 200- μ m diameter

and 3.3 mm-long cleaved bare optic fibers (0.22 N.A., Doric Lenses). Fibers were implanted ipsilaterally to the lesioned side at the following coordinates: +1.0 mm AP, $\pm$ 1.5 mm ML, -2.0 mm DV.

***In vitro* electrophysiology.** Coronal striatal slices (250 μ m) from 7 to 10-week-old bilaterally AAV-injected or transgenic mice were cut in ice-cold high-choline artificial cerebro-spinal fluid (ACSF) with a vibratome (Leica) as previously described (Beurrier et al., 2009). Recordings from 6-OHDA mice were performed 2 to 3 weeks after 6-OHDA injection and the extent of DA lesion was systematically assessed a posteriori by anti-tyrosine hydroxylase immunohistochemistry in the striatum. Only mice exhibiting >70% of DA depletion compared to the non-injected hemisphere were kept for the analysis. Slices were then transferred to oxygenated ACSF and maintained at room temperature until recording. Neurons were visualized on an upright microscope (Nikon Eclipse FN1) equipped with DIC optic and filters set to visualize mCherry, TagRFP, tdTomato and EYFP using a x40 water-immersion objective. Combination of electrophysiological properties and expression of fluorophore was used to identify CINs and D1 MSNs while unlabeled MSNs were considered as D2 MSNs. Recordings were interleaved in labeled D1 MSNs and unlabeled putative D2 MSNs from the same mice. Patch-clamp recordings were performed in cell-attached and whole-cell configurations in current- or voltage-clamp mode in oxygenated ACSF warmed to 33°C. Patch-clamp electrodes (4-6 M Ω) were filled with an intracellular solution containing 126 mM KMeSO₄, 14 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM NaATP and 0.5 mM NaGTP, pH adjusted to 7.25 with NaOH and osmolarity adjusted to 270-280 mOsm/L. To activate opsins, light was delivered under control of the acquisition software from a Spectra Light Engine (Lumencor, Optoprim) and was focused onto the back aperture of the microscope objective, producing a wide-field exposure around the recorded cell.

MSN excitability was tested at least 5 min after seal rupture by sending a series of 500 ms depolarizing current steps with an increment of 10 pA. For trials in which CINs were photoinhibited, light was ON 200 ms before and continues 200 ms after the 500 ms depolarizing current step, making the total illumination time equal to 900 ms. The time interval between each current step was 3 s. EPSCs were elicited by current pulses (0.1-ms width every 10 s) using a bipolar tungsten electrode placed preferentially at the motor cortex-dorsal striatum border to stimulate afferents from the motor cortex. For trials in which CINs were photoinhibited, light was ON 50 ms before cortical stimulation and continues 250 ms after. EPSCs amplitudes were calculated on at least 10 averaged traces by taking a mean of a 1-ms window around the peak and comparing this with the mean of a 3-ms window immediately before the stimulation artifact. Series resistances were monitored with a 5-mV negative step given with every afferent stimulus. Data were collected with a MultiClamp 700B amplifier (Molecular Devices), analyzed and plotted in clampfit (Molecular Devices, v 10.2) and Origin (v 7.5).

Behavioral testing. Open-field. Spontaneous locomotor activity was evaluated in an open field placed in a dim lighted room. Before testing, mice were acclimated to the testing room for at least 1 h. RFP, eNpHR-RFP, mCherry and Chr2-mCherry mice were tested for 18 min in a square chamber (50 x 50 cm) with a 30 cm-high white plastic wall. CINs were photoactivated (25-ms pulse width, 10 Hz) or photoinhibited (continuous illumination) during 3-min ON periods interspersed with 7-min OFF periods. Ambulation was defined as the total distance (in cm) covered by each mouse measured by 3-min bin for 18 min and recorded by a video track system (Viewpoint Life sciences Inc.).

Haloperidol-induced catalepsy. Optical fibers were inserted into the bilateral cannula just before haloperidol injection. Mice received 0.25 mg/kg haloperidol i.p. After 20 min, mice forepaws were placed on an horizontal bar 4 cm above the floor and the latency to step down was measured (with a cut-off of 120 s) every 10 min during the 80-min test (Figure 1A). Head movements were also measured continuously for the whole test duration. Mice received either blue (25-ms pulse width, 10 Hz) or yellow (continuous illumination) light 20 min after haloperidol injection. Light was ON for 3-min during which catalepsy was measured and then turned OFF for 7 min until the next measurement started.

Cylinder test. Mice were put into Plexiglas cylinders (20 cm height, 9 cm diameter) in order to evaluate motor asymmetry induced by 6-OHDA lesion. The number of contacts against the cylinder wall with the forepaws (weight-bearing contacts with fully extended digits) was monitored continuously for 5 min by two investigators blind of experimental conditions. A double contact was defined as simultaneous or closely performed ipsilateral and contralateral forepaws touches. Mice failing to reach 10 contacts were excluded from the analyses. Data are expressed as side bias calculated as % ipsilateral minus % contralateral contacts to the 6-OHDA lesioned side. All mice were tested only once to prevent habituation to the apparatus. Two groups of eNpHR-RFP or Chr2-mCherry 6-OHDA-lesioned mice were tested either in ON or OFF condition (yellow light: continuous illumination for 5 min, blue light: 25-ms pulse width, 10 Hz) and compared to the non-lesioned group. The same experiment was performed in two groups of RFP or mCherry 6-OHDA mice.

Cross maze test. Mice were placed into a cross maze consisting of 4 identical arms (45 cm × 7 cm × 15 cm) at 90° to each other and made with clear Plexiglas. The acquisition sessions started with the mouse placed in the middle, facing one arm. The number of ipsilateral and contralateral turns as well as the number of time the mouse went straight was monitored for 5 min. Pre-6-OHDA data were collected and then, 2 weeks after 6-OHDA lesions, mice were tested twice: one to collect post-6-OHDA data without light and the day after with the light ON (yellow light: continuous illumination for 5 min, blue light: 25-ms pulse width, 10 Hz).

L-DOPA-induced dyskinesia. Fifteen to eighteen days after 6-OHDA injections, mice received a single daily injection of L-DOPA (20 mg/kg) and benserazide hydrochloride (10 mg/kg) for 21 days. The abnormal involuntary movements (AIMs) were assessed by two investigators blind of subject viral

infections (eNpHR-RFP or RFP). Peak-dose dyskinesia scoring was performed for 1 min at different time points, 45 to 80 min after the last L-DOPA injection on day 21 (Figure S4). Axial and limb AIMs were scored using a previously established scale from 0 to 4 for each AIM subtype (Lundblad et al., 2004) and the sum of the 2 scores, defined as dyskinesia score, was determined for each animal (maximal score, 8). Yellow light was delivered during 13 min, starting 56 min after L-DOPA injections. For experiments involving scopolamine injection (scopolamine hydrobromide, Sigma-Aldrich), scopolamine was dissolved with NaCl and administered by i.p. injection at a dose of 1 mg/kg in ChAT^{cre/cre} mice.

Optogenetic photostimulation and photoinhibition in awake mice. Optical fiber (200 μ m- diameter, 0.22 N.A., Doric Lenses) was inserted without anesthesia through the implanted cannula (tip protruding 0.3 mm). For bilateral illumination, optical fibers were connected to the laser through a rotary joint (FRJ_1x2i_FC-2FC, Doric Lenses) that sent half of the light coming from the laser into each of the two optical fibers inserted in the mouse brain and enabled the mouse to move freely during behavioral assessments. Light was provided by a yellow- (589 nm, 75.2 mW) and blue- (473 nm, 118.5 mW) laser (Combined Dual Wavelength DPSS Laser System, Laserglow). Optical-fiber light power was measured using a light sensor and intensity calculated using the model based on direct measurements in mammalian brain tissue for predicting irradiance values developed in K. Deisseroth's lab and available at <http://www.stanford.edu/group/dlab/cgi-bin/graph/chart.php>. Light intensity at 0.2 mm from fiber tip was calculated to be 11.3 and 20.0 mW/mm² for blue and yellow light, respectively (corresponding to 200 and 140 mW/mm² at the fiber tip).

In vivo recordings in anaesthetized mice. Non-lesioned and 6-OHDA lesioned (at least two weeks post-lesion) transgenic eNpHR mice were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (100 and 10 mg/kg i.p., respectively, supplemented as needed by i.p. injection during the course of the experiment) and fixed in a stereotaxic head frame (Horsley-Clarke apparatus; Unimécanique). Body temperature was monitored by a rectal thermometer and maintained at 36.5°C with a homeothermic blanket (Harvard Apparatus). Single-unit activity of SNr cells was recorded extracellularly using glass micropipettes (25-35 M Ω) filled with a 0.5 M sodium chloride solution containing 1.5 % neurobiotin (Vectors Laboratories Inc.). Single neuron action potentials were recorded using the active bridge mode of an Axoclamp-2B amplifier (Molecular Devices), amplified, and filtered with an AC/DC amplifier (DAM 50; World Precision Instruments). Nigral neurons were identified as non-dopaminergic by their classically defined electrophysiological characteristics: narrow spikes (width $\leq$ 2 ms) and ability to present relatively high frequency discharges (> 10 Hz) without decrease in spike amplitude (Deniau et al., 1978). The optical fiber (core 200 μ m, N.A. 0.22, Dorics Lenses) was positioned in the striatum (+1.0

mm AP, ± 1.5 mm ML, -2.0 mm DV). The cortical and SNr areas to stimulate and record, respectively, were precisely defined by anterograde and retrograde tracing methods consisting in an iontophoretic deposit, at these striatal coordinates, of wheat germ agglutinin horseradish peroxidase (Vector Laboratories). This striatal territory receives inputs from the motor cortical area stimulated (+2.1 mm AP, ± 0.5 mm ML, -0.7 mm DV) and sends projections to the recording site in the SNr (-3.3 mm AP, ± 1.5 mm ML, -4.0/-4.8 mm DV). The patterns of cortically-evoked responses in the same SNr neuron were analyzed before, during and after CIN photoinhibition in the striatum. Yellow light was delivered for 5 min (589 nm, power at the tip of optical fiber: 140 mW/mm²). Only SNr cells presenting an inhibitory component in response to cortical stimulation were recorded as they were the only ones to receive direct inputs from the striatal area activated by cortical stimulation meaning they belonged to the basal ganglia channel in register with the cortical area stimulated. This inhibitory component was preceded and/or followed by excitations due to the activation of the two trans-subthalamic pathways. Population post-stimulus time histograms (PSTHs) were generated by aligning the evoked responses on the onset of the inhibitory component. Results are given as means $\pm$ SEM of the individual responses per condition.

Spontaneous activity of SNr neurons was analyzed before, during and after CIN photoinhibition in the striatum by sampling a period of 60 s in each condition. Yellow light was delivered for 5 min (589 nm, power at the tip of optical fiber: 140 mW/mm²). Epochs of elevated discharge rate were classified as bursts using a Poisson Surprise analysis (Legendy and Salcman, 1985). This was done using a script written for the Spike2 software. Briefly, this analysis evaluates how improbable any given burst, that contains n spikes in a time interval T , occurred by chance and computed as follows: $S = -\log p$, where p is the probability that, in a random (Poisson) spike train having the same average spikes rate r as the spike train studied, a given time interval of length T contains n or more spikes. p is given by Poisson's formula, as follows:

$$p = e^{-rT} \sum_{i=n}^{\infty} (rT)^i / i!$$

where S refers to the Poisson Surprise of the burst (the degree to which the burst surprises a person who expects the spike train to be a Poisson process). In this study, only spike trains with $S \geq 2$ were considered to be bursts. At the end of electrophysiological experiments, the tip of the stimulating electrodes was marked by an electrical deposit of iron (5 μ A anodal, 20 s) and the tip of the recording electrodes was marked by iontophoretic ejection of Chicago Sky Blue (Sigma, 4% in NaCl 0,6 M; 8 μ A cathodal, 20 min). Brains were removed and fixed in a 10% formalin solution after a ferri-ferrocyanide reaction. The localization of the blue points and iron deposits were observed on serial frozen sections (70 μ m) counterstained with safranin O (Sigma). All the recorded cells kept in the analysis were localized in the SNr.

Histology, immunohistochemistry and microscopy. Animals were deeply anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine and then transcardially perfused with an ice-cold solution of paraformaldehyde 4% in PBS. After dissection, brains were post-fixed overnight in the same fixative at 4 °C, cryoprotected in 30% sucrose dissolved in 1X PBS for an additional 36 h at 4 °C, and frozen. Coronal cryostat sections (40 µm) covering the antero-posterior extent of the striatum or the substantia nigra pars compacta were used for labeling. Brain sections were permeabilized in PBS with 0.4% Triton X-100 (PBST) for 30 min at room temperature. Sections were then incubated in a blocking solution composed of PBST with 3% bovine serum albumin and 10% normal goat serum for 1h at room temperature. Immunostaining was done on free-floating sections, which were then mounted onto SuperFrost Plus glass slides (VWR) and coverslipped with FluorSave mounting media (Merck Chemicals). Quantification of colocalization was performed from approximately bregma +1.42 to +0.02 mm (around 14 sections per mouse) using Mercator System (Explora Nova) combined with a DMR Leica microscope coupled to a DXC-990P color video camera (Sony). Images were collected using Axio Imager Z1 with the Apotome system (Zeiss) with a Plan-Apochromat 20×/0.8 or a Plan-Neofluar x40/1.3 objective (Zeiss) for the high magnification or with a Plan-Apochromat 10×/0.45 objective (Zeiss) to acquire whole-brain images.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

Beurrier, C., Lopez, S., Révy, D., Selvam, C., Goudet, C., Lhérondel, M., Gubellini, P., Kerkerian-LeGoff, L., Acher, F., Pin, J.-P., et al. (2009). Electrophysiological and behavioral evidence that modulation of metabotropic glutamate receptor 4 with a new agonist reverses experimental parkinsonism. *FASEB J.* 23, 3619–3628.

Deniau, J.M., Hammond, C., Risz, A., and Feger, J. (1978). Electrophysiological properties of identified output neurons of the rat substantia nigra (pars compacta and pars reticulata): evidences for the existence of branched neurons. *Exp. BRAIN Res.* 32, 409–422.

Kolomiets, B.P., Deniau, J.M., Glowinski, J., and Thierry, A.M. (2003). Basal ganglia and processing of cortical information: functional interactions between trans-striatal and trans-subthalamic circuits in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 117, 931–938.

Legendy, C.R., and Salcman, M. (1985). Bursts and recurrences of bursts in the spike trains of spontaneously active striate cortex neurons. *J. Neurophysiol.* 53, 926–939.

Lundblad, M., Picconi, B., Lindgren, H., and Cenci, M.A. (2004). A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol. Dis.* 16, 110–123.

Article 2

Article 2

But de l'étude

Afin de caractériser les récepteurs cholinergiques muscariniques potentiellement impliqués dans les effets antiparkinsoniens induits par la photoinhibition des ChIs striataux observés dans notre première étude, nous avons évalué les effets du blocage pharmacologique des récepteurs muscariniques (mAChRs) M1 et M4, en raison de leur expression prédominante dans le striatum.

Pour cela, nous avons effectué une batterie de tests moteurs évaluant, chez la souris, la bradykinésie (test du pôle), l'asymétrie posturale (test du cylindre), le déficit sensori-moteur (test du cross maze) et le comportement rotatoire exacerbée par l'injection d'amphétamine dans le modèle de lésion unilatérale à la 6-OHDA injectée au niveau de la SNc. Nous avons utilisé une approche pharmacologique périphérique (voie intrapéritonéale i.p.) et centrale (voie intrastriatale i.s.) en injectant des antagonistes présentant des affinités préférentielles pour chacun des deux sous-types des mAChRs : la télenzépine, un antagoniste préférentiel des mAChRs M1 et la tropicamide, un antagoniste préférentiel des mAChRs M4.

Principaux résultats

Les données comportementales confirment que la photoinhibition des ChIs induit des effets bénéfiques en réduisant la bradykinésie, l'asymétrie posturale et le déficit sensori-moteur dans le modèle de lésion unilatérale 6-OHDA.

L'injection périphérique de scopolamine (1 mg/kg i.p.), antagoniste non-sélectif des mAChRs, s'est révélée être aussi efficace que le traitement de référence de la maladie de Parkinson (L-DOPA, 3 mg/kg i.p.). La scopolamine réduit l'asymétrie posturale et le déficit sensori-moteur dans le modèle de lésion unilatérale 6-OHDA.

Plus spécifiquement, les injections périphériques et intrastriales de l'antagoniste des mAChRs M1 (Télenzépine, 0.3 et 3 mg/kg i.p., 0.75 et 7.5 µg i.s.) et de l'antagoniste des mAChRs M4 (Tropicamide, 2.5 et 10 mg/kg i.p., 1 et 6 µg i.s.) produisent les mêmes effets antiparkinsoniens que la scopolamine, révélant l'implication de ces deux sous-types de mAChRs, au niveau du striatum, dans l'expression des déficits moteurs induits par la lésion unilatérale 6-OHDA.

Alors que la télenzépine bloque l'action des mAChRs M1 exprimés au niveau post-synaptique sur les deux populations de MSNs-D1 et MSNs-D2, la tropicamide induit un blocage des mAChRs M4 exprimés aussi bien au niveau post-synaptique sur les MSNs-D1 à l'origine de la voie directe qu'au niveau pré-synaptique sur les ChIs. L'amélioration des déficits moteurs après l'injection intrastriale de tropicamide suggère une action préférentielle de l'acétylcholine sur les mAChRs M4 exprimés en post-synaptique sur les MSNs-D1.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé des souris *knock-out* génétiquement modifiées n'exprimant pas de mAChRs post-synaptiques M4 sur les MSNs-D1 de la voie directe (souris D1-M4-KO) gracieusement donné par le laboratoire de Y. Wess (NIH Bethesda, USA). Chez les souris D1-M4-KO lésées unilatéralement par la 6-OHDA, l'injection intrastriale de tropicamide (0.1 et 1 µg) n'a plus aucun effet antiparkinsonien sur les déficits moteurs.

Conclusion

Cette seconde étude montre l'implication des mAChRs M1 et M4 du striatum dorsal dans l'expression des déficits moteurs induits par la lésion unilatérale des neurones dopaminergiques de la SNc. Leur blocage pharmacologique permet de réduire les déficits moteurs et suggère que l'action de l'acétylcholine, dans les conditions pathologiques, s'effectue sur les mAChRs M1 et sur les mAChRs M4 préférentiellement exprimés sur les MSNs-D1 à l'origine de la voie directe.

Involvement of Striatal Cholinergic Interneurons and M1 and M4 Muscarinic Receptors in Motor Symptoms of Parkinson's Disease

 Samira Ztaou,¹ Nicolas Maurice,² Jeremy Camon,¹ Gaëlle Guiraudie-Capraz,³ Lydia Kerkerian-Le Goff,² Corinne Beurrier,² Martine Liberge,^{1*} and  Marianne Amalric^{1*}

¹Aix Marseille University, Centre National de la Recherche Scientifique, LNC, FR3C, 13331 Marseille cdx 03, France, ²Aix Marseille University, Centre National de la Recherche Scientifique, IBDM, 13288 Marseille cdx 09, France, and ³Aix Marseille University, Centre National de la Recherche Scientifique, NICN, 13344 Marseille cdx 15, France

Over the last decade, striatal cholinergic interneurons (ChIs) have reemerged as key actors in the pathophysiology of basal-ganglia-related movement disorders. However, the mechanisms involved are still unclear. In this study, we address the role of ChI activity in the expression of parkinsonian-like motor deficits in a unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion model using optogenetic and pharmacological approaches. Dorsal striatal photoinhibition of ChIs in lesioned ChAT^{cre/cre} mice expressing halorhodopsin in ChIs reduces akinesia, bradykinesia, and sensorimotor neglect. Muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) blockade by scopolamine produces similar anti-parkinsonian effects. To decipher which of the mAChR subtypes provides these beneficial effects, systemic and intrastriatal administration of the selective M1 and M4 mAChR antagonists telenzepine and tropicamide, respectively, were tested in the same model of Parkinson's disease. The two compounds alleviate 6-OHDA lesion-induced motor deficits. Telenzepine produces its beneficial effects by blocking postsynaptic M1 mAChRs expressed on medium spiny neurons (MSNs) at the origin of the indirect striatopallidal and direct striatonigral pathways. The anti-parkinsonian effects of tropicamide were almost completely abolished in mutant lesioned mice that lack M4 mAChRs specifically in dopamine D1-receptor-expressing neurons, suggesting that postsynaptic M4 mAChRs expressed on direct MSNs mediate the antiakinetic action of tropicamide. The present results show that altered cholinergic transmission via M1 and M4 mAChRs of the dorsal striatum plays a pivotal role in the occurrence of motor symptoms in Parkinson's disease.

Key words: basal ganglia; cholinergic interneurons; motor symptoms; muscarinic receptors; Parkinson's disease; striatum

Significance Statement

The striatum, where dopaminergic and cholinergic systems interact, is the pivotal structure of basal ganglia involved in pathophysiological changes underlying Parkinson's disease. Here, using optogenetic and pharmacological approaches, we investigated the involvement of striatal cholinergic interneurons (ChIs) and muscarinic receptor subtypes (mAChRs) in the occurrence of a wide range of motor deficits such as akinesia, bradykinesia, motor coordination, and sensorimotor neglect after unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesion in mice. Our results show that photoinhibition of ChIs in the dorsal striatum and pharmacological blockade of muscarinic receptors, specifically postsynaptic M1 and M4 mAChRs, alleviate lesion-induced motor deficits. The present study points to these receptor subtypes as potential targets for the symptomatic treatment of parkinsonian-like motor symptoms.

Introduction

Parkinson's disease is the most common movement disorder and is associated with akinesia, rigidity, and tremor but also cognitive

deficits (Obeso et al., 2000). Neuropathologically, it is defined by a massive degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons. Antimuscarinic drugs were the first widely accepted treatment

Received March 16, 2016; revised July 12, 2016; accepted July 16, 2016.

Author contributions: S.Z., N.M., J.C., L.K.-L., C.B., M.L., and M.A. designed research; S.Z., N.M., J.C., G.G.-C., C.B., and M.L. performed research; S.Z., N.M., and M.A. analyzed data; S.Z., L.K.-L., C.B., M.L., and M.A. wrote the paper.

This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Aix-Marseille University, French Ministry of Education and Research, France Parkinson Association, National Research Agency (ANR-2010-1416),

and within the context of the DHUNE project supported by A*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02). We thank J. Wess (National Institutes of Health, Bethesda) for generating and generously providing D1-M4-KO mice; V. Gilbert and E. Mansour for animal care; I. Watabe and F. Jaouen for immunohistochemical assistance; and D. Paleressompoulle, D. Louber, and C. Marra for technical assistance.

The authors declare no competing financial interests.

*M.L. and M.A. are co-senior authors.

before the discovery of 3,4-dihydroxy-phenyl-L-alanine (L-DOPA), the dopaminergic replacement therapy. They are mainly prescribed to treat tremor (Lees, 2005) and hypertonia, but produce troublesome side effects, including urinary retention, nausea, falls, and cognitive impairment. However, the discovery of drugs acting on specific muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) subtypes has raised renewed interest in the modulation of striatal cholinergic signaling to alleviate basal ganglia disorders (Wess et al., 2007; Eskow Jaunarajs et al., 2015; Shen et al., 2015).

Increased excitability of the tonically active striatal cholinergic interneurons (ChIs), which represent 1–2% of all striatal neurons, may contribute to the dysregulated striatal output pathways in the parkinsonian state because of their dense terminal fields that are primarily directed to the medium spiny neurons (MSNs), which constitute 95% of the striatal neuronal population (Tepper and Bolam, 2004; Silberberg and Bolam, 2015). Current views of basal ganglia dysfunction suggest that an imbalance between acetylcholine (ACh) and dopamine (DA) activity in the striatum is central to the development of motor symptoms (Di Chiara et al., 1994; Pisani et al., 2007), although recent studies have demonstrated complex and complementary interaction between these two systems upon thalamic stimulation (Threlfell et al., 2012; Parker et al., 2016). In addition, striatal dopaminergic depletion produces profound alterations in the corticostriatal glutamatergic inputs and in GABAergic MSNs (Calabresi et al., 2000; Surmeier et al., 2014; Tritsch and Carter, 2016). The DA D1-receptor-expressing MSNs of the direct pathway (D1-MSNs), which project directly to the substantia nigra pars reticulata (SNr) output structure of the basal ganglia, become hypoactive, whereas D2-receptor-expressing MSNs (D2-MSNs) of the indirect pathway, which project to the globus pallidus and then the subthalamic nucleus and the SNr, become functionally hyperactive (Albin et al., 1989). This classical view of basal ganglia functional organization has recently been challenged (Calabresi et al., 2014; Tecuapetla et al., 2014).

ChIs have a wide range of striatal effects through both muscarinic and nicotinic receptors signaling. Muscarinic receptors (mAChRs) are highly expressed within the striatum and primarily on MSNs (Zhou et al., 2003; Kreitzer, 2009). Five distinct G-protein-coupled mAChRs (M1–M5) have been cloned and divided into two main classes according to their pharmacological properties and transduction mechanisms (Wess et al., 2007). The M1 class (M1, M3, and M5) is coupled to Gq/11, whereas the M2-class (M2 and M4) is coupled to Gi/o proteins. Receptor localization studies have revealed a predominant expression of M1 and M4 mAChRs within the striatum, whereas M2 and M3 mAChRs are clearly less abundant (Zhang et al., 2002; Zhou et al., 2003; Pisani et al., 2007; Langmead et al., 2008; Bonsi et al., 2011). Both types of MSNs possess postsynaptic M1 mAChRs, whereas M4 mAChRs are preferentially expressed postsynaptically on D1-MSNs. M4 mAChRs are also found presynaptically on ChIs, where they mediate a negative feedback control on ACh release. The rationale for blocking these receptors selectively in the parkinsonian state deserves to be investigated.

Defining the role of striatal ChIs on motor functions has regained interest using techniques that allow selective ablation of striatal ChIs by diphtheria toxin (Won et al., 2014) or

immunotoxin-mediated cell-targeting techniques (Kaneko et al., 2000; Hikida et al., 2001). Optogenetic modulation of striatal ChIs provides a potent way to decipher ChI functions in the parkinsonian condition in a reversible manner. Here, we used a mice model of Parkinson's disease to investigate the role of ChIs and M1 or M4 mAChRs in the control of motor function.

Materials and Methods

Animals

Optogenetics. Choline acetyltransferase (ChAT)-IRES-Cre knock-in mice (ChAT^{cre/cre} mice, stock number 006410, RRID:IMSR_JAX:006410) were purchased from Jackson Laboratory.

Pharmacology. Wild-type male C57BL/6 mice (RRID:IMSR_JAX:000664) 8 weeks of age were purchased from Charles River Laboratories. D1-M4-KO mice were generated as described previously (Jeon et al., 2010). Homozygous floxed M4 female mice were crossed with homozygous floxed M4 male mice that carry the D1-Cre transgene. The resulting mutant mice were then intermated to generate mutant mice that lacked M4 mAChRs only in D1-receptor-expressing neurons (M4 fl/fl D1-Cre mice; referred to as D1-M4-KO mice). This mating scheme also yielded floxed M4 mAChRs mice lacking the D1-Cre transgene. These mice were used as control animals throughout the experiments (M4 fl/fl mice; also referred to as control littermates).

Mice were housed in groups of 4–5 with food and water *ad libitum* in a temperature-controlled room (24°C) on a 12:12 h dark/light cycle (lights on at 07:00). All procedures were approved by the French National Ethical Committee (authorization no. 00196.01) and in accordance with the recommendations of the EEC (2010/63/UE) for the care and use of laboratory animals.

Genotyping

Genotyping were performed by PCR analysis of mouse tail genomic DNA using the following primers: forward, 5'-CCTGGAAATGCTTCTG TCCG-3' and reverse, 5'-CAGGGTGTTATAAGCAATCCC-3'. After an activation step of 10 min at 94°C, the amplification reactions were performed for 32 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 60°C, and 45 s at 72°C, followed by an additional step at 72°C for 7 min. PCRs were run on an iCycler Thermal Cycler apparatus (Bio-Rad) and PCR products were visualized by electrophoresis in 2% agarose gels. The amplicons were visualized with ethidium bromide by digital scanning with the Bio-Vision image acquisition system (Vilber-Lourmat).

Stereotaxic surgery

Mice were anesthetized with intraperitoneal injections of ketamine and xylazine (100 and 10 mg/kg, respectively) and mounted on a stereotaxic apparatus (Kopf Instruments). Injections were made with a 10 μ l Hamilton microsyringe connected to the injector (33 gauge; Plastics One) by a polyethylene tubing (Tygon catheter; 0.25 mm internal diameter) and controlled by an injection pump (CMA/100; CMA/Microdialysis) at the flow of 0.3 μ l/min. At the end of the injection, injector needles were left in place for 3 more minutes to allow the diffusion of solutions.

Viral expression of opsins in ChIs. Adeno-associated virus (AAV) vector containing opsin transgenes (eNpHR: pAAV-Efla-DIO-eNpHR3.0-EYFP) was provided by Dr. Deisseroth (Stanford University) and modified by switching EYFP by TagRFP. The recombinant AAV vector was serotyped with AAV5 coat proteins and packaged by the viral vector core at the University of North Carolina. eNpHR-RFP or RFP was expressed in ChAT-expressing neurons by injecting a Cre-dependent AAV carrying the opsin (i.e., eNpHR-RFP mice) or the reporter gene (control RFP mice) into the dorsal striatum of ChAT^{cre/cre} mice. The AAV (1 μ l) was injected unilaterally at 2 dorsoventral sites in the dorsal striatum of ChAT^{cre/cre} mice (+1.0 mm AP, $\pm$ 1.5 mm ML, -3.4 and -3.0 mm DV; stereotaxic mouse atlas of Paxinos and Franklin, 2001).

6-OHDA lesions. Mice received one unilateral injection (1.5 μ l) of 6-hydroxydopamine hydrochloride (2.7 μ g/ μ l diluted in 0.9% sterile NaCl containing 0.2% ascorbic acid; Tocris Bioscience) or vehicle (0.9% NaCl in 0.2% ascorbic acid) into the substantia nigra pars compacta (SNc) at the following coordinates: -3.0 mm AP, $\pm$ 1.3 mm ML, -4.5 mm DV. 6-OHDA or vehicle injection was done on the side of the intra-

Correspondence should be addressed to Marianne Amalric, Aix Marseille University, CNRS, UMR 7291, Laboratoire de Neurosciences Cognitives (LNC), FR3C 3512, Case C, 3, place Victor Hugo, 13331 Marseille cedex 03, France. E-mail: marianne.amalric@univ-amu.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0873-16.2016

Copyright © 2016 the authors 0270-6474/16/369162-12\$15.00/0

striatal viral injection in the same surgical session. All experiments were performed at least 2 weeks later and the extent of DA lesion was assessed systematically by anti-tyrosine hydroxylase immunohistochemistry.

Optic fiber implantation. For optogenetic experiments, mice were implanted with optical fibers consisting of a zirconia ferrule with a 200 μm diameter and 3.0-mm-long cleaved bare optic fibers (0.22 numerical aperture; Doric Lenses). Fibers were implanted in the striatum ipsilateral to the lesion side at the following coordinates: +1.0 mm AP, $\pm$ 1.5 mm ML, -2.8 mm DV.

Cannula implantation. For intrastriatal injections, mice were implanted with guide cannula (cut 2.5 mm below pedestal, 26 gauge; Plastics One) ipsilaterally to the lesioned side at the following coordinates: +1.0 mm AP, $\pm$ 1.5 mm ML, -2.5 mm DV.

Optogenetic photoinhibition

Light was provided by a yellow laser (589 nm, 75.2 mW, continuous stimulation; Combined Dual Wavelength DPSS Laser System, Laser-glow). Optical-fiber light power was measured using a light sensor and intensity calculated using the model based on direct measurements in mammalian brain tissue for predicting irradiance values developed in K. Deisseroth's laboratory. Light intensity at 0.2 mm from fiber tip was calculated to be 20 mW/mm² for yellow light (corresponding to 140 mW/mm² at the fiber tip). The duration of optogenetic photoinhibition was dependent on each behavioral testing period (from few seconds to 5 min).

In vivo recordings in anesthetized mice

eNpHR-RFP mice were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (100 and 10 mg/kg, i.p., respectively, supplemented as needed by intraperitoneal injection during the course of the experiment) and fixed in a stereotaxic head frame (Horsley-Clarke apparatus; Unimécanique). Body temperature was monitored by a rectal thermometer and maintained at 36.5°C with a homeothermic blanket (Harvard Apparatus). Single-unit activity of striatal cells was recorded extracellularly using glass micropipettes (25–35 M Ω) filled with a 0.5 M sodium chloride solution containing 1.5% neurobiotin (Vector Laboratories). Single neuron action potentials were recorded using the active bridge mode of an Axoclamp-2B amplifier (Molecular Devices), amplified, and filtered with an AC/DC amplifier (DAM 50; World Precision Instruments). Data were sampled online at a 10 kHz rate on a computer connected to a CED 1401 interface and analyzed offline using Spike 2 (Cambridge Electronic Design). An optical fiber (core 200 μm , numerical aperture 0.22; Doric Lenses) was secured 800 μm from the tip of the glass micropipette using dental cement and this custom optoprobe was lowered in the striatum (+1.0 mm AP, $\pm$ 1.5 mm ML according to Paxinos and Franklin, 2001). Yellow light was delivered (power at the tip of optical fiber: 140 mW/mm²) using a yellow DPSS Laser (589 nm, 75.2 mW; Changchun New Industries Optoelectronics).

Drug treatment

Scopolamine hydrobromide (1.0 mg/kg) and L-DOPA methyl ester (3.0 mg/kg) combined with the peripheral DOPA decarboxylase inhibitor benserazide hydrochloride (12 mg/kg), telenzepine dihydrochloride hydrate (0.3 or 3.0 mg/kg), and tropicamide (2.5 or 10 mg/kg) were dissolved with 0.9% sterile NaCl immediately before use. The drugs were injected intraperitoneally at a volume of 10 ml/kg body weight, 30 min before behavioral tests to cover the period of maximal drug effect (Aliane et al., 2011; Francardo et al., 2011). All drugs were purchased from Sigma-Aldrich. For intrastriatal injections, awake mice received unilateral injections of telenzepine (0.75 μg or 7.5 μg) or tropicamide (0.1, 1.0 or 6.0 μg) diluted in a volume of 0.5 μl in 0.9% sterile NaCl. Local injections were performed with stainless-steel injector needles (cut 3.2 mm below pedestal, 33 gauge; Plastics One) inserted through the guide cannula previously implanted and fitted so that they protruded 0.7 mm below into the dorsal striatum. The injectors were connected via a polyethylene catheter to a 10 μl microsyringe fitted to a micropump. The flow delivered by the pump was set at 0.25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Local injections were performed a few minutes before testing.

Behavioral tests

Pole test. To evaluate bradykinesia induced by 6-OHDA lesion, mice were placed head-upward on the top of a vertical, rough-surfaced pole (50 cm height, 1 cm diameter). Mice were trained to turn to orient downward and descend the pole in two sessions on consecutive days before 6-OHDA lesion. The total time to descend the pole from the time that the animal was placed on the pole until it reached the base of the pole was monitored. Two trials were performed and the best descent time was taken across the trials.

Cylinder test. Mice were placed into a Plexiglas cylinder (20 cm height, 9 cm diameter) to evaluate akinesia and motor asymmetry induced by 6-OHDA lesion. The forelimb asymmetry was assessed by scoring during 5 min weight-bearing contacts on the cylinder wall of the ipsilateral and contralateral paw relative to the lesioned hemisphere, as well as movements made by both paws. Mice failing to reach 10 contacts were excluded from the analyses. Data are expressed as a percentage of ipsilateral and contralateral touches relative to the total number of touches.

Cross maze. To evaluate exploratory behavior and sensorimotor neglect induced by 6-OHDA lesion, mice were placed into a cross maze consisting of 4 identical arms (45 $\times$ 7 $\times$ 15 cm) at 90° to each other and made with clear Plexiglas. The acquisition started with the mouse placed in the middle facing one arm. The number of ipsilateral and contralateral turns and the number of times the mouse went straight was monitored for 5 min. Mice failing to reach 10 entries were excluded from the analyses. Data are expressed as a percentage of ipsilateral, contralateral, and straight arm exploration relative to the total number of arm explorations.

Amphetamine-induced rotations. Rotational asymmetry was assessed using Plexiglas bowls (8 cm height, 9 cm diameter). During testing, mice were video recorded and full turns were counted in the ipsilateral and contralateral directions for 40 min after the injection of D-amphetamine sulfate (5 mg/kg, i.p., dissolved in 0.9% NaCl at a volume of 10 ml/kg). Data are expressed as percentage of ipsilateral rotations toward the side of the lesion relative to the total number of rotations over the 40 min of testing.

Open field. Mice were individually transferred from the home cage to an open-field arena (50 $\times$ 50 cm with a 30 cm-high white plastic wall) virtually divided into peripheral, intermediate, and central zones. The test started by placing the animal in the center of the open field illuminated by a dim light (5 Lux). Each mouse was allowed to explore the open field for 30 min and its behavior was recorded by a video camera. The distance traveled and the time spent in the different zones was analyzed by a video-tracking software (Viewpoint Life Sciences). In this test, the preferential exploration of the peripheral zone of the open field is considered an index of anxiety.

Experimental design

Optogenetic experiments. One week before surgery, 28 mice were tested in the pole, cylinder, and cross maze behavioral tests during the same session (prelesion). After 6-OHDA lesion and eNpHR or reporter gene (RFP) injection, mice were divided into two groups: control RFP 6-OHDA ($n = 14$) and eNpHR-RFP 6-OHDA ($n = 14$). After 2 weeks of recovery from surgery, the same behavioral tests were conducted in the two groups with and without optogenetic photoinhibition (postlesion ON and OFF) in a counterbalanced manner.

Pharmacological experiments. For systemic treatments, sham ($n = 5$ –8 per group) and 6-OHDA ($n = 10$ –14 per group) mice received scopolamine, L-DOPA, telenzepine, or tropicamide intraperitoneally. Each group (sham and 6-OHDA) was divided into three different subgroups receiving three injections of a given drug (vehicle, dose 1 and dose 2), except for the scopolamine and L-DOPA groups, which received two injections (vehicle, dose 1) in a different order of injection following a Latin-square design over postlesion days 14–22. Between postlesion days 25 and 45, each group (sham and 6-OHDA) received vehicle and telenzepine or tropicamide at the lowest efficient dose and were then tested twice on D-amphetamine-induced circling with a 15 d washout period in between.

For local treatments, sham ($n = 6$ –7 per group) and 6-OHDA ($n = 9$ per group) mice, treated either with telenzepine or tropicamide, were divided into 3 different subgroups receiving 3 intrastriatal injections

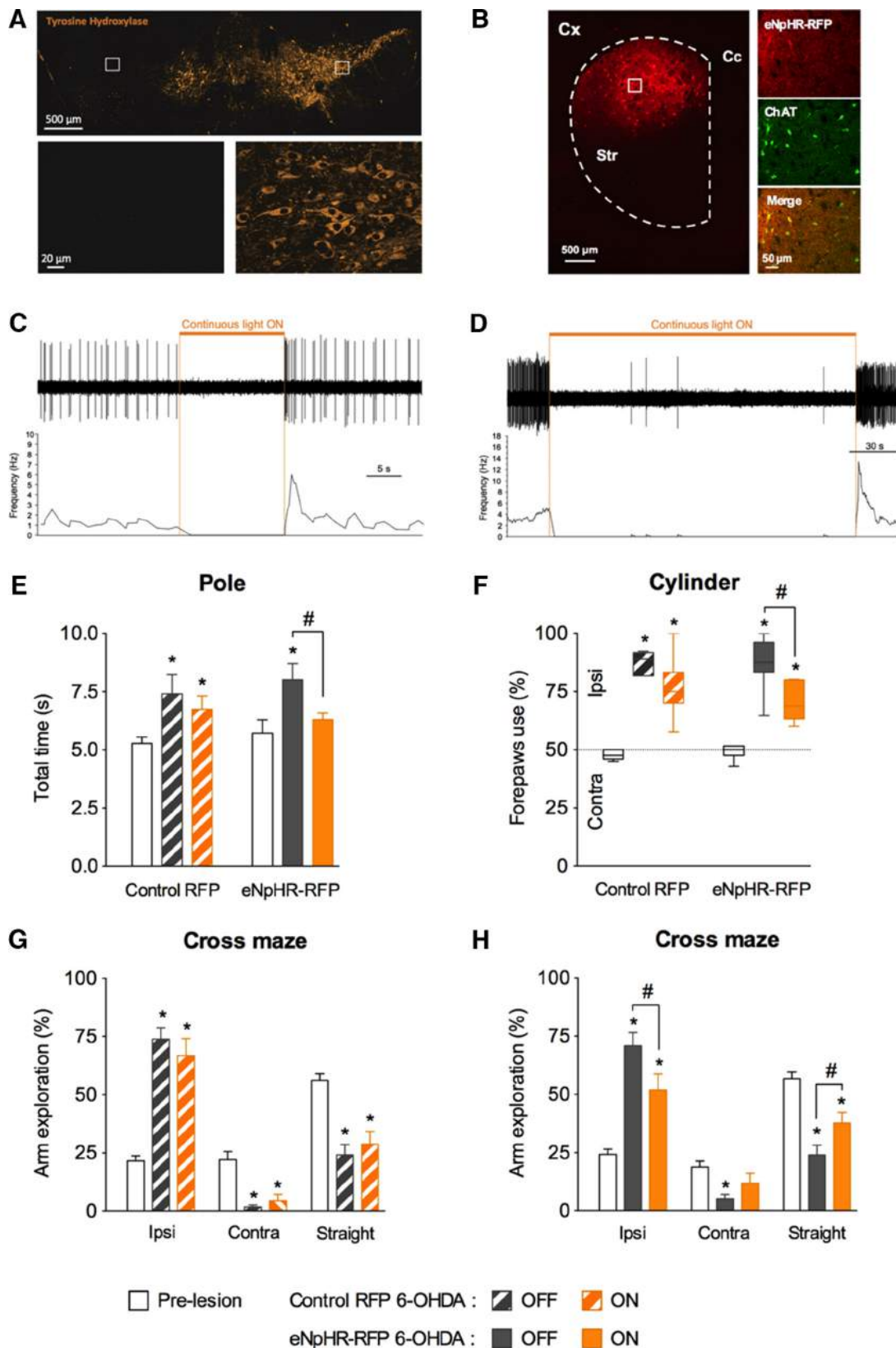


Figure 1. Optogenetic inhibition of striatal ChIs reduces motor dysfunction in DA-depleted mice. **A**, Top, Tyrosine hydroxylase immunolabeling in the SNc after unilateral 6-OHDA injection showing near-complete loss of dopaminergic neurons compared with the nonlesioned side. Scale bar, 500 μ m. Bottom, Enlargement of the indicated squares. Scale bar, 20 μ m. **B**, Left, specific expression of halorhodopsin (eNpHR-RFP) in ChIs in the dorsal striatum. Cx, Cortex; Cc, corpus callosum. Right, Coexpression of eNpHR-RFP- and ChAT-expressing neurons in eNpHR-RFP-injected mice. Scale bars, 500 μ m (left) and 50 μ m (right). **C**, **D**, Top, Raw trace of two isolated units, identified as ChIs, inhibited by yellow light continuous stimulation applied for 15 s and for 3 min. Bottom, Average of the firing rate over time for each unit. **E**, Total descent time in the pole test in control RFP ($n = 14$) and eNpHR-RFP ($n = 14$) mice. **F**, Postural (Figure legend continues.)

(vehicle, dose 1, and dose 2) over postlesion days 14–22. As for systemic treatments, the order of local injections was designed using a Latin-square design.

For D1-M4-KO experiments, 37 mice divided into control (M4 fl/fl, $n = 23$) and D1-M4 KO ($n = 14$) groups were tested. Before 6-OHDA lesion, control and D1-M4-KO mice were first tested in the open field. After 2 weeks of recovery from surgery, each subgroup (control sham, $n = 12$; control 6-OHDA, $n = 11$; D1-M4-KO sham, $n = 6$; D1-M4-KO 6-OHDA, $n = 8$) received three intrastriatal injections (vehicle and tropicamide dose 1 and dose 2) in a different order following a Latin-square design over postlesion days 14–22.

All injections (systemic or intrastriatal) were performed once every 4 d and mice were tested in the cylinder and cross maze tests consecutively in the same session.

Histology, immunohistochemistry and microscopy

Opsin striatal expression and lesion verification. Animals were deeply anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg) and then transcardially perfused with an ice-cold solution of paraformaldehyde 4% in PBS. After dissection, brains were postfixed overnight in the same fixative at 4°C, cryoprotected in 30% sucrose dissolved in 1× PBS for an additional 36 h at 4°C, and frozen. Coronal cryostat sections (40 μ m) covering the antero-posterior extent of the striatum were used for labeling. Brain sections were permeabilized in PBS with 0.4% Triton X-100 (PBST) for 30 min at room temperature. Sections were then incubated in a blocking solution composed of PBST with 3% bovine serum albumin and 10% normal goat serum for 1 h at room temperature. For primary antibody exposure, brain sections were incubated overnight at 4°C in rabbit anti-RFP (1/1000, tebu-bio, 600–401-379) and goat anti-ChAT (1/100, Millipore, AB144P) for colocalization experiments and in mouse anti-tyrosine hydroxylase (1/1000, Millipore, MAB318, AB144P RRID:AB_2079751) to control DA lesion. Sections were then incubated, respectively, in Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit (1/500, Invitrogen, A31572; Thermo Fisher Scientific, A-31572 RRID:AB_2536182), Alexa Fluor 488 donkey anti-goat (1/500, Invitrogen, A11055; Thermo Fisher Scientific, A-11055 RRID:AB_2534102), and Alexa Fluor 555 donkey anti mouse (1/500, Invitrogen, A31570; Thermo Fisher Scientific, A-31570 RRID:AB_2536180) for 1 h and 30 min at room temperature. Immunostaining was done on free-floating sections, which were then mounted onto Super-Frost Plus glass slides (VWR) and coverslipped with FluorSave mounting medium (Merck Chemicals). Quantification of colocalization was performed from approximately bregma +1.42 to +0.02 mm (~14 sections per mouse) using the Mercator System (Explora Nova) combined with a DMR Leica microscope coupled to a DXC-990P color video camera (Sony). Images were collected using Axio Imager Z1 with the Apotome system (Zeiss) with a Plan-Apochromat 20×/0.8 or a Plan-Neofluar 40×/1.3 objective (Zeiss) for the high magnification or with a Plan-Apochromat 10×/0.45 objective to acquire whole-brain images.

Control of cannula and optic fiber implantation. Cresyl violet staining of sections was used to locate the trace of cannula implantation and to confirm the accuracy of injection sites and correct optic fiber placement.

Statistical analysis

All behavioral analyses were conducted on littermates and the values are presented as mean $\pm$ SEM. The effects of 6-OHDA lesion, optogenetic photoinhibition, or pharmacological treatments on behavioral performances of the different groups were tested by means of repeated-measures one-way or two-way ANOVA, followed by adapted *post hoc* tests between groups (Bonferroni's or Tukey's multiple-comparisons test). For the locomotor activity (open field), data were analyzed using unpaired Student's *t* test. Values of $p < 0.05$ were considered significant

for all analyses. Statistical analyses were performed using Prism 6 software (GraphPad).

Results

Photoinhibition of striatal ChI activity alleviates parkinsonian-like motor symptoms

We examined the impact of optogenetic photoinhibition of striatal ChIs on motor function in parkinsonian conditions. Unilateral 6-OHDA injection into the SNc resulted in a near-complete loss of dopaminergic neurons compared with the nonlesioned side (Fig. 1A). In eNpHR-RFP mice, opsin-expressing neurons were largely confined to the dorsal part of the striatum and were identified as ChAT-expressing neurons (Fig. 1B).

In vivo electrophysiological recordings of ChIs in anesthetized nonlesioned eNpHR-RFP mice were performed to verify the impact on their electrophysiological activity of eNpHR photostimulation applied continuously for 15 s (Fig. 1C) and 3 min (Fig. 1D). Yellow light inhibited action potential firing of striatal ChIs during the entire duration of laser illumination in the two conditions.

To evaluate bradykinesia, mice were first tested in the pole test. 6-OHDA mice, either control RFP or eNpHR-RFP, showed a significant increase in the total time to descend the pole compared with prelesion level [Fig. 1E; $F_{(2,26)} = 4.534$, $p = 0.0205$, Tukey's test, $p = 0.0067$ (control RFP); $F_{(2,26)} = 4.553$, $p = 0.0202$, Tukey's test, $p = 0.0075$ (eNpHR-RFP)]. Yellow laser (589 nm) illumination of striatal ChIs ipsilateral to the lesioned side did not affect the descent time of control RFP 6-OHDA mice (Tukey's test, laser ON versus OFF, $p = 0.3631$), whereas it significantly reduced the descent time of eNpHR-RFP 6-OHDA mice (Tukey's test, laser ON versus OFF, $p = 0.0394$).

Unilateral 6-OHDA mice were then tested for forelimb asymmetry using the cylinder test (Fig. 1F). Before lesion, either control RFP or eNpHR-RFP mice used their two forepaws indifferently during exploratory rearing. The score of forepaws use is close to 50%, showing that nonlesioned mice have no preference between left or right paw use. In contrast, control RFP and eNpHR-RFP 6-OHDA mice significantly used their forepaw ipsilateral to the lesion due to contralateral forelimb akinesia, compared with prelesion [$F_{(2,12)} = 37.21$, $p < 0.0001$, Tukey's test, $p < 0.0001$ (control RFP); $F_{(2,12)} = 24.92$, $p < 0.0001$, Tukey's test, $p < 0.0001$ (eNpHR-RFP)]. Yellow laser illumination of striatal ChIs showed no significant difference in control RFP 6-OHDA mice (Tukey's test, laser ON versus OFF, $p = 0.2630$), whereas it produced a significant reduction of the ipsilateral asymmetry in eNpHR-RFP 6-OHDA mice (Tukey's test, laser ON versus OFF, $p = 0.0211$).

We further tested mice in a novel exploratory cross maze environment (Fig. 1G,H). Before 6-OHDA lesion, the natural tendency of mice is to explore the apparatus mainly by going back and forth into the straight arm (60% of the time in prelesion condition), with only a few equivalent turns into the right or left arms (20%). Unilateral 6-OHDA lesion in the control RFP and eNpHR-RFP groups totally disrupted this strategy by inducing a bias in arm explorations. We observed a significant increase of ipsilateral turns to the lesioned side associated with a decrease of contralateral turns and straight arm exploration, reflecting sensorimotor neglect [Fig. 1G,H; $F_{(8,104)} = 34.3$, $p < 0.0001$, Tukey's test, $p < 0.0001$, $p = 0.0018$, $p < 0.0001$ ipsilateral, contralateral, and straight arm exploration, respectively (control RFP); $F_{(8,104)} = 24.92$, $p < 0.0001$, Tukey's test, $p < 0.0001$, $p = 0.0312$, $p < 0.0001$ ipsilateral, contralateral, and straight arm exploration, respectively (eNpHR-RFP)]. Yellow laser illumination of striatal ChIs did not affect exploration in control RFP 6-OHDA

←

(Figure legend continued.) asymmetry in the cylinder in control RFP ($n = 7$) and eNpHR-RFP ($n = 7$) mice. **G,H**, Arm exploration (ipsilateral, contralateral, and straight arm exploration) in the cross maze in control RFP ($n = 14$) and eNpHR-RFP ($n = 14$) mice. Behavioral tests were performed under three conditions: prelesion, 6-OHDA laser OFF, and 6-OHDA laser ON. Data are reported as mean $\pm$ SEM. Tukey's test after significant one-way repeated-measures ANOVA: * $p < 0.05$ versus prelesion condition; # $p < 0.05$, laser ON versus laser OFF.

mice (Fig. 1G; Tukey's test, laser ON versus OFF, $p = 0.2636$, $p = 0.6856$, $p = 0.4736$ ipsilateral, contralateral, and straight arm exploration, respectively), whereas it significantly decreased ipsilateral arm exploration and increased straight arm exploration in eNpHR-RFP 6-OHDA mice. A tendency to enter the contralateral arm was also observed, but did not reach a significant level (Fig. 1H; Tukey's test, laser ON versus OFF, $p = 0.0035$, $p = 0.2874$, $p = 0.0328$ ipsilateral, contralateral, and straight arm exploration, respectively).

Muscarinic receptors blockade in unilateral 6-OHDA mice restores motor function

To investigate which cholinergic receptors are involved in the anti-parkinsonian effects, we tested the blockade of mAChRs with scopolamine, a large-spectrum antagonist. Unilateral 6-OHDA lesion induced a significant increase of the ipsilateral asymmetry in the cylinder test. Scopolamine (1 mg/kg, i.p.) significantly reduced the ipsilateral asymmetry of 6-OHDA mice in the cylinder but had no significant effect in the sham group [Fig. 2A1; $F_{(1,20)} = 103.7$, $p < 0.0001$, Bonferroni's test, $p > 0.9999$ (sham) and $p < 0.0001$ (6-OHDA)]. Scopolamine, at the same dose of 1 mg/kg that did not modify exploratory behavior of sham group in the cross maze (Fig. 2A2; $F_{(2,21)} = 1.206$, $p = 0.3192$), significantly modified 6-OHDA mice behavior ($F_{(2,39)} = 73.99$, $p < 0.0001$). It also decreased ipsilateral arm exploration and increased straight arm exploration, but did not affect contralateral bias in 6-OHDA mice (Bonferroni's test, $p < 0.0001$, $p = 0.8645$, $p < 0.0001$ ipsilateral, contralateral, and straight arm exploration, respectively).

To compare the therapeutic effect of L-DOPA in these assays, an acute injection of L-DOPA was tested in separate groups of 6-OHDA mice. L-DOPA at a dose of 6 mg/kg induced contralateral rotations and forelimb abnormal involuntary movements (AIMs) in all tested animals ($n = 6$), defined as dyskinesia (data not shown), preventing behavioral assessment in the cylinder and cross maze tests. L-DOPA injected at 3 mg/kg intraperitoneally in a group of 14 6-OHDA mice produced AIMs in 4 of them, so these mice were excluded from the analysis. In the lesioned mice that did not show dyskinesia, L-DOPA significantly reduced the ipsilateral asymmetry in the cylinder [Fig. 2B1; $F_{(1,15)} = 86.02$, $p < 0.0001$, Bonferroni's test, $p > 0.9999$ (sham) and $p < 0.0001$ (6-OHDA)]. It also decreased ipsilateral arm exploration and increased contralateral and straight arm exploration in the cross maze of 6-OHDA mice ($F_{(2,27)} = 110.3$, $p < 0.0001$; Bonferroni's test, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0011$ ipsilateral, contralateral, and straight arm exploration, respectively) but had no effect on the

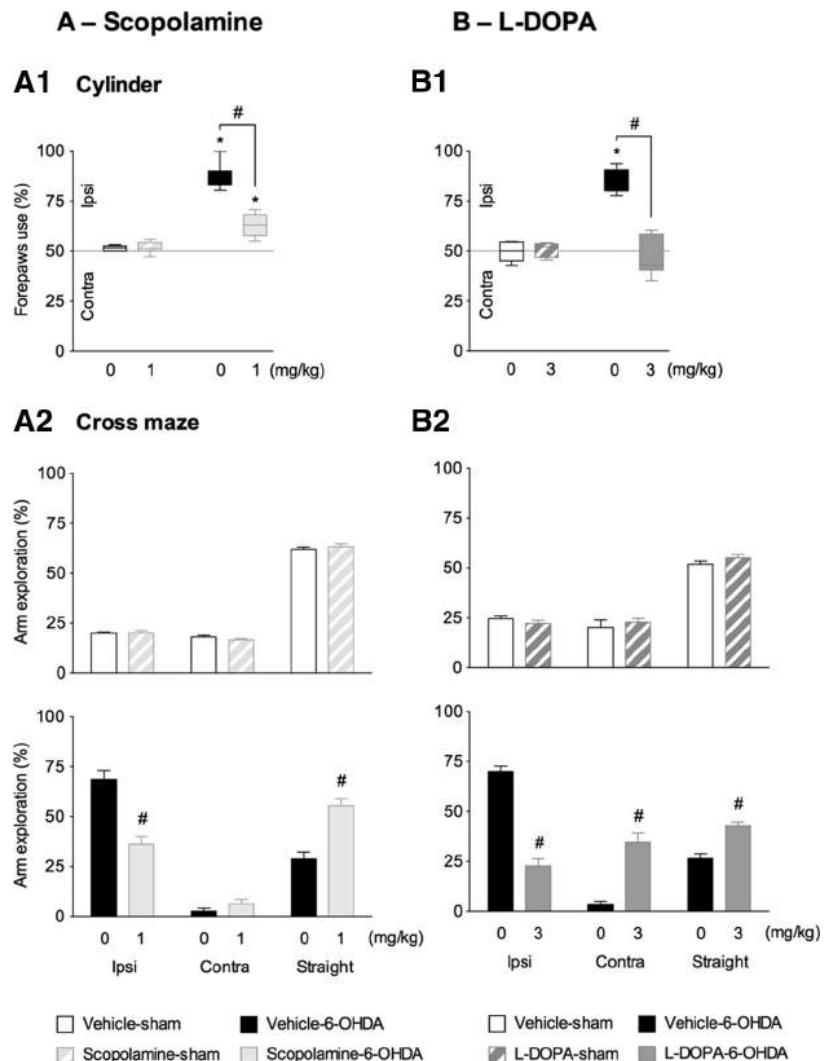


Figure 2. Muscarinic receptor blockade and L-DOPA administration restore motor function in DA-depleted mice. **A**, Effects of the nonselective mAChR antagonist scopolamine (1 mg/kg, i.p.) in the cylinder (**A1**) and cross maze (**A2**) tests. Each sham ($n = 8$) and 6-OHDA ($n = 14$) group received 2 injections (vehicle or scopolamine, 1 mg/kg). Values are shown as mean $\pm$ SEM. Bonferroni's test after significant two-way repeated-measures ANOVA: * $p < 0.01$ versus vehicle-sham group; # $p < 0.01$ versus vehicle-6-OHDA group. **B**, Effects of L-DOPA (3 mg/kg, i.p.) in the cylinder (**B1**) and cross maze (**B2**) tests. Each sham ($n = 7$) and 6-OHDA ($n = 10$) group received 2 injections (vehicle or L-DOPA 3 mg/kg). Values are shown as mean $\pm$ SEM. Bonferroni's test after significant two-way repeated-measures ANOVA: * $p < 0.01$ versus vehicle-sham group; # $p < 0.01$ versus vehicle-6-OHDA group.

exploratory behavior of sham group (Fig. 2B2; $F_{(2,18)} = 1.059$, $p = 0.3676$).

M1 and M4 mAChRs blockade improves motor functions in unilateral 6-OHDA mice

To determine which muscarinic receptors are involved in these effects, we injected selective M1 and M4 mAChR antagonists (telenzepine and tropicamide, respectively). In this study, doses of mAChR antagonists were selected because of their lack of effect on spontaneous locomotion in nonlesioned animals (data not shown).

The preferential M1 mAChR antagonist telenzepine (0.3 and 3 mg/kg, i.p.) dose-dependently reduced the ipsilateral asymmetry in 6-OHDA mice in the cylinder but had no significant effect in the sham group [Fig. 3A1; $F_{(2,26)} = 8.897$, $p = 0.0011$; Tukey's test, $p = 0.9908$ (0.3 mg/kg) and $p = 0.9997$ (3 mg/kg) for sham; $p = 0.0477$ (0.3 mg/kg) and $p < 0.0001$ (3 mg/kg) for 6-OHDA]. Telenzepine

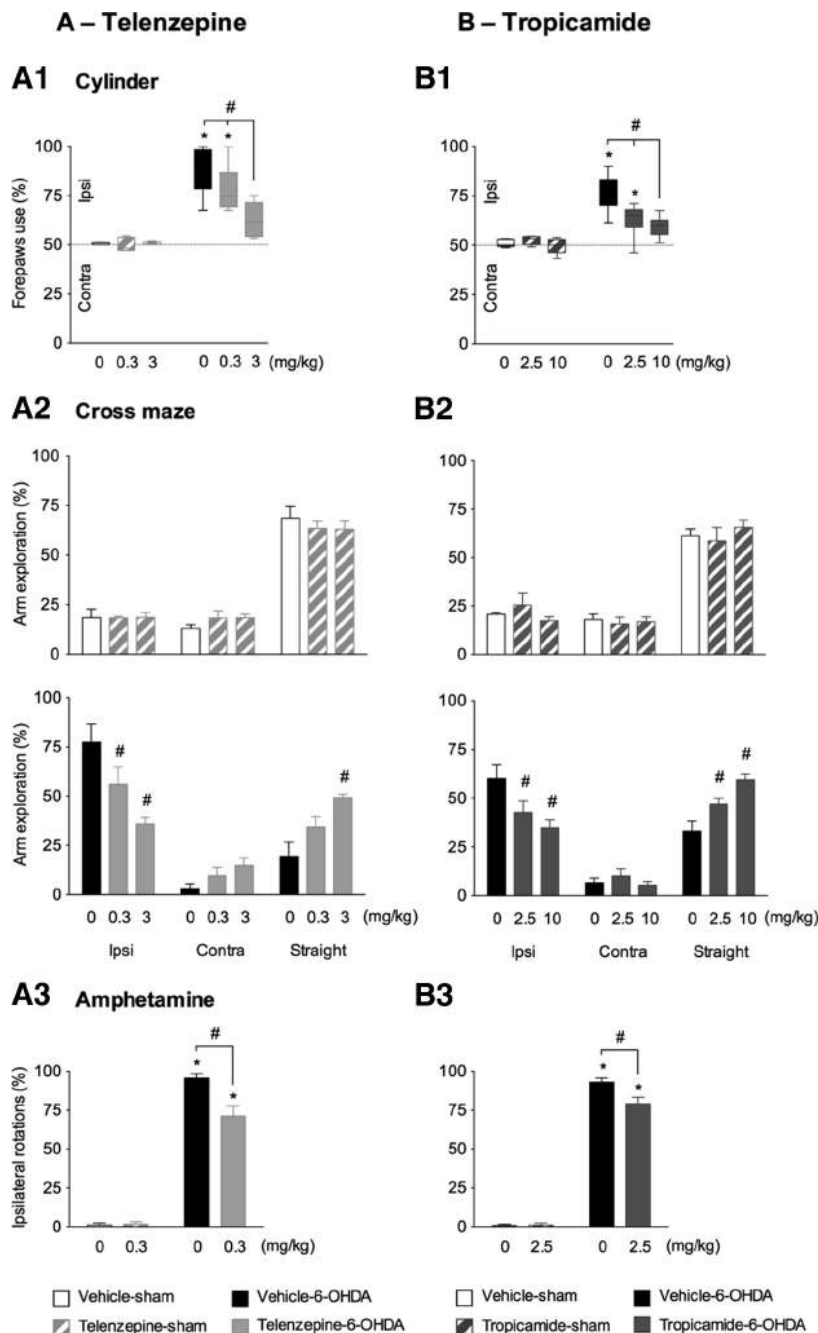


Figure 3. M1 and M4 mAChR blockade improves motor function in DA-depleted mice. **A**, Effects of the selective M1 mAChR antagonist telenzepine (0.3 and 3 mg/kg, i.p.) in the cylinder (**A1**) and cross maze (**A2**) tests. Each sham ($n = 5$) and 6-OHDA ($n = 10$) group received 3 injections (vehicle or telenzepine 0.3 and 3 mg/kg). Data are reported as mean $\pm$ SEM. Tukey's test after significant two-way repeated-measures ANOVA: $*p < 0.01$ versus vehicle-sham group; $\#p < 0.05$ versus vehicle-6-OHDA group. Amphetamine-induced rotational asymmetry (**A3**) was further tested in each sham ($n = 5$) and 6-OHDA ($n = 8$) group, which received 2 injections (vehicle or telenzepine 0.3 mg/kg) with a 15 d washout period in between. Values are shown as mean $\pm$ SEM. Bonferroni's test after significant two-way repeated-measures ANOVA: $*p < 0.01$ versus vehicle-sham group; $\#p < 0.01$ versus vehicle-6-OHDA group. **B**, Effects of selective M4 mAChR antagonist tropicamide (2.5 and 10 mg/kg, i.p.) in the cylinder (**B1**) and the cross maze (**B2**). Each sham ($n = 5$) and 6-OHDA ($n = 10$) group received 3 injections (vehicle or tropicamide 2.5 and 10 mg/kg). Data are reported as mean $\pm$ SEM. Tukey's test after significant two-way repeated-measures ANOVA: $*p < 0.01$ versus vehicle-sham group; $\#p < 0.05$ versus vehicle-6-OHDA group. Amphetamine-induced rotational asymmetry (**B3**) was further tested in each sham ($n = 5$) and 6-OHDA ($n = 8$) group, which received 2 injections (vehicle or tropicamide 2.5 mg/kg). Values are shown as mean $\pm$ SEM. Bonferroni's test after significant two-way repeated-measures ANOVA: $*p < 0.01$ versus vehicle-sham group; $\#p < 0.01$ versus vehicle-6-OHDA group.

had no effect on the sham group in the cross maze [Fig. 3A2; $F_{(4,54)} = 1.540$, $p = 0.2224$], but significantly decreased ipsilateral bias and increased straight arm exploration in 6-OHDA mice [$F_{(4,54)} = 17.11$, $p < 0.0001$; Tukey's test, $p = 0.0036$ (0.3 mg/kg) and $p < 0.0001$ (3 mg/kg) for ipsilateral; $p = 0.5735$ (0.3 mg/kg) and $p = 0.1641$ (3 mg/kg) for contralateral; $p = 0.0533$ (0.3 mg/kg) and $p < 0.0001$ (3 mg/kg) for straight arm exploration]. The effects of M1 mAChR blockade were then tested on amphetamine-induced rotational asymmetry. Amphetamine (5 mg/kg, i.p.) induced ipsilateral rotations in 6-OHDA mice. Telenzepine at a dose of 0.3 mg/kg reduced amphetamine-induced rotations over the 40 min test in 6-OHDA mice but had no effect in sham group [Fig. 3A3; $F_{(1,12)} = 6.636$, $p = 0.0243$, Bonferroni's test, $p > 0.9999$ (sham) and $p = 0.0023$ (6-OHDA)].

In 6-OHDA mice, the preferential M4 mAChR antagonist tropicamide (2.5 and 10 mg/kg, i.p.) dose-dependently reduced the ipsilateral asymmetry in 6-OHDA mice in the cylinder but had no significant effect in sham group [Fig. 3B1; $F_{(2,26)} = 7.560$, $p = 0.0026$; Tukey's test, $p = 0.9007$ (2.5 mg/kg) and $p = 0.9335$ (10 mg/kg) for sham; $p < 0.0001$ (2.5 mg/kg) and $p < 0.0001$ (10 mg/kg) for 6-OHDA]. Tropicamide had no effect on the sham group in the cross maze (Fig. 3B2; $F_{(4,24)} = 1.002$, $p = 0.4257$), whereas it significantly decreased ipsilateral arm exploration and increased straight arm exploration in 6-OHDA mice [$F_{(4,54)} = 12.38$, $p < 0.0001$; Tukey's test, $p = 0.0052$ (2.5 mg/kg) and $p < 0.0001$ (10 mg/kg) for ipsilateral; $p = 0.7976$ (2.5 mg/kg) and $p = 0.9690$ (10 mg/kg) for contralateral; $p = 0.0292$ (2.5 mg/kg) and $p < 0.0001$ (10 mg/kg) for straight arm exploration]. In amphetamine-induced rotational asymmetry, ipsilateral rotations produced by 6-OHDA lesion were reduced by tropicamide at the dose of 2.5 mg/kg, whereas no such effect was observed in the sham group [Fig. 3B3; $F_{(1,12)} = 5.026$, $p = 0.0446$, Bonferroni's test, $p > 0.9999$ (sham) and $p = 0.0067$ (6-OHDA)].

Dorsal striatal M1 and M4 mAChR blockade is involved in the beneficial effect on parkinsonian-like motor deficits

To investigate the role of M1 and M4 mAChRs of the striatum in the mediation of these behavioral effects, we injected telenzepine or tropicamide directly into the dorsal part of the striatum (Fig. 4A). Only mice showing the appropriate injection sites were used for data analysis. In-

trastriatal injection of telenzepine (0.75 and 7.5 μ g) dose-dependently reduced the ipsilateral asymmetry in the cylinder (Fig. 4B1; $F_{(2,28)} = 44.19$, $p < 0.0001$; Tukey's test, $p = 0.9783$ (0.75 μ g) and $p = 0.9926$ (7.5 μ g) for sham; $p < 0.0001$ (0.75 μ g) and $p < 0.0001$ (7.5 μ g) for 6-OHDA]. Telenzepine had no effect on sham group in the cross maze (Fig. 4B2; $F_{(4,36)} = 2.528$, $p = 0.0574$), whereas it significantly decreased ipsilateral arm exploration and increased straight arm exploration in 6-OHDA mice [$F_{(4,48)} = 24.75$, $p < 0.0001$; Tukey's test, $p < 0.0001$ (0.75 μ g) and $p < 0.0001$ (7.5 μ g) for ipsilateral; $p = 0.8730$ (0.75 μ g) and $p = 0.5503$ (7.5 μ g) for contralateral; $p < 0.0001$ (0.75 μ g) and $p < 0.0001$ (7.5 μ g) for straight arm exploration].

Local striatal injection of tropicamide (1 and 6 μ g) reduced ipsilateral asymmetry significantly in the cylinder in a dose-dependent manner [Fig. 4C1; $F_{(2,26)} = 13.14$, $p = 0.0001$; Tukey's test, $p = 0.9686$ (1 μ g) and $p = 0.8445$ (6 μ g) for sham; $p = 0.0024$ (1 μ g) and $p < 0.0001$ (6 μ g) for 6-OHDA]. Tropicamide had no effect on the sham group in the cross maze (Fig. 4C2; $F_{(4,30)} = 2.484$, $p = 0.0648$), whereas it significantly reduced ipsilateral arm exploration and increased straight exploration in 6-OHDA mice [$F_{(4,48)} = 31.47$, $p < 0.0001$; Tukey's test, $p = 0.0002$ (1 μ g) and $p < 0.0001$ (6 μ g) for ipsilateral; $p = 0.2470$ (1 μ g) and $p = 0.4087$ (6 μ g) for contralateral; $p = 0.0500$ (1 μ g) and $p < 0.0001$ (6 μ g) for straight arm exploration].

Local injection of M4 mAChR antagonist has no effect on motor deficits induced by unilateral 6-OHDA lesion in transgenic D1-M4-KO mice

The effects of M4 mAChR deletion only in D1-receptor-expressing neurons were first evaluated on basal locomotor activity in an open field for 30 min by comparing nonlesioned D1-M4-KO mice and their control littermates (M4 fl/fl mice) (Fig. 5A). The unpaired t test revealed a trend toward increased global locomotion in D1-M4-KO mice compared with control mice that did not reach a significant level (Fig. 5A; unpaired Student's t test, $t_{(19)} = 1.379$, $p = 0.1839$). The exploratory behavior was evaluated by the time spent in the peripheral, intermediate, and central zones. D1-M4-KO mice spent significantly more time in the central zone than did control mice (Fig. 5A; unpaired Student's t test, $t_{(19)} = 2.151$, $p = 0.0445$), suggesting an anxiolytic phenotype in these transgenic mice.

In control littermates, local striatal injection of tropicamide at the dose of 1 μ g reduced significantly the ipsilateral asymmetry in

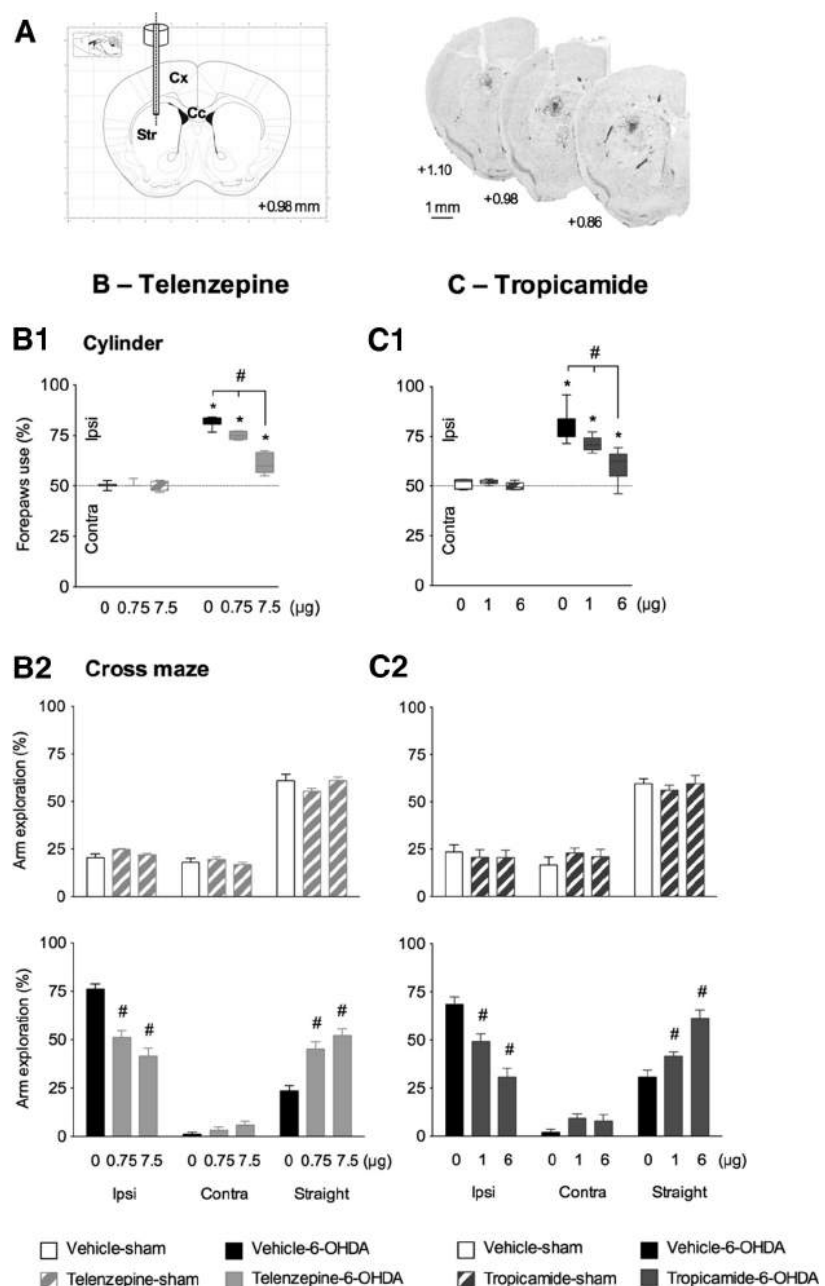


Figure 4. Dorsal striatal M1 and M4 mAChR blockade alleviates parkinsonian-like motor deficits. **A**, Schematic coronal sections from the stereotaxic mouse atlas (Paxinos and Franklin, 2001) (left) and cresyl violet staining (right) at different anteriority levels (from +1.10 to +0.86 mm related to bregma) showing the trace of cannula implantation and injector needle placement in the dorsal striatum for M1 and M4 mAChR antagonist injections. Scale bar, 1 mm. **B**, Effects of intrastratial injection of telenzepine (0.75 and 7.5 μ g, i.s.) in the cylinder (**B1**) and cross maze (**B2**) tests. Each sham ($n = 7$) and 6-OHDA ($n = 9$) group received 3 injections (vehicle or telenzepine 0.75 and 7.5 μ g). Data are reported as mean $\pm$ SEM. Tukey's test after significant two-way repeated-measures ANOVA: * $p < 0.01$ versus vehicle-sham group; # $p < 0.01$ versus vehicle-6-OHDA. **C**, Effects of intrastratial injection of tropicamide (1 and 6 μ g, i.s.) in the cylinder (**C1**) and cross maze (**C2**) tests. Each sham ($n = 6$) and 6-OHDA ($n = 9$) group received 3 injections (vehicle or tropicamide 1 and 6 μ g). Data are reported as mean $\pm$ SEM. Tukey's test after significant two-way repeated-measures ANOVA: * $p < 0.01$ versus vehicle-sham group; # $p < 0.05$ versus vehicle-6-OHDA.

the cylinder (Fig. 5B1; $F_{(2,42)} = 27.38$, $p < 0.0001$; Tukey's test, $p = 0.9810$ (0.1 μ g) and $p = 0.9834$ (1 μ g) for sham; $p = 0.2386$ (0.1 μ g) and $p < 0.0001$ (1 μ g) for 6-OHDA]. Tropicamide had no effect on the sham group in the cross maze (Fig. 5B2; $F_{(4,66)} = 2.379$, $p = 0.0605$). At the dose of 1 μ g, tropicamide significantly decreased ipsilateral arm exploration and increased straight ex-

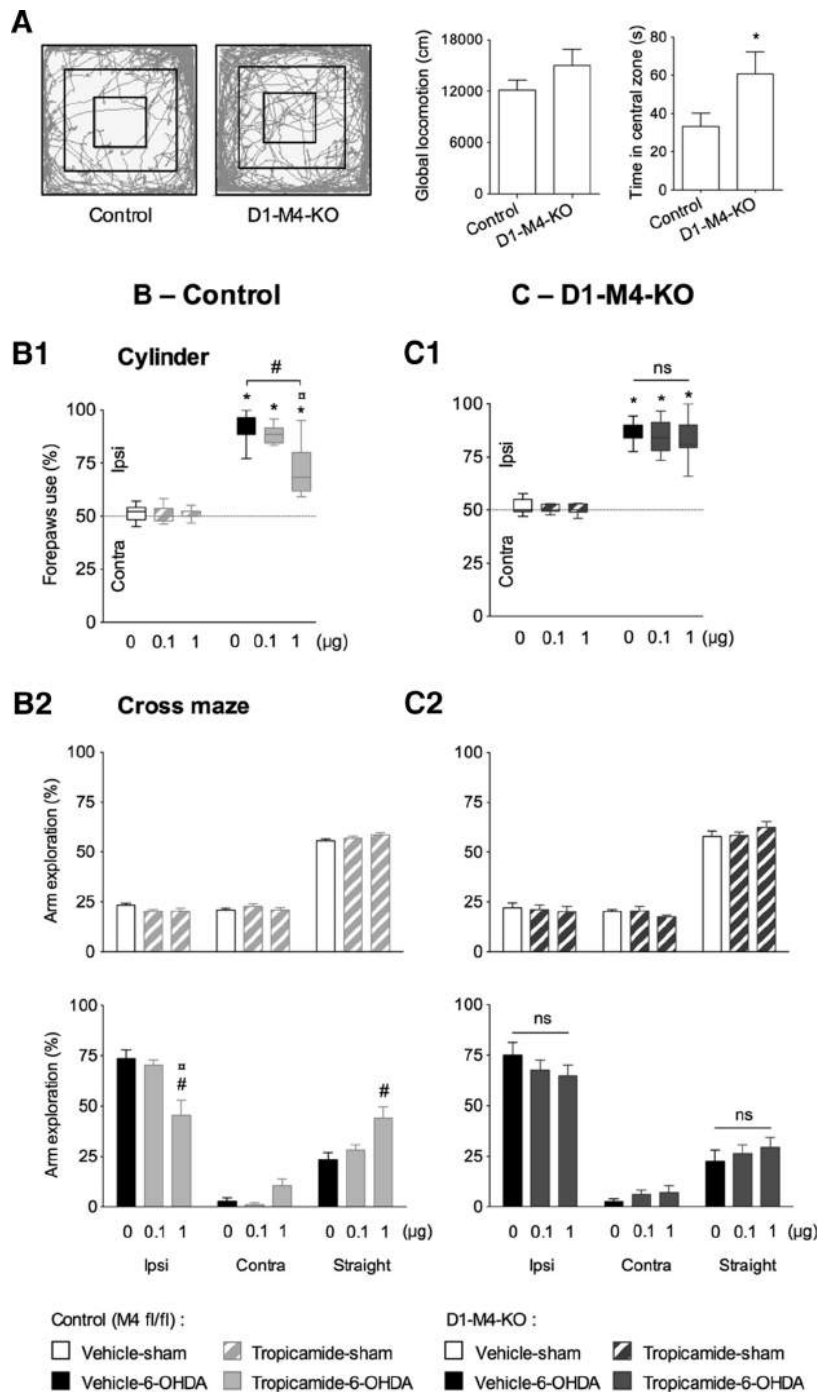


Figure 5. Suppression of the beneficial effect of tropicamide on parkinsonian-like motor deficits in transgenic mice lacking M4 mAChRs only in D1-receptor-expressing neurons. **A**, Effects of selective M4 mAChRs deletion only in D1-receptor-expressing neurons (D1-M4-KO) on basal locomotor activity (30 min) in nonlesioned mice. Representative paths and exploratory behavior of D1-M4-KO mice ($n = 8$) compared with their control littermates M4 fl/fl ($n = 13$). Quantification showing global locomotion and the time spent in the central zone of the open field. Values are shown as mean $\pm$ SEM. Unpaired Student's t test: $*p < 0.05$. **B**, Effects of intrastratial injection of tropicamide (0.1 and 1 μ g, i.s.) in the cylinder (**B1**) and cross maze (**B2**) tests in control littermates. Each sham ($n = 12$) and 6-OHDA ($n = 11$) group received 3 injections (vehicle or tropicamide 0.1 and 1 μ g). Data are reported as mean $\pm$ SEM. Tukey's test after significant two-way repeated-measures ANOVA: $*p < 0.01$ versus vehicle-sham group; $\#p < 0.01$ versus vehicle-6-OHDA; $\eta p < 0.05$ versus tropicamide 1 μ g-6-OHDA D1-M4-KO mice. **C**, Effects of intrastratial injection of tropicamide (0.1 and 1 μ g, i.s.) in the cylinder (**C1**) and cross maze (**C2**) test in D1-M4-KO mice. Each sham ($n = 6$) and 6-OHDA ($n = 8$) group received 3 injections (vehicle or tropicamide 0.1 and 1 μ g). Data are reported as mean $\pm$ SEM. Tukey's test after significant two-way repeated-measures ANOVA: $*p < 0.01$ versus vehicle-sham group.

ploration in 6-OHDA mice [$F_{(4,60)} = 17.68$, $p < 0.0001$; Tukey's test, $p = 0.7793$ (0.1 μ g) and $p < 0.0001$ (1 μ g) for ipsilateral; $p = 0.9366$ (0.1 μ g) and $p = 0.2258$ (1 μ g) for contralateral; $p = 0.5689$ (0.1 μ g) and $p < 0.0001$ (1 μ g) for straight arm exploration)].

Interestingly, tropicamide at the same dose did not reverse the 6-OHDA-induced ipsilateral asymmetry of D1-M4-KO mice (Fig. 5C1; $F_{(2,24)} = 0.2069$, $p = 0.8146$). In the cross maze, tropicamide had no effect on the sham group (Fig. 5C2; $F_{(4,30)} = 1.070$, $p = 0.3888$) and did not reverse the 6-OHDA-induced sensorimotor neglect in D1-M4-KO mice (Fig. 4C2; $F_{(4,42)} = 2.315$, $p = 0.0730$).

Comparisons across D1-M4-KO mice and control littermates showed a main significant interaction between groups and treatment in the cylinder (Fig. 5B1–C1; $F_{(6,66)} = 14.78$, $p < 0.0001$) and the cross maze (Fig. 5B2–C2; $F_{(10,102)} = 3.822$, $p = 0.0002$). Tropicamide at a dose of 1 μ g significantly affected ipsilateral bias between 6-OHDA control and 6-OHDA D1-M4-KO mice in the cylinder (Fig. 5B1–C1; Tukey's test, $p = 0.0012$) and the cross maze (Fig. 5B2–C2; Tukey's test, $p = 0.0225$ for ipsilateral arm exploration).

Discussion

Although our understanding of the contribution of the striatal ChI to basal ganglia-related motor and cognitive functions is growing (Aosaki et al., 2010; Straub et al., 2014), many questions remain unanswered regarding their involvement in the pathophysiology of Parkinson's disease. Here, we show that the selective photoinhibition of striatal ChIs and systemic administration or intrastratial pharmacological blockade of either M1 or M4 mAChRs in the dorsal striatum alleviate sensorimotor deficits in a unilateral 6-OHDA mice model of Parkinson's disease. We further demonstrate that the beneficial effect of M4 antagonism is lost in mice lacking M4 mAChRs selectively in D1-MSNs. These data provide strong evidence that dysregulated striatal cholinergic transmission via M1/M4 mAChRs, in particular M4 receptors expressed by D1-MSNs, is central in motor symptomatology, suggesting promising targets for the development of anti-parkinsonian strategies.

An imbalance between the DA and ACh systems in the dorsal and ventral striatum has long been implicated in the regulation of movement disorders (Pisani et al., 2007; Aosaki et al., 2010; Lester et al., 2010). Selective ventral striatal cholinergic depletion with immunotoxin-mediated cell-targeting techniques results in marked locomotor re-

sponse to DA stimulation and disruption of sensorimotor-gating processes (Hikida et al., 2001; Laplante et al., 2011). In the dorsal striatum, unilateral immunotoxin-mediated cholinergic depletion produces abnormal contralateral turning behavior that is enhanced by apomorphine (Kaneko et al., 2000). Moreover, viral-targeted ablation of ChIs of the dorsolateral, but not dorsomedial, striatum induces robust stress- and amphetamine-induced stereotyped behavior related to Tourette symptoms (Xu et al., 2015). Interestingly, unlike viral-targeted ablation, the optogenetic photoinhibition of striatal ChIs in control conditions does not modify spontaneous locomotion nor substantia nigra reticulata electrophysiological activity (Maurice et al., 2015).

The validity of optogenetic tools was assessed by recording ChI firing activity in anesthetized eNpHR-RFP mice, which confirmed the inhibition of ChI action potential firing under eNpHR photoillumination. The reversal of motor improvement is therefore directly linked to the reduction of striatal cholinergic tone in DA-depleted animals and its consequences on MSN membrane excitability, synaptic connectivity, and dendritic morphological changes (Surmeier et al., 2014; Maurice et al., 2015). Recent studies, however, have questioned the antagonistic nature of DA–ACh interaction. Synchronous activation of ChIs was found to elevate striatal DA release via nicotinic receptor activation (Threlfell and Cragg, 2011; Cachepe et al., 2012; Threlfell et al., 2012). In addition, stimulation of muscarinic receptors may either reduce or enhance striatal DA release depending on the studies, suggesting that these interactions are more complex than was originally thought (Eskow Jaunarajs et al., 2015).

Nonselective mAChR antagonists were the first pharmacological treatment for Parkinson's disease and are still used for tremor and gait symptoms. In the present study, we first show that ChIs photoinhibition effect is reproduced by systemic administration of scopolamine, a nonselective mAChRs antagonist. This is consistent with improved motor symptoms of parkinsonian patients treated with benztropine (Duvoisin, 1967) and in recent animal studies (Ding et al., 2011; Xiang et al., 2012). However, their clinical utility has been seriously limited by systemic and central adverse effects caused by nonselective blockade of multiple mAChRs also located in limbic structures. The recent discovery of drugs that act selectively at the M1 or M4 mAChR subtypes may provide new tools to treat motor symptoms with fewer side effects (Langmead et al., 2008; Lester et al., 2010). In addition, M4 receptors are primarily expressed in the striatum and, at lower levels, in several other brain regions, including cerebral cortex and hippocampus (Gomez et al., 1999). This may prevent the occurrence of cognitive side effects.

Immunocytochemical studies reveal a predominant expression of M1 and M4 mAChRs, relative to M2 and M3 subtypes, within the striatum (Bonsi et al., 2011). M1 mAChRs are coupled to Gq proteins that activate phospholipase C, resulting in activation of inositol trisphosphatase and diacylglycerol, ultimately increasing intracellular calcium (Pisani et al., 2007). Striatal M1 mAChRs are highly expressed postsynaptically in both D1-MSNs and D2-MSNs. Their blockade is thus expected to inhibit the activity of the two output pathways. Here, we demonstrate that the M1 preferential antagonist telenzepine, administered systemically or locally in the dorsolateral striatum, reduces 6-OHDA-induced motor deficits as observed after scopolamine treatment or striatal ChI photoinhibition. Telenzepine is reported to have preferential activity at M1 mAChRs compared with other muscarinic subtypes (Doods et al., 1987) and is four to 10 times more potent than pirenzepine, a widely used M1 mAChR antagonist (Eltze et al., 1985). Interestingly, pirenzepine was also found to

inhibit haloperidol-induced catalepsy in rats when centrally injected and was more effective than M2, M3, or M4 antagonists (Erosa-Rivero et al., 2014), supporting the importance of M1 mAChR subtypes as an interesting anti-parkinsonian drug target. *In vitro* electrophysiological studies revealed that ACh has been involved in striatal long-term potentiation (LTP) or long-term depression (LTD) induction. An excessive cholinergic transmission overactivates M1 mAChRs, thus preventing LTD in favor of LTP (Bonsi et al., 2008). Cholinergic receptor antagonists (pirenzepine, trihexyphenidyl) were able to restore a normal expression of LTD. Because the indirect pathway is considered hyperactive in parkinsonian state, whereas the direct pathway is hypoactive, it may be postulated that the beneficial action of telenzepine reported here involves preferential blockade of M1 mAChRs located on D2-MSNs.

Whereas actions of M1 mAChRs have been explored extensively, much less is known about M4 mAChRs that are highly expressed in the striatum (Langmead et al., 2008; Chapman et al., 2011). Consistent with the beneficial action of M4 mAChR blockade measured on sensorimotor deficits, tropicamide has been reported to suppress tremulous jaw movements in a rodent model of parkinsonian tremor (Betz et al., 2007). Moreover, scopolamine reversed haloperidol-induced catalepsy in wild-type mice, but had only a weak effect in M4 knock-out mice, thus highlighting a predominant role of these receptors in these effects (Karasawa et al., 2003). M4 mAChRs activate Gi/o proteins and are located in the striatum presynaptically on striatal ChI terminals, where they function as cholinergic autoreceptors inhibiting ACh release, along with M2 mAChRs (Kreitzer, 2009), and postsynaptically on D1-MSNs, where their activation results, among other mechanisms, in Cav2 channel inhibition and therefore shapes the spiking of MSNs (Santiago and Potter, 2001; Pisani et al., 2007). The loss of striatal DA has been reported to attenuate M4 autoreceptor signaling in ChIs, which might be a main factor in elevated striatal ACh release after DA depletion (Ding et al., 2006). Such adaptation is likely to limit the outcomes of M4 autoreceptor antagonism, which should otherwise have pro-parkinsonian rather than anti-parkinsonian action. After DA depletion, tropicamide may thus act preferentially on postsynaptic M4 receptors expressed in D1-MSNs, accounting for the symptomatic relief found there. We validated our hypothesis by showing that the alleviation of motor deficits by tropicamide is lost in mutant mice that lack M4 mAChRs in D1 DA-receptor-expressing cells (Jeon et al., 2010). These data indicate that activation of M4 mAChRs in D1-MSNs is a key component of ChIs involvement in parkinsonian symptomatology and are consistent with our recent work showing predominant outcomes of ChI inhibition on D1-MSNs versus D2-MSNs in 6-OHDA-lesioned mice, both in terms of excitability and implication in cortical information processing through the basal ganglia (Maurice et al., 2015). M4 mAChR subtypes exert an inhibitory control on D1-receptor-mediated locomotor stimulation (Gomez et al., 1999). Their stimulation potently counteracts the activation of adenylyl cyclase induced by a selective D1 receptor agonist in membranes of the ventral striatum, strongly suggesting that the DA–ACh balance takes place in D1-MSNs (Onali and Olanas, 2002). Here, D1-M4-KO mice exhibit enhanced basal locomotor activity and anxiolytic phenotype consistent with an increase of DA efflux in the ventral striatum associated with an hyperlocomotor response to psychostimulants observed previously in these mutant mice (Jeon et al., 2010; Dencker et al., 2011). One could expect reduced sensorimotor symptoms in D1-M4-KO mice if similar adaptive

mechanisms occur in the dorsal striatum, but not in our conditions of severe dopamine denervation.

The complexity of D1 and M4 mAChR interactions in the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia (LIDs) has also been highlighted recently. *In vitro*, the actions of the M4 and D1 receptors may be additive to produce a robust enhancement of D1-MSN excitability or, conversely, oppose each other depending on the order of their activation (Hernández-Flores et al., 2015). Such an antagonistic interaction of M4 and D1 receptors may explain a recent work showing that increasing cholinergic signaling with an M4 mAChR-positive allosteric modulator attenuates LIDs by promoting D1-MSN LTD in mice (Shen et al., 2015). In contrast, selective ablation of striatal ChI or mAChR blockade reduces LIDs (Ding et al., 2011; Won et al., 2014; Bordia et al., 2016), supporting the hypothesis that blockade rather than enhancement of cholinergic activity at M4 mAChRs may be relevant to alleviating LIDs and parkinsonian motor symptoms.

In the present study, administration of either muscarinic antagonists or L-DOPA alleviated sensorimotor deficits in unilateral 6-OHDA-lesioned mice. However, L-DOPA also produces contralateral bias and sometimes dyskinesia, which may indicate the limits of L-DOPA treatment for restoring normal function in our model of extensive dopamine denervation.

In summary, striatal ChI photoinhibition and M1 or M4 mAChR blockade alleviate parkinsonian-like motor symptoms in 6-OHDA-lesioned mice. M1 mAChR blockade may act preferentially on the indirect pathway, whereas M4 mAChR blockade involves the direct pathway. Therefore, the development of combined M1/M4 mAChR blockers appears to be a particularly attractive goal for reducing striatal cholinergic tone to alleviate the motor symptoms of Parkinson's disease while limiting side effects.

References

- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366–375. [CrossRef Medline](#)
- Aliane V, Pérez S, Bohren Y, Deniau JM, Kemel M-L (2011) Key role of striatal cholinergic interneurons in processes leading to arrest of motor stereotypies. *Brain* 134:110–118. [CrossRef Medline](#)
- Aosaki T, Miura M, Suzuki T, Nishimura K, Masuda M (2010) Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: an update. *Geriatr Gerontol Int* 10:S148–S157. [CrossRef Medline](#)
- Betz AJ, McLaughlin PJ, Burgos M, Weber SM, Salamone JD (2007) The muscarinic receptor antagonist tropicamide suppresses tremulous jaw movements in a rodent model of parkinsonian tremor: possible role of M4 receptors. *Psychopharmacology* 194:347–359. [CrossRef Medline](#)
- Bonsi P, Martella G, Cuomo D, Platania P, Sciamanna G, Bernardi G, Wess J, Pisani A (2008) Loss of muscarinic autoreceptor function impairs long-term depression but not long-term potentiation in the striatum. *J Neurosci* 28:6258–6263. [CrossRef Medline](#)
- Bonsi P, Cuomo D, Martella G, Madeo G, Schirrinzi T, Puglisi F, Ponterio G, Pisani A (2011) Centrality of striatal cholinergic transmission in basal ganglia function. *Front Neuroanat* 5:6. [CrossRef Medline](#)
- Bordia T, Perez XA, Heiss JE, Zhang D, Quik M (2016) Optogenetic activation of striatal cholinergic interneurons regulates L-dopa-induced dyskinesias. *Neurobiol Dis* 91:47–58. [CrossRef Medline](#)
- Cachope R, Mateo Y, Mathur BN, Irving J, Wang HL, Morales M, Lovinger DM, Cheer JF (2012) Selective activation of cholinergic interneurons enhances accumbal phasic dopamine release: setting the tone for reward processing. *Cell Rep* 2:33–41. [CrossRef Medline](#)
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G (2000) Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci* 23:120–126. [CrossRef Medline](#)
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M (2014) Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci* 17:1022–1030. [CrossRef Medline](#)
- Chapman KL, Vaswani D, Hendry N, Langmead CJ, Kew JN, Watson JM (2011) The muscarinic M(4) receptor is the functionally predominant subtype in rat and mouse striatum as demonstrated using [(35)S] GTPγS binding. *Eur J Pharmacol* 652:1–6. [CrossRef Medline](#)
- Dencker D, Wörtwein G, Weikop P, Jeon J, Thomsen M, Sager TN, Mørk A, Woldbye DP, Wess J, Fink-Jensen A (2011) Involvement of a subpopulation of neuronal m4 muscarinic acetylcholine receptors in the antipsychotic-like effects of the M1/M4 preferring muscarinic receptor agonist xanomeline. *J Neurosci* 31:5905–5908. [CrossRef Medline](#)
- Di Chiara G, Morelli M, Consolo S (1994) Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends Neurosci* 17:228–233. [CrossRef Medline](#)
- Ding J, Guzman JN, Tkatch T, Chen S, Goldberg JA, Ebert PJ, Levitt P, Wilson CJ, Hamm HE, Surmeier DJ (2006) RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat Neurosci* 9:832–842. [CrossRef Medline](#)
- Ding Y, Won L, Britt JP, Lim SA, McGehee DS, Kang UJ (2011) Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:840–845. [CrossRef Medline](#)
- Doods HN, Mathy MJ, Davidesko D, van Charldorp KJ, de Jonge A, van Zwieten PA (1987) Selectivity of muscarinic antagonists in radioligand and in vivo experiments for the putative M1, M2 and M3 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 242:257–262. [CrossRef Medline](#)
- Duvoisin RC (1967) Cholinergic-anticholinergic antagonism in parkinsonism. *Arch Neurol* 17:124–136. [CrossRef Medline](#)
- Eltze M, Gönne S, Riedel R, Schlotke B, Schudt C, Simon WA (1985) Pharmacological evidence for selective inhibition of gastric acid secretion by telenzepine, a new antimuscarinic drug. *Eur J Pharmacol* 112:211–224. [CrossRef Medline](#)
- Erosa-Rivero HB, Bata-García JL, Alvarez-Cervera FJ, Heredia-López FJ, Góngora-Alfaro JL (2014) The potency and efficacy of anticholinergics to inhibit haloperidol-induced catalepsy in rats correlates with their rank order of affinities for the muscarinic receptor subtypes. *Neuropharmacology* 81:176–187. [CrossRef Medline](#)
- Eskow Jaunarajs KL, Bonsi P, Chesselet MF, Standaert DG, Pisani A (2015) Striatal cholinergic dysfunction as a unifying theme in the pathophysiology of dystonia. *Prog Neurobiol* 127–128:91–107. [CrossRef Medline](#)
- Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci MA (2011) Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 42:327–340. [CrossRef Medline](#)
- Gomez J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Deng C, Wess J (1999) Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10483–10488. [CrossRef Medline](#)
- Hernández-Flores T, Hernández-González O, Pérez-Ramírez MB, Lara-González E, Arias-García MA, Duhne M, Pérez-Burgos A, Prieto GA, Figueroa A, Galarraga E, Bargas J (2015) Modulation of direct pathway striatal projection neurons by muscarinic M₄-type receptors. *Neuropharmacology* 89:232–244. [CrossRef Medline](#)
- Hikida T, Kaneko S, Isobe T, Kitabatake Y, Watanabe D, Pastan I, Nakanishi S (2001) Increased sensitivity to cocaine by cholinergic cell ablation in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13351–13354. [CrossRef Medline](#)
- Jeon J, Dencker D, Wörtwein G, Woldbye DP, Cui Y, Davis AA, Levey AI, Schütz G, Sager TN, Mørk A, Li C, Deng CX, Fink-Jensen A, Wess J (2010) A subpopulation of neuronal M4 muscarinic acetylcholine receptors plays a critical role in modulating dopamine-dependent behaviors. *J Neurosci* 30:2396–2405. [CrossRef Medline](#)
- Kaneko S, Hikida T, Watanabe D, Ichinose H, Nagatsu T, Kreitman RJ, Pastan I, Nakanishi S (2000) Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science* 289:633–637. [CrossRef Medline](#)
- Karasawa H, Taketo MM, Matsui M (2003) Loss of anti-cataleptic effect of scopolamine in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor subtype 4. *Eur J Pharmacol* 468:15–19. [CrossRef Medline](#)
- Kreitzer AC (2009) Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Neuroscience* 32:127–147. [CrossRef Medline](#)
- Langmead CJ, Watson J, Reavill C (2008) Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther* 117:232–243. [CrossRef Medline](#)

- Laplanche F, Lappi DA, Sullivan RM (2011) Cholinergic depletion in the nucleus accumbens: effects on amphetamine response and sensorimotor gating. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:501–509. [CrossRef Medline](#)
- Lees A (2005) Alternatives to levodopa in the initial treatment of early Parkinson's disease. *Drugs Aging* 22:731–740. [CrossRef Medline](#)
- Lester DB, Rogers TD, Blaha CD (2010) Acetylcholine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurol Ther* 16:137–162. [CrossRef Medline](#)
- Maurice N, Liberge M, Jaouen F, Ztaou S, Hanini M, Camon J, Deisseroth K, Amalric M, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C (2015) Striatal cholinergic interneurons control motor behavior and basal ganglia function in experimental Parkinsonism. *Cell Rep* 13:657–666. [CrossRef Medline](#)
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW (2000) Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23:S8–S19. [CrossRef Medline](#)
- Onali P, Olanow MC (2002) Muscarinic M4 receptor inhibition of dopamine D1-like receptor signalling in rat nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 448:105–111. [CrossRef Medline](#)
- Parker PR, Lalive AL, Kreitzer AC (2016) Pathway-specific remodeling of thalamostriatal synapses in parkinsonian mice. *Neuron* 89:734–740. [CrossRef Medline](#)
- Paxinos G, Franklin KB (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates, Ed 2. San Diego: Academic.
- Pisani A, Bernardi G, Ding J, Surmeier DJ (2007) Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci* 30:545–553. [CrossRef Medline](#)
- Santiago MP, Potter LT (2001) Biotinylated m4-toxin demonstrates more M4 muscarinic receptor protein on direct than indirect striatal projection neurons. *Brain Res* 894:12–20. [CrossRef Medline](#)
- Shen W, Plotkin JL, Francardo V, Ko WK, Xie Z, Li Q, Fieblinger T, Wess J, Neubig RR, Lindsley CW, Conn PJ, Greengard P, Bezard E, Cenci MA, Surmeier DJ (2015) M4 muscarinic receptor signaling ameliorates striatal plasticity deficits in models of L-DOPA-induced dyskinesia. *Neuron* 88:762–773. [CrossRef Medline](#)
- Silberberg G, Bolam JP (2015) Local and afferent synaptic pathways in the striatal microcircuitry. *Curr Opin Neurobiol* 33:182–187. [CrossRef Medline](#)
- Straub C, Tritsch NX, Hagan NA, Gu C, Sabatini BL (2014) Multiphasic modulation of cholinergic interneurons by nigrostriatal afferents. *J Neurosci* 34:8557–8569. [CrossRef Medline](#)
- Surmeier DJ, Graves SM, Shen W (2014) Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 29:109–117. [CrossRef Medline](#)
- Tecuapetla F, Matias S, Dugue GP, Mainen ZF, Costa RM (2014) Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nat Commun* 5:4315. [CrossRef Medline](#)
- Tepper JM, Bolam JP (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 14:685–692. [CrossRef Medline](#)
- Threlfell S, Cragg SJ (2011) Dopamine signaling in dorsal versus ventral striatum: the dynamic role of cholinergic interneurons. *Front Syst Neurosci* 5:11. [CrossRef Medline](#)
- Threlfell S, Lalic T, Platt NJ, Jennings KA, Deisseroth K, Cragg SJ (2012) Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron* 75:58–64. [CrossRef Medline](#)
- Tritsch NX, Carter AG (2016) Parkinson's disease: a thalamostriatal rebalancing act? *Neuron* 89:675–677. [CrossRef Medline](#)
- Wess J, Eglon RM, Gautam D (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 6:721–733. [CrossRef Medline](#)
- Won L, Ding Y, Singh P, Kang UJ (2014) Striatal cholinergic cell ablation attenuates L-DOPA induced dyskinesia in Parkinsonian mice. *J Neurosci* 34:3090–3094. [CrossRef Medline](#)
- Xiang Z, Thompson AD, Jones CK, Lindsley CW, Conn PJ (2012) Roles of the m1 muscarinic acetylcholine receptor subtype in the regulation of Basal Ganglia function and implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 340:595–603. [CrossRef Medline](#)
- Xu M, Kobets A, Du JC, Lenington J, Li L, Banasr M, Duman RS, Vaccarino FM, DiLeone RJ, Pittenger C (2015) Targeted ablation of cholinergic interneurons in the dorsolateral striatum produces behavioral manifestations of Tourette syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:893–898. [CrossRef Medline](#)
- Zhang W, Basile AS, Gomeza J, Volpicelli LA, Levey AI, Wess J (2002) Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22:1709–1717. [Medline](#)
- Zhou FM, Wilson C, Dani JA (2003) Muscarinic and nicotinic cholinergic mechanisms in the mesostriatal dopamine systems. *Neuroscientist* 9:23–36. [CrossRef Medline](#)

Article 3

Article 3

But de l'étude

Afin de caractériser le rôle des ChIs et des récepteurs muscariniques (mAChRs) M1 dans les déficits non-moteurs – cognitifs et émotionnels – observés dans les phases précoces de la maladie de Parkinson, nous avons évalué les effets de l'inhibition des ChIs et de la modulation pharmacologique (activation ou inhibition) des mAChRs M1 striataux sur les déficits cognitifs et émotionnels induits par une lésion dopaminergique bilatérale partielle chez des souris transgéniques eNpHR ou des souris *wild-type*.

Pour cela, nous avons réalisé une série de tests non-moteurs évaluant l'anxiété (test du labyrinthe en croix surélevé et test de l'openfield), la mémoire sociale à court terme (test de reconnaissance sociale), la mémoire spatiale à court terme (test de reconnaissance spatiale) et la mémoire de la nouveauté (test de reconnaissance d'un nouvel objet) de souris recevant, ou non, une injection bilatérale de 6-OHDA dans le striatum dorsal. Dans l'approche pharmacologique, les souris *wild-type* reçoivent par voie intrastriatale (i.s.) un agoniste préférentiel des mAChRs M1, le McN-A-343, et par voie intrapéritonéale (i.p.), un antagoniste préférentiel des mAChRs M1, la télenzépine.

Principaux résultats

La lésion bilatérale par injection de 6-OHDA dans le striatum dorsal entraîne, dans nos conditions expérimentales, une déplétion partielle en dopamine, caractérisée par une perte de 40% des neurones dopaminergiques de la SNc, et une perte de 48% des terminaisons dopaminergiques dans le striatum. Elle induit également une perte de 28% des terminaisons dopaminergiques de l'hippocampe.

Les souris partiellement lésées présentent un phénotype anxieux, un déficit de la mémoire sociale ainsi qu'une altération de la mémoire spatiale. Cependant, la lésion 6-OHDA n'entraîne pas de déficit de la reconnaissance de la nouveauté ; les performances des souris lésées dans le test de

reconnaissance d'un nouvel objet sont similaires à celles des souris non-lésées. Par ailleurs, la lésion 6-OHDA partielle n'altère pas l'activité locomotrice et exploratoire des animaux lorsqu'ils réalisent les tests cognitifs et émotionnels.

La photoinhibition des ChIs striataux chez les souris transgéniques eNpHR lésées réduit l'anxiété et les déficits des mémoires sociale et spatiale. De manière intéressante, la photoinhibition des ChIs ne modifie pas l'état émotionnel et les capacités cognitives des souris transgéniques eNpHR non lésées, révélant – comme nous l'avons observé lors de notre première étude des troubles moteurs – que les ChIs n'exercent leur contrôle qu'en condition lésionnelle lorsque le tonus dopaminergique est diminué.

L'injection intrastriatale de McN-A-434 (5 nmol, i.s.), agoniste des mAChRs M1 chez les souris *wild-type*, aggrave l'anxiété des souris lésées, alors qu'elle améliore leurs mémoires de reconnaissance sociale et spatiale à court terme. Comme nous l'avons observé dans l'approche optogénétique, la modulation pharmacologique de l'activité cholinergique striatale par injection de McN-A-434 est sans effet chez les souris non lésées.

L'injection périphérique de télenzépine (0.3 mg/kg, i.p.), antagoniste des mAChRs M1, améliore le déficit anxieux et la mémoire sociale à court terme des souris lésées. En revanche, elle ne modifie pas les déficits de mémoire spatiale de ces souris.

Conclusion

Cette troisième étude montre l'implication des ChIs striataux dans l'expression des déficits non-moteurs induits par la lésion bilatérale partielle des neurones dopaminergiques striataux. Leur photoinhibition réduit l'anxiété et les déficits mnésiques. Si le rôle des mAChRs M1 semble bien établi dans le phénotype anxieux (leur blocage est anxiolytique tandis que leur activation est anxiogène), leur implication dans les processus mnésiques n'est par contre pas aussi évidente, et suggère que d'autres sous-types de récepteurs cholinergiques sont engagés dans ces processus.

Early cognitive and affective dysfunctions in a mouse model of Parkinson's disease are modulated by striatal cholinergic interneurons

Abbreviated title: Striatal mAChRs and non-motor parkinsonian symptoms

Samira Ztaou¹, Isabelle Watabe², Martine Liberge^{1*}, Marianne Amalric^{1*§}

¹Aix Marseille Univ, CNRS, LNC, FR3C, Marseille, France

²Aix Marseille Univ, CNRS, LNIA, Marseille, France

*Co-last authors

§Correspondence should be addressed to Marianne AMALRIC:

Aix-Marseille University, CNRS, UMR 7291, Laboratoire de Neurosciences Cognitives (LNC), FR3C 3512, Case C, 3, place Victor Hugo, 13331 Marseille cedex 03, France

Tel: +33 (0) 4 13 55 09 35; Fax: +33 (0) 4 13 55 09 58

E-mail: marianne.amalric@univ-amu.fr

Acknowledgments

The authors declare no competing financial interests. This research was supported by the CNRS, Aix-Marseille University, French Ministry of Education and Research, France Parkinson Association, National Research Agency (ANR-2010-1416) and within the context of the DHUNE project supported by A*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02). We would like to thank V. Gilbert and E. Mansour for animal care, D. Paleressompoulle and D. Louber for technical assistance, A. Tonetto for expertise in confocal microscopy.

Abstract

Nonmotor symptoms in Parkinson's disease (PD), including mood disorders, impaired cognition and dementia, may appear in the early phase of the disease preceding the occurrence of rigidity, tremor and bradykinesia. In advanced PD, the loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra leads an imbalance between dopaminergic and cholinergic transmission within the striatum and anticholinergic drugs were introduced in the treatment of PD. However, the role of striatal cholinergic interneurons (ChIs) in the cognitive and affective alterations induced by partial DA denervation has never been investigated. We used optogenetic photoinhibition of striatal ChIs in mice with partial nigrostriatal 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesions mimicking an early stage of PD to assess their role in visuospatial discrimination, social recognition and anxiety. In transgenic mice specifically expressing halorhodopsin (eNpHR) in cholinergic neurons, photoinhibition of striatal ChIs reduced short-term social and spatial memory impairment in the object recognition and anxiety, induced by moderate DA depletion. Pharmacological modulation of muscarinic cholinergic receptor (mAChR) subtypes M1, widely expressed in the striatum, was also found to modulate affective and cognitive deficits in partially lesioned mice. The preferential M1 mAChR agonist, McN, injected locally in the striatum in DA-lesioned mice is anxiogenic in the elevated plus maze, but reduces the social recognition and spatial memory deficits. Whereas telencephal, preferential M1 receptor antagonist, when injected systemically diminishes the anxiety level of partially lesioned mice and restores the recognition of the juvenile in the social interaction test, without affecting spatial memory impairment. The results suggest that dysfunction of the striatal cholinergic system is occurring in the partial DA denervation model of early PD and that acetylcholine action at M1 mAChRs in the striatum impact affective behavior, whereas its effect on short-term memory processes is dependent upon an optimal level of acetylcholine release.

Introduction

Parkinson's disease (PD), associated with a progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, is characterized primarily by motor symptoms such as tremor, rigidity and bradykinesia (Obeso et al., 2000). However, PD is also accompanied by wide range of nonmotor symptoms including depression, anxiety, apathy, mood fluctuations, sleep disorder, olfactory deficit and cognitive impairment, which may appear in the early stage of the disease before the emergence of motor symptoms (Chaudhuri et al., 2006; Chaudhuri and Odin, 2010; Chaudhuri et al., 2011). While the dopamine (DA) depletion is the primary cause of motor impairment, the mechanisms underlying the neuropsychiatric, affective and cognitive deficits associated with PD are more difficult to assess. These symptoms may also be correlated to concomitant degeneration of noradrenaline, serotonin, cholinergic (ACh) neurotransmitter systems (Scatton et al., 1983; Remy et al., 2005; Kish et al., 2008; Bohnen and Albin, 2011).

For the past five decades, DA precursor L-DOPA was the gold-standard therapy to improve the motor deficits (Birkmayer and Hornykiewicz, 1961; Barbeau, 1962) but its effects on non-motor symptoms are more complex. L-DOPA efficacy on affective dysfunction is limited and its chronic administration is correlated with the appearance of anxiety and depression in parkinsonian patients (Kim et al., 2009; Eskow Jaunarajs et al., 2011). Moreover, clinical studies showed that beneficial or detrimental effects of L-DOPA on cognitive impairment are depending on task requirement and basal DA levels in distinct parts of the striatum (Gotham et al., 1988; Lewis et al., 2005; Cools, 2006). L-DOPA may improve certain cognitive symptoms that are associated with the severely depleted dorsal striatum, while concurrently impairing other cognitive functions associated with the relatively intact ventral striatum by over-dosing (Cools, 2006).

Several studies highlighted the dysfunction of cholinergic neurotransmission in the cortex and

the basal ganglia at early stages of PD after neurodegeneration of cholinergic neurons in the nucleus basalis of Meynert (Braak et al., 2003) and/or the pedunculopontine nucleus (Hirsch et al., 1987; Jellinger, 1988; Pahapill and Lozano, 2000; Karachi et al., 2010). Other studies point to a critical role of cholinergic interneurons, (ChIs) in the striatum in cognitive function (Havekes et al., 2011; Müller and Bohnen, 2013). In the present study, we focused on the striatal cholinergic component and its contribution to the non-motor symptoms in a model of early PD. Despite the low number of striatal ChIs, they are regarded as key regulators of basal ganglia function in normal and diseased states (Pisani et al., 2007; Lester et al., 2010; Bonsi et al., 2011; Threlfell and Cragg, 2011; Brichta et al., 2013; Scarr, 2013).

ChIs are implicated in attentional, motivational, learning and memory processes (Nicola et al., 2000; Apicella, 2007; Goldberg and Reynolds, 2011; Lenz and Lobo, 2013). Their wide range of striatal effects are achieved through both muscarinic and nicotinic receptors signaling. Muscarinic receptors (M1-M5, mAChRs) are highly expressed within the striatum and M1 mAChRs are primarily expressed on medium spiny neurons (MSNs) (Zhou et al., 2003; Kreitzer, 2009). In the present study, we provided evidence that optogenetic inhibition of striatal ChIs or pharmacological modulation of M1 mAChRs in mice model of early PD reduce emotional (anxiety) and cognitive (short-term social recognition, short-term spatial and non-spatial memory) symptoms. Understanding the mechanisms underlying the occurrence of these early non-motor symptoms in rodent models of PD may thus help to (1) proceed to preliminary diagnosis of the disease, (2) ameliorate the quality of life of PD patients and (3) delay the use of L-DOPA therapy which sometimes might these non-motors symptoms and is complicated by the development of motor side effects such as dyskinesia.

Materials and Methods

Animals

Optogenetic. Choline acetyltransferase ChAT-IRES-Cre knock-in mice (ChAT^{cre/cre} mice, stock number: 006410) and LoxP-stop-eNpHR3.0-EYFP mice (Ai39 mice, stock number: 014539) were purchased from Jackson Laboratory. Ai39 mice were crossed with ChAT^{cre/cre} mice to induce eNpHR3.0 expression in cholinergic neurons (Rosa^{eNpHR/+}::ChAT^{cre/+} mice that were called transgenic eNpHR mice in this study).

Pharmacology. Wild type male C57BL/6 mice aged 8 weeks were purchased from Charles River Laboratories, France.

Mice were housed in groups of 4-5 with food and water ad libitum in a temperature-controlled room (24°C) on a 12:12h dark–light cycle (lights on at 07:00). All procedures were approved by the French National Ethical Committee (authorization no. 00196.01) and in accordance with the recommendations of the EEC (2010/63/UE) for care and use of laboratory animals.

Stereotaxic surgery

Mice were anaesthetized with intraperitoneal (i.p.) injections of ketamine and xylazine (100 and 10 mg/kg, respectively) in a volume of 10 ml/kg and mounted on a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments). Injections were made with a 10 µl Hamilton microsyringe, connected to the injector (33 gauge, PlasticsOne) by a polyethylene tubing (Tygon catheter; 0.25 mm, i.d.) and controlled by an injection pump (CMA/100; CMA/Microdialysis, Stockholm, Sweden) at the flow rate of 0.3 µl/min. At the end of injection, injector needles were left in place for 3 more minutes to allow the diffusion of the solution.

6-OHDA lesions. Mice received a bilateral injection of 1 µl of 6-hydroxydopamine hydrochloride (4 µg/µl diluted in 0.9% sterile NaCl containing 0.2% ascorbic acid, Tocris Bioscience, UK) or vehicle (0.9% NaCl in 0.2% ascorbic acid) into the dorsal striatum

according to the following coordinates: +1.0 mm AP, ± 1.5 mm ML, -3.2 mm DV (Paxinos and Franklin, 2001). All experiments were performed at least two weeks after recovery from surgery and DA lesion extent was systematically assessed by anti-tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry as described below.

Optic fiber implantation. For optogenetic experiments, eNpHR mice were implanted with optical fibers consisting of a zirconia ferrule with a 200 μm diameter and 3.0 mm long cleaved bare optic fibers (0.22 N.A., Doric Lenses). Fibers were bilaterally implanted into the striatum at the following coordinates: +0.5 mm AP, ± 1.5 mm ML, -2.8 mm DV, in the core of the DA lesion.

Cannula implantation. For intrastriatal injections, mice were implanted with bilateral guide cannula (cut 2.5 mm below pedestal, 26 gauge, PlasticsOne) into the striatum at the following coordinates: +0.5 mm AP, ± 1.5 mm ML, -2.5 mm DV.

Optogenetic photoinhibition

Light was provided by a yellow laser (589 nm, 75.2 mW, continuous stimulation) (Combined Dual Wavelength DPSS Laser System, Laserglow). Optical-fiber light power was measured using a light sensor and intensity calculated using the model based on direct measurements in mammalian brain tissue for predicting irradiance values developed in K. Deisseroth's lab. Light intensity at 0.2 mm from fiber tip was calculated to be 20 mW/mm² for yellow light (corresponding to 140 mW/mm² at the fiber tip). Duration of optogenetic photoinhibition was dependent of each behavioral testing period (from 4 to 10 minutes).

Drug treatment

All drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). Telenzepine dihydrochloride hydrate (0.3 mg/kg) was dissolved with 0.9% sterile NaCl and administered

intraperitoneally (i.p.) in a volume of 10 ml/kg, 30 min before testing. Timing and dose were chosen according to previous studies (Aliane et al., 2011; Ztaou et al., 2016). For intrastriatal injections (i.s.), awake mice received a bilateral injection of McN-A-343 (4-Hydroxy-2-butynyl)-1-trimethyl-ammonium-3-chloro-carbanilate chloride, 4-[N-(3-Chlorophenyl)carbamoyloxy]-2-butynyl-trimethyl-ammonium chloride (referred to as McN, 5 nmol) diluted in a volume of 0.5 μ l/side, in 0.9% sterile NaCl. Local injections were performed with stainless-steel injector needles (cut 3.2 mm below pedestal, 33 gauge, PlasticsOne) inserted through the guide cannula previously implanted and fitted so that they protruded 0.7 mm below into the dorsal striatum. The injectors were connected via a polyethylene catheter to a 10 μ l microsyringe fitted to a micropump (CMA/100; CMA/Microdialysis, Stockholm, Sweden). The flow delivered by the pump was set at 0.25 μ l/min. Local injections were performed 2 min before testing. In this study, the dose of 5 nmol McN was selected because of its lack of effect on spontaneous locomotor activity in non-lesioned animals (data not shown) and from previous studies (Mitchelson, 2012).

Behavioral tests

All behavioral experiments were carried out in dim light (12 Lux), recorded by a video-tracking software (Viewpoint Life Sciences, Lyon, France) and scored by an investigator blind to the treatment. For each experiment, locomotor activity was measured by the total distance covered in the apparatus (open field or maze) during the testing period.

Open field and thigmotaxis. Mice were transferred from the home cage to an open field arena (50 $\times$ 50 cm with a 30 cm-high white plastic wall) virtually divided in a central field (center, 25 $\times$ 25 cm²) and an outer field (periphery). The test started by placing the animal in the center of the open field. Each mouse was allowed to explore the open field for 10 min. The paths of the animals, distance traveled and time spent in each zone of the open field were

quantified. The preferential exploration of the periphery of the open field is considered an index of anxiety (thigmotaxis). Data are expressed as percentage of distance traveled and time spent in the center, relative to the total time and distance measured in the entire open field.

Elevated plus maze. The elevated plus maze was performed to assess anxiety-related behavior over a 5-min period. The apparatus is consisted of four arms (6×37 cm) with two open arms and two enclosed arms (18 cm-high black plastic walls), elevated 50 cm above the floor. Light intensity was 12 Lux in open arms and 4 Lux in closed arms. Each mouse was placed in the central area of the plus maze, facing an open arm. The paths of the animals, the distance traveled, the number of entries and the time spent in each of the three compartments (open, close, center) were quantified. The propensity to avoid the open arms is considered as an index of anxiety (Lister, 1987). Data are expressed as percentage of the distance traveled, the number of entries and the time spent in the open arms, relative to the total distance, entries and time measured in the entire maze.

Social interaction. Short-term social memory was evaluated with the social interaction test (Kalkonde et al., 2011). Adult mice were habituated for 30 min to the testing room and a juvenile (18-21 days old) housed in an individual cage for 30 min prior to the beginning of the experiment. Adult mice were then allowed to habituate for 10 min to an open field arena (50×50 cm with a 30 cm-high white plastic wall) containing a small cage with stainless steel railings (8×8 cm with 10 cm-high) in its center. After placing the juvenile in the small cage, the time and the number of adult-initiated contacts with the juvenile were recorded for 4 min. At the end of the first presentation (P1), the adult mice was removed from the open field, kept in an individual cage for a 30 min-delay period and then re-exposed to the same juvenile for 4 min (second presentation, P2). Mice re-exposed to the same juvenile 30 min after an initial exposure display a little investigatory behavior, reflecting an active recognition.

Object recognition. On the first day, mice were habituated to an open field arena (50 × 50 cm with a 30 cm-high white plastic wall) surrounded by a distal cue (double red line), for 30 min. The following day, the paradigm posed a design in which spatial or non-spatial memory for visual stimuli were examined. As described previously (Beer et al., 2014), the test procedure included an acquisition phase (10 min), a 30 min-delay period where mice returned to their home-cages, and a recognition phase (10 min). During the acquisition phase, animals were exposed to two identical objects (falcon tissue culture flask filled with sand) placed in the northwest (NW) (object A) and northeast (NE) (object B) corner of the open field. After the delay, when spatial memory was studied, duplicates of the items were placed in the open field, object A at the same location (NW), object B at a different location (southeast SE) than experienced during the acquisition phase. When non-spatial memory was studied, the two objects were placed at exactly the same positions as in the acquisition phase, object A placed in the NW corner was an identical copy and the novel object B (tower) placed in the NE corner was a stimulus never encountered before. Successful memory was assessed by using the natural preference of rodents for novel object compared to familiar object. Accordingly, animals that successfully recognize one familiar item (e.g. previously experienced during the acquisition phase) spend more time exploring the novel item than the familiar one. Objects and object location were counterbalanced across animals and conditions. After each trial, the open field and objects were cleaned with water and a solution containing 10% ethanol. Minimum exploration time of objects A and B during the acquisition phase (T_{1A} and T_{1B} , respectively) was set to 2 s, and mice that did not reach this criterion were excluded from data analysis. The time spent exploring the two objects during the recognition phase (T_{2A} and T_{2B} , respectively) was recorded. The recognition index was defined as $(T_{2B}/(T_{2A} + T_{2B}) \times 100)$. A recognition index of 50% corresponds to chance level whereas a higher recognition index reflects active recognition.

Experimental design

Optogenetic experiments. For elevated plus maze and social interaction tests, transgenic eNpHR mice were divided in two groups, sham (n = 8) and 6-OHDA (n = 13). Each group receives or not optogenetic photoinhibition, in a counterbalanced manner (laser ON and laser OFF). The illumination protocol was applied during the whole test-period for the elevated plus maze (5 min) and the second presentation of social interaction test (4 min). For spatial recognition and non-spatial recognition tasks, as memory testing cannot be conducted twice in the same animal, independent groups of sham and 6-OHDA, in condition laser OFF and ON, were tested: sham-laser OFF (n = 7), sham-laser ON (n = 6), 6-OHDA-laser OFF (n = 10) and 6-OHDA-laser ON (n = 13). The photoillumination was applied during the recognition phase (10 min).

Pharmacological experiments. For intrastriatal treatment, sham and 6-OHDA mice were allocated to different subgroups: vehicle-sham (n = 9), McN-sham (n = 11), vehicle-6-OHDA (n = 14) and McN-6-OHDA (n = 14). McN was injected i.s. a few min before either the open field, the second presentation of social interaction test or the recognition phase of object recognition. For systemic treatment, sham and 6-OHDA mice performing the elevated plus maze and social interaction tests were allocated to different subgroups: vehicle-sham (n = 9), telenzepine-sham (n = 10), vehicle-6-OHDA (n = 9) and telenzepine-6-OHDA (n = 9). Sham and 6-OHDA mice conducting spatial and non-spatial recognition tasks were allocated to: vehicle-sham (n = 10), telenzepine-sham (n = 9), vehicle-6-OHDA (n = 13) and telenzepine-6-OHDA (n = 14). Telenzepine was injected i.p. 30 min before either the elevated plus maze, the second presentation of social interaction test or the recognition phase of object recognition. For all optogenetic and pharmacological experiments, the open field, elevated plus maze, social interaction and object recognition tests were conducted in a counterbalanced manner between post-lesion days 14 to 32.

Histology, immunohistochemistry and microscopy

Opsin striatal expression and lesion verification. Animals were deeply anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg) and then transcardially perfused with an ice-cold solution of paraformaldehyde 4% in PBS. After dissection, brains were post-fixed overnight in the same fixative at 4°C, cryoprotected in 30% sucrose dissolved in 1X PBS for an additional 36 h at 4°C and frozen. Coronal cryostat sections (40 µm) covering the antero-posterior extent of the prefrontal cortex, striatum, hippocampus and substantia nigra pars compacta (SNc) were used for labeling. Brain sections were permeabilized in PBS with 0.4% Triton X-100 (PBST) for 30 min at room temperature. Sections were then incubated in a blocking solution composed of PBST with 3% bovine serum albumin and 10% normal goat serum for 1h at room temperature. (1) For colocalization experiments: brain sections were incubated overnight at 4°C in rabbit anti-GFP (1/500, Invitrogen, A11122) and goat anti-ChAT (1/100, Millipore, AB144P) for primary antibody exposure. They were then incubated, respectively, in Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit (1/500, Invitrogen, A21206), Alexa Fluor 555 donkey anti-goat (1/500, Invitrogen, A21432) for 1h30 at room temperature. (2) For DA lesion verification: sections were incubated overnight at 4°C in mouse anti-tyrosine hydroxylase (TH) (1/1000, Millipore, MAB318). They were then incubated in Alexa Fluor 594 goat anti-mouse (1/500, Invitrogen, A11005). Immunostaining was done on free-floating sections, which were then mounted onto SuperFrost Plus glass slides (VWR) and coverslipped with FluorSave mounting media (Merck Chemicals). Quantification of colocalization was performed from approximately bregma +1.54 to -4.04 mm using confocal imaging with a Zeiss LM 710 NLO laser-scanning microscope equipped with a 63x/1.32 numerical aperture (NA) oil-immersion lens. TH-positive cells were counted into the substantia nigra using Image J software (National Institutes of Health) and cell number was expressed as the mean number/section. TH immunoreactivity was estimated in the striatum and hippocampus on 6-8 bilateral

measurements in each animal, using Image J software. The extent of the DA lesion was determined and expressed as a percentage of lesioned area relative to the total surface for each structure. Brain regions were identified and delimited in pixels, with reference to the stereotaxic mouse atlas (Paxinos and Franklin, 2001).

Control of cannula and optic fiber implantation. Cresyl violet staining of alternate sections (40 μm) was used to locate the trace of cannula implantation and check the accuracy of injection sites, as well as correct optic fiber placement.

Statistical analysis

All behavioral analyses were conducted on littermates and the values are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). *Immunocytochemistry experiments.* The effect of 6-OHDA lesion in each structure was analyzed using Student's t test. *Optogenetic experiments.* Effects of 6-OHDA lesion and optogenetic photoinhibition were tested by two-way repeated-measures (RM) ANOVA (for elevated plus maze and social interaction tests) or two-way ANOVA (for spatial and non-spatial recognitions tasks) with groups (6-OHDA *versus* sham) as between factor and laser (ON *versus* OFF) as within factor, followed by adapted post-hoc tests between groups (Bonferroni's multiple comparisons test). *Pharmacological experiments.* Effects of 6-OHDA lesion and pharmacological treatment, in independent groups of mice, were analyzed by two-way ANOVA with groups (6-OHDA *versus* sham) as between factor and pharmacological treatment (dose *versus* vehicle) as within factor, followed by adapted post-hoc tests between groups (Bonferroni's multiple comparisons test). Values of $p < 0.05$ were considered as significant for all analyses. Statistical analyses were performed using Prism6 (GraphPad software Inc., La Jolla, USA).

Results

Opsin eNpHR-expression in the striatum and Effect of partial 6-OHDA lesion on the dopaminergic innervation in the SNc, striatum and hippocampus

In transgenic eNpHR mice, opsin eNpHR-expressing neurons, identified as ChAT-expressing neurons, were largely spread over the whole striatum (Figure 1A). In our previous study, recordings of optogenetically identified ChIs in striatal slices and anesthetized mice showed that the opsin was functional (Maurice et al., 2015).

Bilateral 6-OHDA infusions in the dorsal striatum decreased TH-positive cells by 40% in the SNc compared to sham mice (Figure 1B) [Student's t test, $t_{(16)} = 4.665$, $p = 0.0003$]. 6-OHDA lesion induced a partial striatal DA denervation with an average of 48% decrease of TH immunoreactivity in the striatum (Figure 1C) [Student's t test, $t_{(12)} = 11.82$, $p < 0.0001$] and 28% in the hippocampus (Figure 1D) [Student's t test, $t_{(12)} = 9.868$, $p < 0.0001$]. In line with this, the partial striatal DA depletion did not induce any major motor disabilities, contrary to total unilateral nigrostriatal DA lesion. Consistent with that, the spontaneous locomotor activity measured in each behavioral test was not different between sham and 6-OHDA groups.

Photoinhibition of striatal ChIs activity reverses non-motor parkinsonian-like symptoms

We examined the impact of optogenetic photoinhibition of striatal ChIs on several behavioral tests indexing anxiety-like behavior and memory deficits induced by a bilateral nigrostriatal DA lesion.

To evaluate anxiety-like behavior, sham and 6-OHDA transgenic eNpHR mice were tested in the elevated plus maze. Two-way ANOVA with repeated measures revealed a significant lesion x laser interaction on the time spent, distance traveled and number of entries in open arms (Figure 2A) [$F_{(1, 19)} = 4.674$, $p = 0.0436$ (time); $F_{(1, 19)} = 5.793$, $p = 0.0264$ (distance);

$F_{(1,19)} = 5.051$, $p = 0.0367$ (entries)]. In comparison with sham, 6-OHDA mice spent significantly less time in open arms [Bonferroni's test, $p = 0.0032$] and showed a decrease of distance traveled [Bonferroni's test, $p < 0.0001$] and number of entries [Bonferroni's test, $p = 0.0026$] in open arms (Figure 1A). Bilateral yellow laser (589 nm) illumination of striatal ChIs did not affect the phenotype in sham group [Bonferroni's test, laser ON *versus* OFF, $p > 0.9999$ (time), $p > 0.9999$ (distance), $p = 0.9641$ (entries)] whereas it significantly increases the time, the distance and the number of entries in open arms in 6-OHDA mice [Bonferroni's test, laser ON *versus* OFF, $p = 0.0017$ (time), $p = 0.0003$ (distance), $p = 0.0004$ (entries)]. This reflects an anxiolytic effect of the photoinhibition of striatal ChIs only in 6-OHDA mice. No significant difference of the total distance traveled in the entire maze (global locomotion) was found between groups [$F_{(1, 19)} = 1.427$, $p = 0.2470$], showing that anxiolytic-like phenotype produced by a partial 6-OHDA lesion was not produced by a reduction of motor activity. The photoinhibition of striatal ChIs did not modify the global exploratory behavior either in controls or 6-OHDA mice.

To investigate short-term social memory in 6-OHDA mice, we tested the ability of adult mice to recognize a juvenile congener after a second exposure interspaced by a 30-min interval. At the first presentation, the contacts duration and number were similar in sham or 6-OHDA mice, either under laser OFF or ON condition (Figure 2B) [$F_{(1, 19)} = 0.3414$, $p = 0.5659$ (contacts duration) ; $F_{(1, 19)} = 1.848$, $p = 0.1899$ (number of contacts)]. Sham group identified clearly the juvenile, as found by a significant decrease of contacts duration [$F_{(1, 7)} = 27.22$, $p = 0.0012$, Bonferroni's test, $p = 0.0004$ (laser OFF), $p = 0.0018$ (laser ON)] and number of contacts [$F_{(1, 7)} = 23.74$, $p = 0.0018$, Bonferroni's test, $p = 0.0003$ (laser OFF), $p = 0.0016$ (laser ON)] between the second and first presentation of the same juvenile regardless of the photoinhibition of striatal ChIs (laser OFF *versus* ON condition). In contrast, 6-OHDA mice, in laser OFF condition, showed a similar contacts duration [$F_{(1, 12)} = 21.92$, $p = 0.0005$,

Bonferroni's test, $p = 0.1914$] and number of contacts toward the juvenile [$F_{(1, 12)} = 16.28$, $p = 0.0017$, Bonferroni's test, $p > 0.9999$] during the two presentations. Photoinhibition of striatal ChIs during the second presentation in 6-OHDA mice significantly restored the recognition of the juvenile [Bonferroni's test, laser ON *versus* OFF, $p < 0.0001$ (contacts duration); $p = 0.0011$ (number of contacts)]. No significant difference of locomotor activity in the open field was found between the two presentations and between groups [$F_{(3, 38)} = 1.020$, $p = 0.3947$].

We then carried out experiments to assess the role of striatal ChIs on visuospatial memory and novel object recognition processing. The paths of the sham animals revealed an active recognition during the spatial (Figure 2C) and non-spatial (Figure 2D) recognition memory tasks. Two-way ANOVA revealed a significant lesion x laser interaction on recognition index in the spatial recognition task (Figure 2C) [$F_{(1, 32)} = 8.336$, $p = 0.0069$]. 6-OHDA mice showed a significant decrease of the recognition index [Bonferroni's test, $p = 0.0007$]. Photoinhibition of striatal ChIs in 6-OHDA mice significantly restored the recognition index [Bonferroni's test, laser ON *versus* OFF, $p = 0.0029$] without affecting global locomotor activity [$F_{(1, 32)} = 2.618$, $p = 0.1155$]. Interestingly, no effect of either 6-OHDA lesion or photoinhibition of striatal ChIs was observed in the non-spatial recognition task (Figure 2D) [$F_{(1, 32)} = 0.0061$, $p = 0.9384$]. Thus, 6-OHDA lesion impaired only the spatial discrimination but not the novelty detection.

M1 mAChR agonist exacerbates affective dysfunction but improves short-term memory

Another way to investigate the anxiety-like phenotype induced by the 6-OHDA lesion is to test the thigmotaxis in an open field. As previously shown, 6-OHDA lesion did not affect global locomotion as indicated by similar distances covered by sham and 6-OHDA mice, treated with vehicle or McN-A-343 (referred to as McN), M1 mAChR agonist injected into the striatum during the 10 min-test period (Figure 3A) [$F_{(1, 44)} = 2.302$, $p = 0.1364$]. However,

6-OHDA mice showed a pronounced increase in thigmotaxis when compared to sham group, as indicated by paths tracking. 6-OHDA mice spent less time in the center of the open field [$F_{(1, 44)} = 20.37$, $p < 0.0001$, Bonferroni's test, $p = 0.0185$]. McN treatment significantly exacerbated the anxiogenic phenotype observed in 6-OHDA mice [Bonferroni's test, 5 *versus* 0 nmol, $p < 0.0490$].

In the social interaction test, at the first presentation, the contacts duration and number were similar in all groups (Figure 3B) [$F_{(1, 44)} = 0.2995$, $p = 0.5869$ (contacts duration) ; $F_{(1, 44)} = 1.998$, $p = 0.1645$ (number of contacts)]. Sham group, either treated by the vehicle or McN showed a significant decreased of contacts duration [$F_{(1, 18)} = 30.86$, $p < 0.0001$, Bonferroni's test, $p = 0.0026$ (0 nmol), $p = 0.0014$ (5 nmol)] and number of contacts [$F_{(1, 18)} = 33.06$, $p < 0.0001$, Bonferroni's test, $p = 0.0034$ (0 nmol), $p = 0.0006$ (5 nmol)] between the second and first presentation of the same juvenile. In contrast, 6-OHDA mice had a similar contacts duration [$F_{(1, 26)} = 5.098$, $p = 0.0326$, Bonferroni's test, $p = 0.6869$] and number of contacts [$F_{(1, 26)} = 4.714$, $p = 0.0392$, Bonferroni's test, $p = 0.2141$] during the two presentations. Intrastriatal injection of McN in 6-OHDA mice significantly restored the recognition of the juvenile [Bonferroni's test, 5 *versus* 0 nmol, $p < 0.0006$ (contacts duration); $p = 0.0001$ (number of contacts)]. Global locomotor activity in the open field was similar between the two presentations and between groups [$F_{(3, 44)} = 1.426$, $p = 0.2480$].

Visuospatial memory deficits were also assessed. Two-way ANOVA revealed a significant lesion x treatment interaction on recognition index in the spatial recognition task (Figure 3C) [$F_{(1, 42)} = 9.176$, $p = 0.0042$]. 6-OHDA mice had a significant decrease of the recognition index [Bonferroni's test, $p < 0.0001$]. Intrastriatal injection of McN in 6-OHDA mice significantly alleviated the recognition impairment [Bonferroni's test, 5 *versus* 0 nmol, $p = 0.0002$] without affecting global locomotor activity [$F_{(1, 42)} = 0.8316$, $p = 0.3670$]. No effect of either 6-OHDA lesion or McN treatment was observed in the non-spatial recognition task

(Figure 3D) [$F_{(1, 44)} = 0.2823$, $p = 0.5979$].

M1 mAChR antagonist improves affective dysfunction but has no effect on spatial memory

Anxiety-like behavior was assessed in the elevated plus maze. Two-way ANOVA revealed a significant lesion x treatment interaction on the time spent, distance traveled in open arms [$F_{(1, 33)} = 5.375$, $p = 0.0268$ (time); $F_{(1, 33)} = 6.186$, $p = 0.0181$ (distance)] and a tendency on the number of entries in open arms [$F_{(1, 33)} = 3.417$, $p = 0.0735$]. In comparison with sham group, 6-OHDA mice spent significantly less time in open arms [Bonferroni's test, $p = 0.0011$] and showed a decrease of distance traveled [Bonferroni's test, $p < 0.0010$] (Figure 4A). Intraperitoneal injection of M1 mAChR antagonist, telenzepine, did not affect the phenotype in sham group [Bonferroni's test, 0.3 *versus* 0 mg/kg, $p > 0.9999$ (time), $p > 0.7237$ (distance), $p > 0.9999$ (entries)] whereas it significantly increases the time, the distance and the number of entries in open arms in 6-OHDA mice [Bonferroni's test, 0.3 *versus* 0 mg/kg, $p = 0.0096$ (time), $p = 0.0296$ (distance), $p = 0.0666$ (entries)]. No significant difference of the global locomotion traveled in the maze was found between group, regardless of telenzepine treatment [$F_{(1, 33)} = 0.1004$, $p = 0.7534$].

In social interaction, sham group, either treated by vehicle or telenzepine showed a significant decreased of contacts duration (Figure 4B) [$F_{(1, 17)} = 35.79$, $p < 0.0001$, Bonferroni's test, $p = 0.0012$ (0 mg/kg), $p = 0.0010$ (0.3 mg/kg)] and number of contacts [$F_{(1, 17)} = 29.74$, $p < 0.0001$, Bonferroni's test, $p = 0.0021$ (0 mg/kg), $p = 0.0031$ (0.3 mg/kg)] between the second and first presentation of the same juvenile. In contrast, 6-OHDA mice had a similar contacts duration [$F_{(1, 16)} = 18.19$, $p = 0.0006$, Bonferroni's test, $p > 0.9999$] and number of contacts [$F_{(1, 16)} = 17.03$, $p = 0.0008$, Bonferroni's test, $p > 0.9999$] during the two presentations. Intraperitoneal injection of telenzepine in 6-OHDA mice significantly restored the recognition of the juvenile

[Bonferroni's test, 0.3 *versus* 0 mg/kg, $p < 0.0001$ (contacts duration) ; $p < 0.0001$ (number of contacts)]. No significant difference of the locomotor activity in the open field was found between the two presentations and between groups [$F_{(3, 33)} = 0.5681$, $p = 0.6400$].

Visuospatial memory deficits and novelty detection were then assessed. Two-way ANOVA revealed no significant lesion x treatment interaction on recognition index in the spatial recognition task (Figure 4C) [$F_{(1, 42)} = 0.5225$, $p = 0.4738$] but a significant main effect of lesion [$F_{(1, 42)} = 9.176$, $p = 0.0042$] and no effect of telenzepine treatment [$F_{(1, 42)} = 1.685$, $p = 0.2014$]. Global locomotor activity was not affected by 6-OHDA or telenzepine treatment in the spatial recognition task [$F_{(1, 42)} = 0.8316$, $p = 0.3670$]. No effect of either 6-OHDA lesion or telenzepine treatment was observed in the non-spatial recognition task (Figure 4D) [$F_{(1, 42)} = 3.271$, $p = 0.0777$] and in locomotor activity [$F_{(1, 42)} = 0.0304$, $p = 0.8625$].

Discussion

Cholinergic interneurons (ChIs) play a crucial role in the regulation of striatal functions and in the pathophysiology of basal ganglia disorders. In the present study, we used optogenetic photoinhibition of striatal ChIs in mice with partial depletion of striatal dopamine (DA) mimicking an early stage of PD to assess their role in nonmotor dysfunctions of Parkinson's disease (PD). Our results show that striatal ChIs photoinhibition reduces anxiety, short-term social and spatial memory impairment in parkinsonian mice. The preferential M1 mACh receptor agonist, McN, injected locally in the striatum has anxiogenic properties in DA lesioned mice, but reduces the short-term memory deficits. Whereas telenzepine, a preferential M1 receptor antagonist, when injected systemically diminishes the anxiety level of partially lesioned mice and restores the recognition of the juvenile in the social interaction test, without affecting spatial memory impairment.

The cardinal motor symptoms of PD (bradykinesia, muscular rigidity, and resting tremor) are often accompanied by impairments in emotional and cognitive processing. The high prevalence of anxiety and depression in patients with PD before the onset of motor symptoms may serve as a marker of the disease progression. Here we used a mouse model of PD with partial lesions of the DA nigrostriatal system that could recapitulate some of the more common nonmotor symptoms of PD. In the present study, the bilateral injection of 6-OHDA in the medial part of the striatum induced an average of 48 % DA depletion in the striatum and 28 % in the hippocampus. These partial striatal 6-OHDA lesions induced major emotional and cognitive deficits expressed by short-term memory impairment in social investigation and spatial object recognition and increased level of anxiety in the elevated plus maze. The 6-OHDA groups showed no change in the total distance traveled in the open field, during familiarization or testing, neither in total time spent in the elevated plus-maze in

comparison to control animals. This demonstrates the behavioral deficits measured in partially DA depleted mice are not secondary to motor impairment. These findings extend previous findings in rat models of early PD (Branchi et al., 2008; Tadaiesky et al., 2008; Drui et al., 2014) and our recent results (Chen et al., 2014; Aidi-Knani et al., 2015) by showing that partial DA lesions restricted to the nigrostriatal pathway in the mouse may represent a reliable preclinical model to assess memory, motivational and emotional dysfunctions in PD.

Because of the critical involvement of striatal ChIs in learning and synaptic plasticity (Jog et al., 1999; Apicella, 2007; Calabresi et al., 2016), we have evaluated their impact on visuo-spatial memory impairment, the most constantly reported cognitive deficit in PD patients (Chaudhuri et al., 2006; 2011). First, striatal ChIs inactivation by photostimulation of sham transgenic eNpHR mice did not modify either spatial or novel object recognition or global locomotor activity. This is a surprising result considering the role of striatal cholinergic system in procedural learning, memory and behavioral flexibility (Ragozzino, 2003; Havekes et al., 2011). Striatal lesions of the cholinergic system selectively impair responses based on one's own body representation (egocentric learning) but not allocentric hippocampus-related learning (responses based on external cues) (Packard and McGaugh, 1996). Cholinergic cell elimination in the striatum with immunotoxin-mediated cell targeting techniques disrupt procedural learning in the conditioned cue-tone T-maze paradigm and spatial delayed alternation indicating that ChIs in the striatum contributes to working memory-related learning (Kitabatake et al., 2003). The same striatal ChIs ablation had no effect in motor skill nor spatial learning in the water-maze test, however. In addition to mnemonic deficits, there is evidence that suggests that ACh in the striatum is involved in several forms of cognitive flexibility, including reversal learning and set-shifting (Okada et al., 2014; Aoki et al., 2015). However, targeting ChIs by immunotoxin-induced lesions restricted to the dorsal striatum, either disrupt (Aoki et al., 2015) or enhance behavioral flexibility (Okada et al., 2014) raising

the limitations of cell ablation approaches, although restricted to the striatal cholinergic population, that are confounded by issues of possible adaptive mechanisms and lack of reversibility. The use of optogenetic tool to selectively inhibits striatal ChIs allows to elucidate the role of endogenous ACh signaling in critical phases of memory processes in physiological and pathological conditions. Interestingly, unlike viral-targeted ablation, optogenetic photoinhibition of striatal ChIs in control conditions does not produce memory impairment nor changes in anxiety level or locomotor activity. This is consistent with earlier results showing that eNpHR photoillumination inhibits ChIs action potential firing in the striatum but does not modify MSNs membrane excitability and electrophysiological activity of the SNr of sham animals (Maurice et al., 2015; Ztaou et al., 2016). In contrast, photoinhibition of striatal ChIs improved visuospatial discrimination and social recognition that were impaired by partial 6-OHDA lesions of the nigrostriatal DA system. It has long been known that acetylcholine-dopamine imbalance induced by complete DA denervation causes motor deficits in PD. Therefore, the beneficial effects of silencing ChIs on short-term memory processes may be directly linked to the reduction of striatal cholinergic tone in DA-depleted animals and its consequences on membrane excitability, synaptic connectivity and morphological changes of the striatal medium spiny projection neurons (Calabresi et al., 2006; Surmeier et al., 2014; Maurice et al., 2015). Whether a similar dysfunction of the striatal cholinergic system is occurring in the partial DA denervation of early PD awaits further work addressing this issue. In a recent study, Tozzi et al. (2016) induced overexpression of wild-type human α -synuclein (main constituent of Lewy bodies) in the SN as a model of early PD in the rat. A partial reduction of striatal DA level and the impairment of long-term potentiation (LTP) in striatal ChIs (but not in MSNs) was associated with reduced cognitive performance in an active avoidance test, supporting the view that the loss of synaptic plasticity in ChIs may represent a precocious marker of cognitive dysfunctions in

PD (Tozzi et al., 2016). In addition to the striatal dopaminergic dysfunction, also other pathological features generate hippocampal-dependent memory deficits in PD. Deposition of Lewy bodies and Lewy neurites in the hippocampus and other limbic structures have been shown in association with severe cognitive impairment in PD (Churchyard and Lees, 1997). The DA depletion in the hippocampus, even moderate in our model of early PD, may also account for the visuospatial and discriminatory memory deficits. Similar decreases in TH immunoreactivity produced by 6-OHDA in the hippocampus has been previously found to disrupt LTP in the dentate gyrus and impair long-term object recognition (Bonito-Oliva et al., 2014) suggesting a key role for the interaction between dopaminergic transmission and hippocampal plasticity in memory and behavior. An imbalance in this interaction might be implicated in the genesis of dementia and other neuropsychiatric aspects of PD.

Muscarinic cholinergic receptor subtypes M1 and M4 have a predominant expression in the striatum as compared with M2 and M3 subtypes (Bonsi et al., 2011). Interestingly, the preferential M1 agonist, McN injected locally in the striatum at a dose of 5 nmol, does not affect short-term memory processes in sham animals but restores an efficient recognition of spatial changes and pre-exposed juvenile disrupted by partially DA-depleted mice. At that dose McN had no effect on global locomotor activity in the different behavioral test while a full range doses above (7.5, 10 and 20 nmol) clearly depressed locomotor activity of control animals (not shown). Interestingly, the positive action of McN on cognitive deficits is similar to that found after ChIs photoinhibition in the striatum. This puzzling result might be explained by the fact that McN, besides its relatively high efficacy at M1 receptors explaining its widespread use, was recently reported to also bind with high affinity to the M4 mAChRs (Mitchelson, 2012). It is now well-known that muscarinic agonists, in addition to postsynaptic receptors, act on presynaptic M2/M4 autoreceptors coupled to Gi/o proteins on ChIs to limit

the levels of acetylcholine released (Hasselmo and Sarter, 2011). Activation of M4 autoreceptors of ChIs by McN in partial 6-OHDA lesioned mice might thus regulate the disrupted cholinergic excitability in the striatum, as alluded to above, and reverse the cognitive impairment associated with this disruption. Alternatively, McN administered intrastriatally may also activate postsynaptic M1 receptors, coupled to Gq proteins, and highly expressed in both D1- and D2-MSNs. Both classes of MSNs would be excited with M1 activation, but the differential expression pattern of the inhibitory M4 only expressed in the direct striatonigral pathway suggest that ACh influences the two classes of MSNs in opposing directions. Understanding the shift in the balance between the two output pathways that may (or may not) occur at the early stage of the disease will help to decipher the role of M1 and M4 mAChRs in modulating short-term memory deficits.

At high doses, systemically administered nonselective muscarinic antagonists (scopolamine) generally impair memory processes for a wide range of tasks and species, leading to the general assumption that increased cholinergic neurotransmission with cholinesterase inhibitors or ACh agonists may enhance learning and memory. Impairments in cognition and dementia are indeed frequent findings in PD patients at a late stage of the disease (in 75 % of PD patients after 10 years) and are associated with basal forebrain cholinergic loss (Müller and Bohnen, 2013). In PD patients without dementia, impaired cognitive flexibility, decision making, and working memory may also appear early in the disease and are attributable to striatal dopaminergic denervation rather than cortical alteration (Sawamoto et al., 2008). Here, we found that systemic administration of M1 mAChR antagonist telenzepine at a dose of 0.3 mg/kg, which is known to counteract motor deficits in the unilateral extensive 6-OHDA model of PD (Ztaou et al., 2016) produced paradoxical effects in early PD model. There was no enhancement (neither impairment as we may expect from the literature) of

visuospatial discrimination in the object recognition test, but the loss of social recognition of a young rat, mainly dependent upon olfactory cues, in DA-depleted mice was rescued by telenzepine treatment. Olfactory deficits correlate with reduced acetylcholinesterase activity in the amygdala in subjects with moderately severe PD (Bohnen et al., 2010), suggesting that telenzepine acts at presynaptic muscarinic inhibitory autoreceptors (presumably M2) might restore appropriate cholinergic level in this region. Telenzepine treatment at the dose tested, while effective on motor symptoms, does not reproduce the impairment of reversal learning recently observed by Tzavos et al. (2004) after intrastriatal injection. Further investigations with intrastriatal injection telenzepine in the same model of partial DA depletion is clearly needed to elucidate the mechanisms involved (Tzavos et al., 2004).

Besides cognitive impairment, anxiety and depression often occur in patients with PD before the onset of motor symptoms (Nègre-Pagès et al., 2010). Intrastriatal infusion of McN was anxiogenic in the openfield. Interestingly, blockade of M1 receptors with telenzepine or ChIs photoinhibition was anxiolytic in the elevated plus maze. Previous studies found similar effects with McN infused in the ventromedial prefrontal cortex (Wall et al., 2001) or the ventral striatum (Chen et al., 2012) which was blocked by the M1 receptor antagonist pirenzepine. This suggests that increased cholinergic activity in the striatum may underlie the anxiety-like behavior produced by partial 6-OHDA lesions.

In conclusion, while acetylcholine action at M1 mAChRs in the striatum clearly impact affective behavior in the early phase of PD, its effect on short-term memory processes is dependent upon an optimal level of acetylcholine release. While inhibiting cholinergic signaling rescued the motor dysfunctions seen with Parkinson's disease in the late stage of the disease (Barbeau, 1962), this critical dopamine-acetylcholine misbalance is also suggested to underlie the cognitive dysfunction observed early in the disease.

References

- Aidi-Knani S, Regaya I, Amalric M, Murre C (2015) Kv4 channel blockade reduces motor and neuropsychiatric symptoms in rodent models of Parkinson's disease. *Behav Pharmacol* 26:91–100.
- Aliane V, Pérez S, Bohren Y, Deniau J-M, Kemel M-L (2011) Key role of striatal cholinergic interneurons in processes leading to arrest of motor stereotypies. *Brain* 134:110–118.
- Aoki S, Liu AW, Zucca A, Zucca S, Wickens JR (2015) Role of Striatal Cholinergic Interneurons in Set-Shifting in the Rat. *J Neurosci* 35:9424–9431.
- Apicella P (2007) Leading tonically active neurons of the striatum from reward detection to context recognition. *Trends Neurosci* 30:299–306.
- Barbeau A (1962) The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Can Med Assoc J* 87:802–807.
- Beer Z, Chwiesko C, Sauvage MM (2014) Processing of spatial and non-spatial information reveals functional homogeneity along the dorso-ventral axis of CA3, but not CA1. *Neurobiol Learn Mem* 111:56–64.
- Birkmayer W, Hornykiewicz O (1961) [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien Klin Wochenschr* 73:787–788.
- Bohnen NI, Albin RL (2011) The cholinergic system and Parkinson disease. *Behav Brain Res* 221:564–573.
- Bohnen NI, Müller MLTM, Kotagal V, Koeppe RA, Kilbourn MA, Albin RL, Frey KA (2010) Olfactory dysfunction, central cholinergic integrity and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Brain* 133:1747–1754.
- Bonito-Oliva A, Masini D, Fisone G (2014) A mouse model of non-motor symptoms in Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. *Front Behav Neurosci* 8:290.
- Bonsi P, Cuomo D, Martella G, Madeo G, Schirini T, Puglisi F, Ponterio G, Pisani A (2011) Centrality of striatal cholinergic transmission in Basal Ganglia function. *Front Neuroanat* 5:6.

- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197–211.
- Branchi I, D'Andrea I, Armida M, Cassano T, Pèzzola A, Potenza RL, Morgese MG, Popoli P, 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.
- Brichta L, Greengard P, Flajolet M (2013) Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems. *Trends Neurosci* 36:543–554.
- Calabresi P, Picconi B, Parnetti L, Di Filippo M (2006) A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance. *Lancet Neurol* 5:974–983.
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V (2016) Interaction between basal ganglia and limbic circuits in learning and memory processes. *Parkinsonism Relat Disord* 22 Suppl 1:S65–S68.
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AHV, National Institute for Clinical Excellence (2006) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 5:235–245.
- Chaudhuri KR, Odin P (2010) The challenge of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 184:325–341.
- Chaudhuri KR, Odin P, Antonini A, Martinez-Martin P (2011) Parkinson's disease: the non-motor issues. *Parkinsonism Relat Disord* 17:717–723.
- Chen L, Deltheil T, Turle-Lorenzo N, Liberge M, Rosier C, Watabe I, Sreng L, Amalric M, Mourre C (2014) SK channel blockade reverses cognitive and motor deficits induced by nigrostriatal dopamine lesions in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:1295–1306.
- Chen Y-W, Rada PV, Bützler BP, Leibowitz SF, Hoebel BG (2012) Corticotropin-releasing factor in the nucleus accumbens shell induces swim depression, anxiety, and anhedonia along with changes in local dopamine/acetylcholine balance. *Neuroscience* 206:155–166.
- Churchyard A, Lees AJ (1997) The relationship between dementia and direct involvement of the hippocampus and amygdala in Parkinson's disease. *Neurology* 49:1570–1576.

- Cools R (2006) Dopaminergic modulation of cognitive function-implications for L-DOPA treatment in Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 30:1–23.
- Drui G, Carnicella S, Carcenac C, Favier M, Bertrand A, Boulet S, Savasta M (2014) Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Mol Psychiatry* 19:358–367.
- Eskow Jaunarajs KL, Angoa-Perez M, Kuhn DM, Bishop C (2011) Potential mechanisms underlying anxiety and depression in Parkinson's disease: consequences of l-DOPA treatment. *Neurosci Biobehav Rev* 35:556–564.
- Goldberg JA, Reynolds JNJ (2011) Spontaneous firing and evoked pauses in the tonically active cholinergic interneurons of the striatum. *Neuroscience* 198:27–43.
- Gotham AM, Brown RG, Marsden CD (1988) 'Frontal' cognitive function in patients with Parkinson's disease 'on' and 'off' levodopa. *Brain* 111 (Pt 2):299–321.
- Hasselmo ME, Sarter M (2011) Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. *Neuropsychopharmacology* 36:52–73.
- Havekes R, Abel T, Van der Zee EA (2011) The cholinergic system and neostriatal memory functions. *Behav Brain Res* 221:412–423.
- Hirsch EC, Graybiel AM, Duyckaerts C, Javoy-Agid F (1987) Neuronal loss in the pedunculo pontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5976–5980.
- Jellinger K (1988) The pedunculo pontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 51:540–543.
- Jog MS, Kubota Y, Connolly CI, Hillegaart V, Graybiel AM (1999) Building neural representations of habits. *Science* 286:1745–1749.
- Kalkonde YV, Shelton R, Villarreal M, Sigala J, Mishra PK, Ahuja SS, Barea-Rodriguez E, Moretti P, Ahuja SK (2011) The CC chemokine receptor 5 regulates olfactory and social recognition in mice. *Neuroscience* 197:153–161.
- Karachi C, Grabli D, Bernard FA, Tandé D, Wattiez N, Belaid H, Bardinet E, Prigent A, Nothacker H-P, Hunot S, Hartmann A, Lehericy S, Hirsch EC, François C (2010)

- Cholinergic mesencephalic neurons are involved in gait and postural disorders in Parkinson disease. *J Clin Invest* 120:2745–2754.
- Kim H-J, Park S-Y, Cho Y-J, Hong K-S, Cho J-Y, Seo S-Y, Lee D-H, Jeon BS (2009) Nonmotor symptoms in de novo Parkinson disease before and after dopaminergic treatment. *J Neurol Sci* 287:200–204.
- Kish SJ, Tong J, Hornykiewicz O, Rajput A, Chang L-J, Guttman M, Furukawa Y (2008) Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain* 131:120–131.
- Kitabatake Y, Hikida T, Watanabe D, Pastan I, Nakanishi S (2003) Impairment of reward-related learning by cholinergic cell ablation in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7965–7970.
- Kreitzer AC (2009) Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Neuroscience* 32:127–147.
- Lenz JD, Lobo MK (2013) Optogenetic insights into striatal function and behavior. *Behav Brain Res* 255:44–54.
- Lester DB, Rogers TD, Blaha CD (2010) Acetylcholine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther* 16:137–162.
- Lewis SJG, Slabosz A, Robbins TW, Barker RA, Owen AM (2005) Dopaminergic basis for deficits in working memory but not attentional set-shifting in Parkinson's disease. *Neuropsychologia* 43:823–832.
- Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92:180–185.
- Maurice N, Liberge M, Jaouen F, Ztaou S, Hanini M, Camon J, Deisseroth K, Amalric M, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C (2015) Striatal Cholinergic Interneurons Control Motor Behavior and Basal Ganglia Function in Experimental Parkinsonism. *Cell Rep* 13:657–666.
- Mitchelson FJ (2012) The pharmacology of McN-A-343. *Pharmacol Ther* 135:216–245.
- Müller MLTM, Bohnen NI (2013) Cholinergic dysfunction in Parkinson's disease. *Curr*

Neurol Neurosci Rep 13:377.

- Nègre-Pagès L, Grandjean H, Lapeyre-Mestre M, Montastruc JL, Fourrier A, Lépine JP, Rascol O, DoPaMiP Study Group (2010) Anxious and depressive symptoms in Parkinson's disease: the French cross-sectionnal DoPaMiP study. *Mov Disord* 25:157–166.
- Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185–215.
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW (2000) Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23:S8–S19.
- Okada K, Nishizawa K, Fukabori R, Kai N, Shiota A, Ueda M, Tsutsui Y, Sakata S, Matsushita N, Kobayashi K (2014) Enhanced flexibility of place discrimination learning by targeting striatal cholinergic interneurons. *Nature Communications* 5:1–13.
- Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65:65–72.
- Pahapill PA, Lozano AM (2000) The pedunculopontine nucleus and Parkinson's disease. *Brain* 123 (Pt 9):1767–1783.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition. San Diego: Academic Press.
- Pisani AA, Bernardi GG, Ding JJ, Surmeier DJD (2007) Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci* 30:545–553.
- Ragozzino ME (2003) Acetylcholine actions in the dorsomedial striatum support the flexible shifting of response patterns. *Neurobiol Learn Mem* 80:257–267.
- Remy P, Doder M, Lees A, Turjanski N, Brooks D (2005) Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain* 128:1314–1322.
- Sawamoto N, Piccini P, Hotton G, Pavese N, Thielemans K, Brooks DJ (2008) Cognitive

- deficits and striato-frontal dopamine release in Parkinson's disease. *Brain* 131:1294–1302.
- Scarr E (2013) Cholinergic connectivity: it's implications for psychiatric disorders. :1–26.
- Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y (1983) Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res* 275:321–328.
- Surmeier DJ, Graves SM, Shen W (2014) Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 29:109–117.
- Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cagnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN (2008) Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 156:830–840.
- Threlfell S, Cragg SJ (2011) Dopamine signaling in dorsal versus ventral striatum: the dynamic role of cholinergic interneurons. *Front Syst Neurosci* 5:11.
- Tozzi A et al. (2016) Alpha-Synuclein Produces Early Behavioral Alterations via Striatal Cholinergic Synaptic Dysfunction by Interacting With GluN2D N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit. *Biol Psychiatry* 79:402–414.
- Tzavos A, Jih J, Ragozzino ME (2004) Differential effects of M1 muscarinic receptor blockade and nicotinic receptor blockade in the dorsomedial striatum on response reversal learning. *Behav Brain Res* 154:245–253.
- Wall PM, Flinn J, Messier C (2001) Infralimbic muscarinic M1 receptors modulate anxiety-like behaviour and spontaneous working memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 155:58–68.
- Zhou F-M, Wilson C, Dani JA (2003) Muscarinic and nicotinic cholinergic mechanisms in the mesostriatal dopamine systems. *Neuroscientist* 9:23–36.
- Ztaou S, Maurice N, Camon J, Guiraudie-Capraz G, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C, Liberge M, Amalric M (2016) Involvement of Striatal Cholinergic Interneurons and M1 and M4 Muscarinic Receptors in Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *J Neurosci* 36:9161–9172.

Legends

Figure 1. Opsin halorhodopsin (eNpHR) is co-expressed with cholinergic interneurons (ChIs) in the striatum and Partial 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion reduces dopaminergic innervation in the SNc, striatum and hippocampus

A. Top: Co-expression of eNpHR in ChAT-expressing neurons, identified as ChIs, in the striatum of eNpHR transgenic mice. Cx: cortex, Str: striatum, LV: lateral ventricle. Scale bar: 200 μ m. Bottom: Enlargement of indicated squares. Scale bar: 50 μ m.

B. Left: Immunofluorescence images showing TH-positive cells in the substantia nigra (SN) of sham and 6-OHDA mice. Scale bar: 40 μ m. Right: Quantification of TH-positive cells is expressed as mean $\pm$ SEM (n = 8-10). Student's *t* test : *p <0.01 *versus* sham group.

C. Quantification of TH immunoreactivity in the striata and hippocampi (D). Data are expressed as percentage of sham and shown as mean $\pm$ SEM (n = 13). Student's *t* test: *p <0.01 *versus* sham group.

Figure 2. Photoinhibition of striatal ChIs activity reverses affective and memory dysfunctions in partially DA-depleted mice

Effects of photoinhibition of striatal ChIs in elevated plus maze (A), social interaction (B), spatial object recognition (C) and non-spatial object recognition (D) tasks.

A. Quantification showed the time spent, distance traveled, number of entries in open arms and the global locomotion traveled in the maze. Each sham (n = 8) and 6-OHDA (n = 13) group performed the test under two conditions: laser OFF and laser ON. Values are shown as mean $\pm$ SEM. Bonferroni's test after significant two-way RM ANOVA: *p <0.01 *versus* sham-laser OFF; #p<0.01 in comparison between laser ON and OFF.

B. Quantification showed the contacts duration, the number of contacts and the global locomotion of the first presentation (P1) and the second presentation (P2) to a same juvenile

mouse for each sham (n = 8) and 6-OHDA (n = 13) group, under two conditions: laser OFF and laser ON. Values are shown as mean $\pm$ SEM. Bonferroni's test after significant two-way RM ANOVA: $^+p < 0.01$ in comparison between P1 and P2.

C-D. Left: Representative paths of sham showing an active recognition during the spatial object recognition (C) and non-spatial object recognition (D) tasks. Right: Quantification of recognition index and global locomotion in the open field for the spatial object recognition (C) and non-spatial object recognition (D) tasks measured in the four groups: sham-laser OFF (n = 7), sham-laser ON (n = 6), 6-OHDA-laser OFF (n = 10) and 6-OHDA-laser ON (n = 13). Data are reported as mean $\pm$ SEM. Bonferroni's test after significant two-way ANOVA: $^*p < 0.01$ *versus* sham-laser OFF; $\#p < 0.01$ in comparison between laser ON and OFF.

Figure 3. M1 mAChR agonist exacerbates affective dysfunction while improving memory processing in in partially DA-depleted mice

Effects of McN in the open field (A), social interaction (B), spatial object recognition (C) and non-spatial object recognition (D) tasks.

A. Left: Representative paths of sham and 6-OHDA mice measured thigmotaxis in an open field. Right: Quantification showing the time spent in the central zone of the open field and global locomotion. Data are reported as mean $\pm$ SEM. Bonferroni's test after significant two-way ANOVA: $^*p < 0.05$ *versus* vehicle-sham group; $\#p < 0.05$ *versus* vehicle-6-OHDA group.

B. Quantification showed the contacts duration, the number of contacts and the global locomotion of the first presentation (P1) and the second presentation (P2) to a same juvenile. Values are shown as mean $\pm$ SEM. Bonferroni's test after significant two-way ANOVA: $^+p < 0.01$ in comparison between P1 and P2.

C-D. Quantification of recognition index and global locomotion in the open field for the spatial object recognition (left, C) and non-spatial object recognition (right, D) tasks. Data are

reported as mean $\pm$ SEM. Bonferroni's test after significant two-way ANOVA: * $p < 0.01$ *versus* vehicle-sham group; # $p < 0.01$ *versus* vehicle-6-OHDA group.

All tests were performed in four different groups: vehicle-sham ($n = 9$), McN-sham ($n = 11$), vehicle-6-OHDA ($n = 14$) and McN-6-OHDA ($n = 14$).

Figure 4. M1 mAChR antagonist improves affective dysfunction while having no effect on memory processing in partially DA-depleted mice

Effects of telenzepine in elevated plus maze (A), social interaction (B), spatial object recognition (C) and non-spatial object recognition (D) tasks.

A. Quantification showed the time spent, distance traveled, number of entries in open arms and the global locomotion traveled in the maze. Values are shown as mean $\pm$ SEM. Bonferroni's test after significant two-way ANOVA: * $p < 0.05$ *versus* vehicle-sham group; # $p < 0.05$ *versus* vehicle-6-OHDA group.

B. Quantification showed the contacts duration, the number of contacts and the global locomotion of the first presentation (P1) and the second presentation (P2) to a same juvenile. Values are shown as mean $\pm$ SEM. Bonferroni's test after significant two-way ANOVA: $^+p < 0.01$ in comparison between P1 and P2.

The elevated plus maze and social interaction tests were performed in four different groups: vehicle-sham ($n = 9$), telenzepine-sham ($n = 10$), vehicle-6-OHDA ($n = 9$) and telenzepine-6-OHDA ($n = 9$).

C-D. Quantification of recognition index and global locomotion in the open field for the spatial object recognition (left, C) and non-spatial object recognition (right, D) tasks in the four groups: vehicle-sham ($n = 10$), telenzepine-sham ($n = 9$), vehicle-6-OHDA ($n = 13$) and telenzepine-6-OHDA ($n = 14$). Data are reported as mean $\pm$ SEM. Bonferroni's test after significant two-way ANOVA: * $p < 0.01$ *versus* vehicle-sham group.

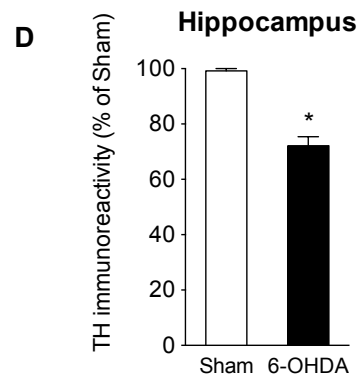
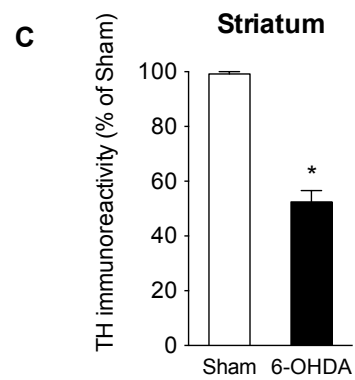
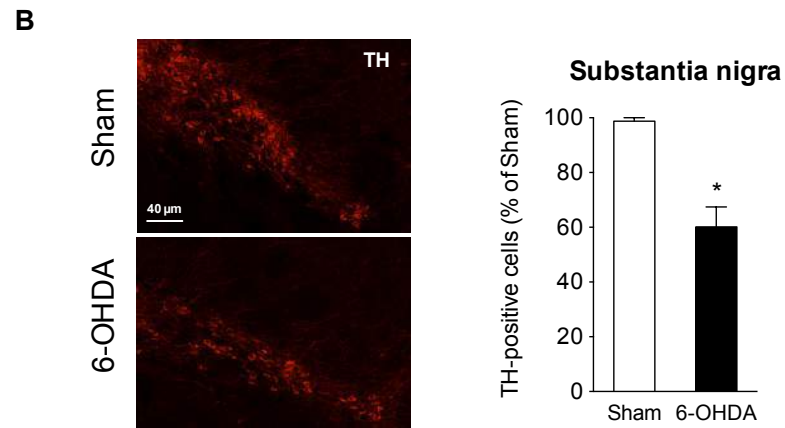
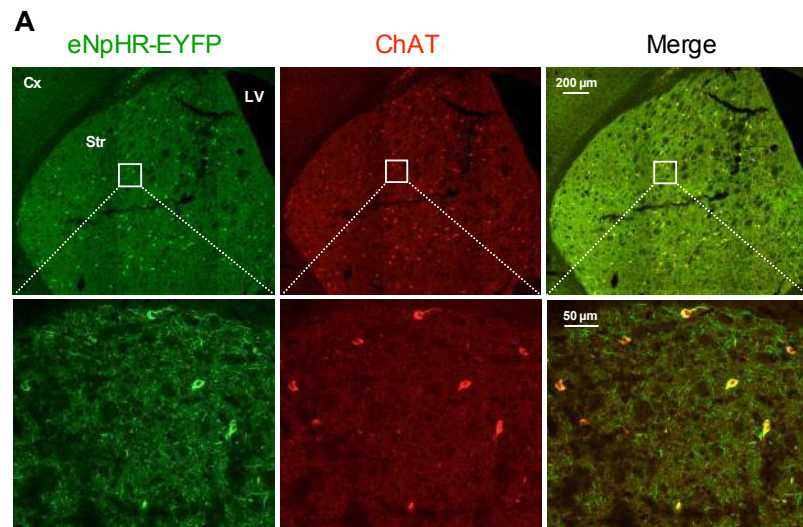
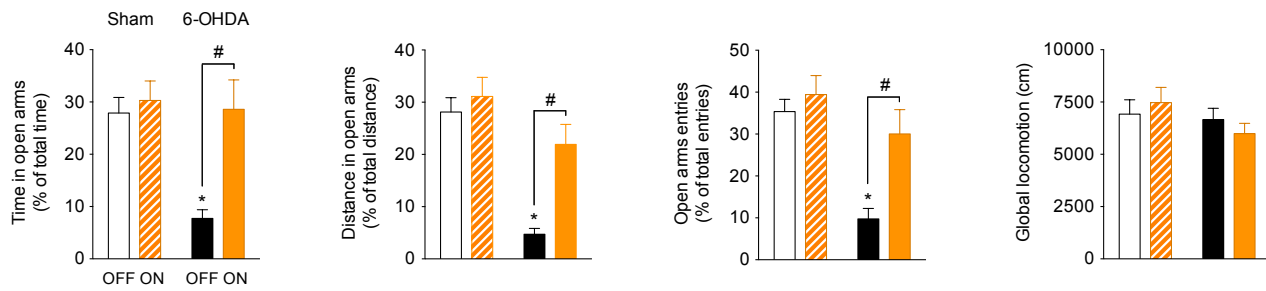
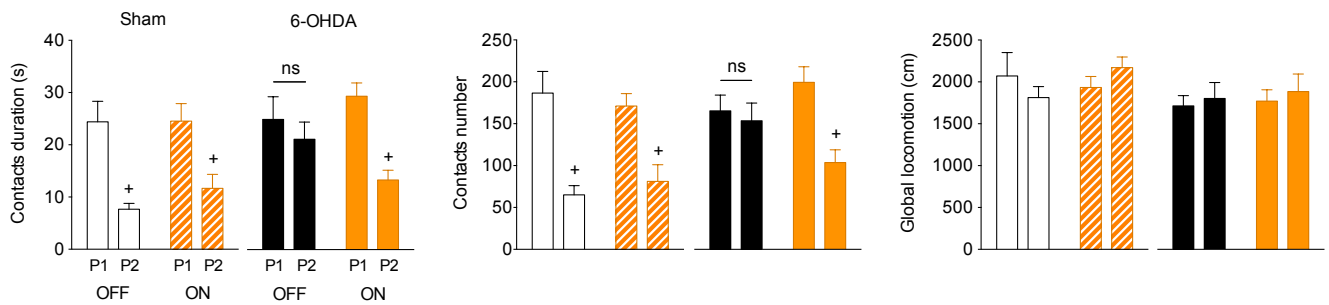


Figure 1

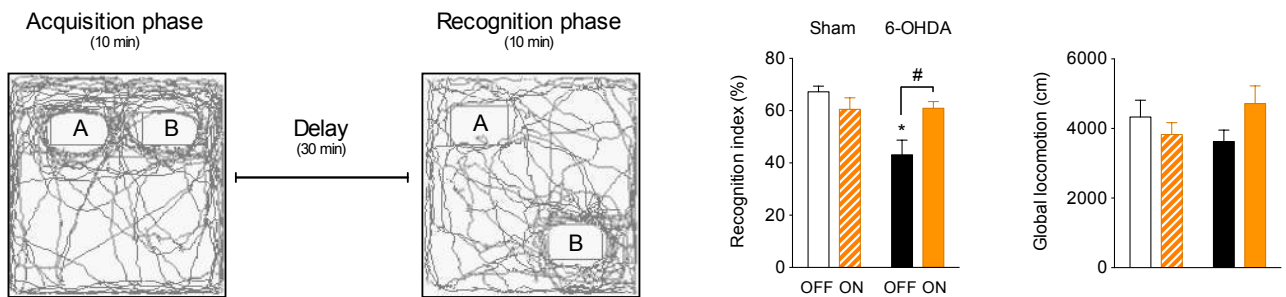
A – Elevated plus maze



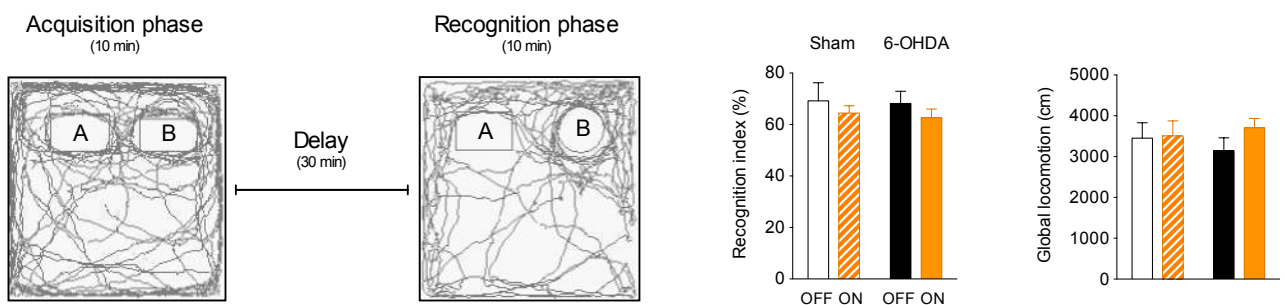
B – Social interaction



C – Spatial object recognition



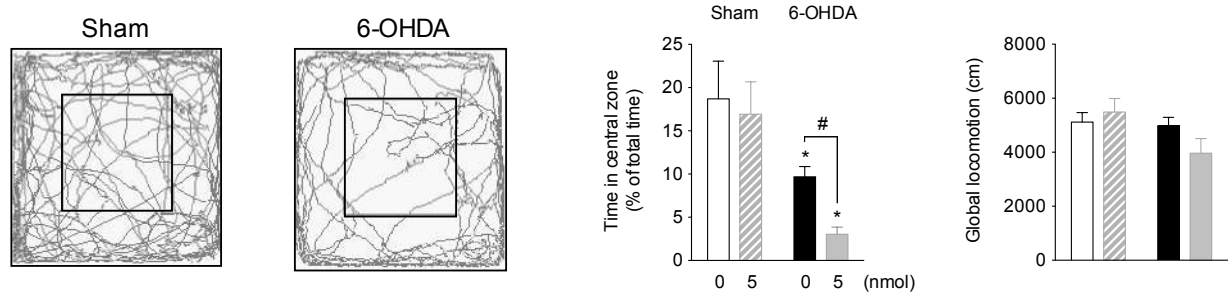
D – Non-spatial object recognition



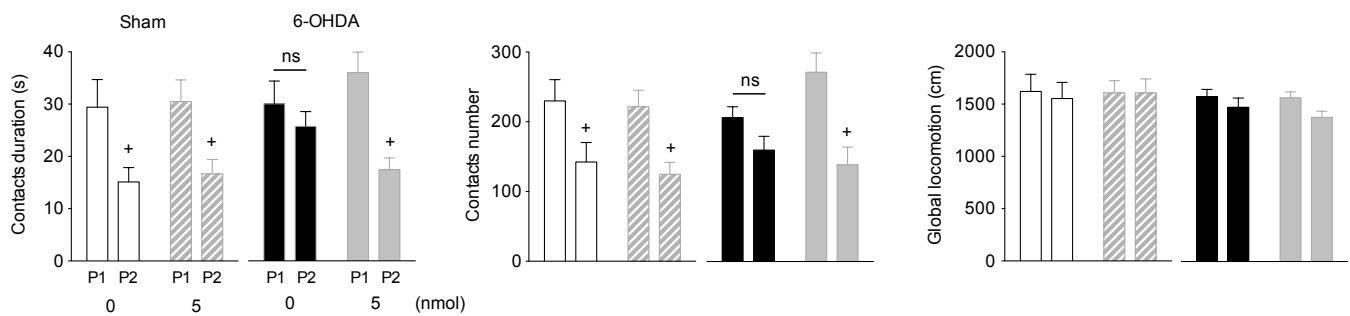
Sham : □ Laser OFF ▨ Laser ON 6-OHDA : ■ Laser OFF ■ Laser ON

Figure 2

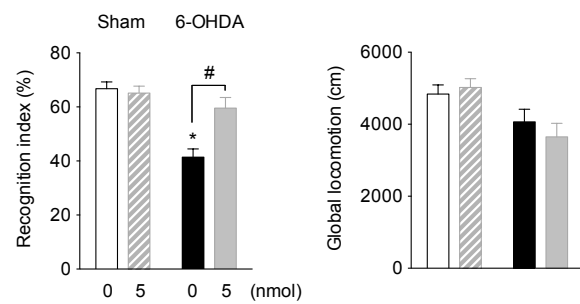
A – Open field



B – Social interaction



C – Spatial object recognition



D – Non-spatial object recognition

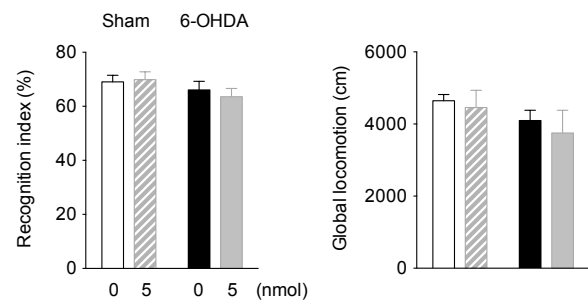
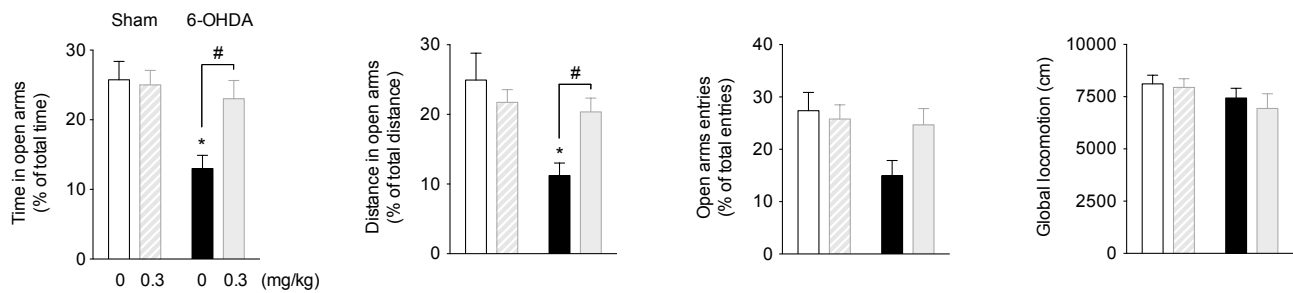
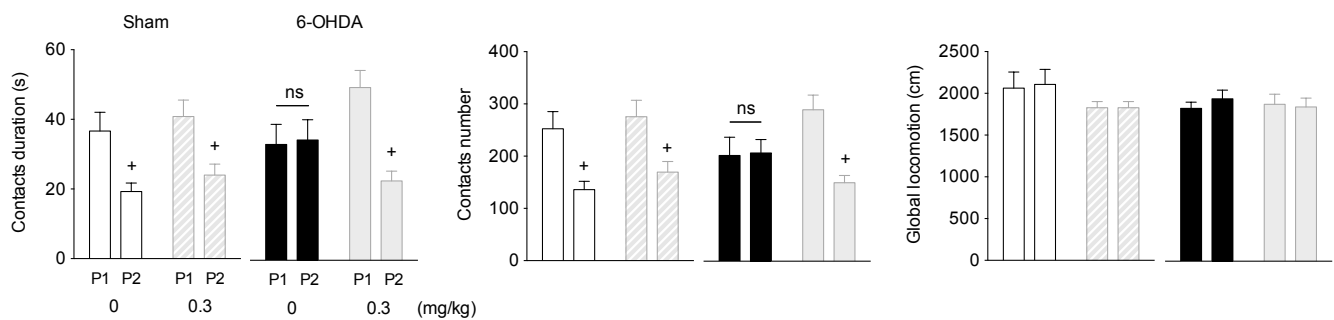


Figure 3

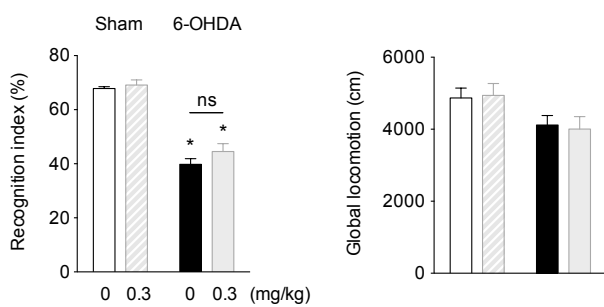
A – Elevated plus maze



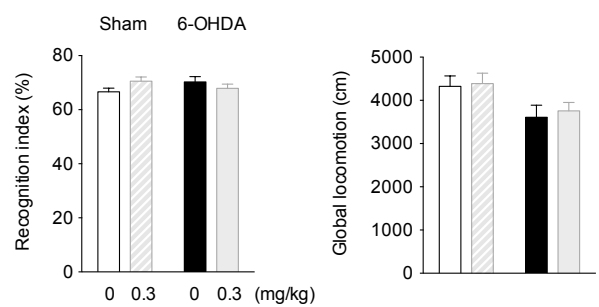
B – Social interaction



C – Spatial object recognition



D – Non-spatial object recognition



Sham : □ Vehicle □ Telenzepine 6-OHDA : ■ Vehicle ■ Telenzepine

Figure 4

DISCUSSION

Discussion

L'ensemble de cette discussion est articulé autour de quatre points : le premier point abordé est relatif aux aspects méthodologiques des expériences présentées dans cette thèse ; dans le deuxième point, nous tenterons de définir et de discuter les différentes hypothèses pouvant rendre compte des effets induits par l'inhibition des ChIs striataux sur les déficits moteurs de la maladie de Parkinson (MP) ; le troisième point discutera les effets du blocage des récepteurs muscariniques (mAChRs) M1 et M4 sur les déficits moteurs ; le quatrième point concerne plus particulièrement les hypothèses pouvant rendre compte des effets induits par l'inhibition des ChIs striataux et de la modulation des mAChRs M1 dans les déficits mnésiques et émotionnels ; enfin dans une dernière partie, nous conclurons sur le rôle des récepteurs muscariniques striataux dans les mécanismes qui sous-tendent l'expression des déficits moteurs et non-moteurs dans la MP.

1. Aspects méthodologiques

1.1. Validité de l'approche optogénétique

Dans nos trois études, l'approche optogénétique nous a permis d'étudier la fonction des interneurones cholinergiques (ChIs), qui représentent seulement 1-2% de la population neuronale du striatum, de manière spécifique et transitoire chez la souris éveillée. Contrairement aux études utilisant des ablations sélectives et permanentes des ChIs striataux soit par la toxine diphtérique (Won et al., 2014) (93% de perte cholinergique), soit par immunotoxine (Kaneko et al., 2000; Hikida et al., 2001) (75% de perte cholinergique), l'approche optogénétique a permis de contrôler l'activité des ChIs de manière transitoire. De plus, en accord avec les données de la littérature (Bennett et al., 2000; Goldberg and Wilson, 2009), nos données montrent que l'expression des opsines ne modifie pas les propriétés électrophysiologiques des ChIs.

L'efficacité de l'approche optogénétique dépend principalement de deux facteurs : (1) l'efficacité de l'expression virale et (2) l'efficacité de la transmission optique. Au regard de la grande variabilité des paramètres de stimulation utilisés dans la littérature, Kravitz et Bonci font le constat que, nombreuses sont les études qui utilisent des puissances et/ou fréquences de stimulation supérieures à celles nécessaires à la décharge physiologique des neurones (Kravitz and Bonci, 2013). Pour exemple, une photoactivation des MSNs par la channelrhodopsine-2 (ChR2) avec une lumière bleue (473 nm) à des intensités variant entre 0.1 et 3 mV a révélé que le taux de décharge des MSNs illuminés était presque maximal dès 1 mV (Kravitz et al., 2012). Plusieurs études ont ainsi photostimulé les MSNs avec des intensités bien plus importantes (au-dessus de 20 mW) (Lobo et al., 2010; Britt et al., 2012; Tai et al., 2012) saturant ainsi vraisemblablement le taux de décharge de ces neurones.

Dans nos conditions expérimentales, l'efficacité de l'approche virale dans les deux premières études a été validée par des approches immunohistologiques et électrophysiologiques, par le groupe de L. Kerkerian-Le Goff. Les expressions des opsines channelrhodopsine-2 (ChR2) et halorhodopsine (eNpHR) dans le striatum sont restreintes au striatum dorsal et s'étendent, en moyenne, sur 1400 μm dans le sens antéro-postérieur (de +1.42 à +0.02 mm d'après l'atlas de souris Paxinos and Franklin, 2001). L'immunomarquage de la ChAT couplé à celui de la mCherry (fluorochrome associé au gène ChR2), ou à celui de la RFP (fluorochrome associé au gène eNpHR), montre que les deux opsines (ChR2-mCherry ou eNpHR-RFP) sont spécifiquement exprimées dans les ChIs du striatum dorsal, confirmant la validité de notre approche. Par ailleurs, plusieurs fréquences de stimulation ont été testées et validées, afin de stimuler l'opsine ChR2 exprimés par les ChIs, et ce dans l'objectif de se rapprocher au plus près de la fréquence de décharge spontanée de ces neurones (2-10 Hz) (Kreitzer, 2009). L'étude de Tye et coll. a montré que la diffusion de la lumière émise par un laser est atténuée quand elle traverse le tissu cérébral (Tye et al., 2011). En effet, une perte de 90 à 95% de la puissance lumineuse émise à l'extrémité des fibres optiques est observée lorsque la lumière traverse une épaisseur de tissu d'environ 500 μm pour atteindre la structure cible. Les puissances lumineuses appliquées dans nos travaux de thèse (11.3 et 20.0 mW/mm² pour le laser bleu et jaune, respectivement, mesurées à 200 μm de la pointe des fibres optiques) tiennent compte de cette perte. Les données électrophysiologiques *in vitro* en patch-clamp sur tranches striatales, mais également en

électrophysiologie *in vivo* chez la souris anesthésiée ont confirmé que la stimulation par le laser bleu (473 nm) ou le laser jaune (589 nm) des ChIs, qui expriment la ChR2 ou l'eNpHR, induit respectivement une activation ou une inhibition réversible de leur activité (Maurice et al., 2015; Ztaou et al., 2016).

Afin de générer les souris transgéniques exprimant l'opsine eNpHR exclusivement dans les neurones cholinergiques (« souris transgéniques eNpHR »), les souris Ai39 issues de l'élevage du laboratoire de Jackson (USA) ont été croisées avec des souris ChAT^{cre/cre} dans notre laboratoire. Chez les souris transgéniques eNpHR, l'expression de l'eNpHR dans les neurones cholinergiques a été contrôlée et validée, elle est illustrée dans l'article 3 (Ztaou et al., *en préparation*). L'utilisation de ces souris transgéniques eNpHR permet de s'affranchir de l'étape de transfection virale, et garantit une distribution spatiale des neurones exprimant l'opsine reproductible chez tous les animaux. L'implantation des fibres optiques localement dans le striatum dorsal, ainsi que la faible dispersion de la lumière dans le tissu cérébral, assure une photoinhibition circonscrite à cette structure cérébrale.

Nous avons fait le choix de photoinhiber les neurones en exprimant l'opsine eNpHR (pompe qui permet l'entrée des ions Cl⁻) plutôt que l'opsine Archaeorhodopsine (eArch, pompe faisant sortir les protons H⁺). Lorsque nous avons initié l'approche optogénétique, les données de la littérature concernant l'eArch étaient parcellaires (Chow et al., 2010), alors que l'eNpHR était déjà largement utilisée. Une étude récente a révélé que l'utilisation d'une pompe aux ions Cl⁻ (eNpHR) pour inhiber l'activité de neurones GABAergiques de l'hippocampe (étude sur tranches), à des stimulations de longue durée ou de forte puissance, pouvait altérer la transmission GABAergique au-delà de la période de stimulation, cet effet rémanent n'est par contre pas observé avec les pompes aux ions H⁺ (Raimondo et al., 2012). Dans notre étude, une variation de l'équilibre des concentrations intra et extracellulaire en Cl⁻ (du potentiel d'équilibre du Cl⁻) pourrait ainsi expliquer le « rebond » d'activité des ChIs observé dans nos enregistrements électrophysiologiques après la période de photoinhibition (Maurice et al., 2015; Ztaou et al., 2016). Néanmoins, une étude électrophysiologique *in vitro* très récente, réalisée sur des tranches hippocampales, a montré que l'activation des deux opsines eNpHR et eArch inhibe bien le déclenchement des potentiels d'action (Mahn et al., 2016). Cependant, la stimulation soutenue de l'eArch peut avoir des effets inattendus ; elle augmente la libération spontanée de glutamate par les terminaisons pré-synaptiques glutamatergiques. Le mécanisme

proposé pour expliquer cet effet paradoxal est que l'illumination prolongée de l'eArch provoque une alcalinisation du cytoplasme (consécutive à la sortie des ions H^+), responsable de l'activation de canaux calciques pH-dépendants, et donc de l'augmentation de la libération spontanée de glutamate (Mahn et al., 2016). Ces nouvelles données suggèrent que l'eNpHR est à ce jour l'outil optogénétique le plus approprié pour inhiber l'activité neuronale (Wiegert and Oertner, 2016).

1.2. Validité de la lésion dopaminergique

1.2.1. Lésion unilatérale totale

Conformément aux données de la littérature (Heuer et al., 2012a; Smith et al., 2012a; Heuer et al., 2012b), la lésion unilatérale par injection de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) au niveau de la SNc chez la souris induit une déplétion en DA quasi-totale dans le striatum ipsilatéral à l'injection.

De manière intéressante, la lésion 6-OHDA n'entraîne pas d'hyperactivité mais une hyperexcitabilité des ChIs dans nos conditions expérimentales (Maurice et al., 2015). Des études en électrophysiologie *in vitro* montrent que la déplétion dopaminergique aigue après traitement par un inhibiteur de la TH (α -méthyl-para-tyrosine) (Fino et al., 2007) ou après une injection de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale (MFB) (Tubert et al., 2016) produisent également une augmentation de l'excitabilité des ChIs striataux (Deffains and Bergman, 2015). Ding et coll. proposent que la libération accrue d'ACh par les ChIs striataux soit la conséquence d'une baisse de l'efficacité des autorécepteurs M4 à inhiber la libération d'ACh (Ding et al., 2006). En effet, ils montrent que la déplétion dopaminergique striatale n'altère pas les voies de signalisation impliquant les récepteurs D2, mais provoque une diminution de la signalisation engageant les autorécepteurs M4 (en raison de la surexpression des protéines RGS4), augmentant ainsi l'excitabilité des ChIs.

L'impact d'une lésion 6-OHDA totale sur l'excitabilité des MSNs-D1, à l'origine de la voie directe, et des MSNs-D2 à l'origine de la voie indirecte, a également été évalué en électrophysiologie *in vitro* par Corinne Beurrier. En condition physiologique, les MSNs-D2 sont plus excitables que les MSNs-D1. Ces résultats corroborent certaines données d'études antérieures (Kreitzer and Malenka, 2007; Gertler et al., 2008; Fieblinger et al., 2014). Dans nos conditions lésionnelles, l'injection de 6-OHDA dans la SNc affecte différemment les deux populations de MSNs : l'excitabilité des MSNs-D1

est augmentée, alors que celle des MSNs-D2 est inchangée (Maurice et al., 2015). Une étude récente montre des résultats en partie similaires à notre étude, à savoir une augmentation de l'excitabilité des MSNs-D1, mais également une légère diminution de l'excitabilité des MSNs-D2, lorsque la déplétion dopaminergique striatale est induite par une injection de 6-OHDA dans le MFB (Fieblinger et al., 2014). La disparité des résultats obtenus dans les deux études pourrait s'expliquer par l'utilisation de modèles lésionnels et des délais post-lésionnels différents. En effet, les données de la littérature montrent que selon les modèles utilisés – lésions aiguës ou chroniques – les effets sur l'excitabilité des MSNs-D2 peuvent être opposés (Day et al., 2006; Shen et al., 2007; Fieblinger et al., 2014). L'augmentation de l'excitabilité des MSNs-D1 pourrait être considérée comme un processus homéostatique établi pour contrebalancer la diminution de l'activité de ces neurones de la voie directe, induite par la perte de leur excitation dopaminergique en condition pathologique.

Du point de vue fonctionnel, les lésions 6-OHDA unilatérales réalisées dans nos travaux induisent les déficits moteurs classiquement observés (Carli et al., 1985; Schwarting and Huston, 1996; Konitsiotis et al., 1998; Iancu et al., 2005; Glajch et al., 2012; Heuer et al., 2012a), tels que l'asymétrie posturale, la bradykinésie et les déficits sensori-moteurs (Maurice et al., 2015; Ztaou et al., 2016). Les troubles moteurs induits par la lésion unilatérale apparaissent du côté controlatéral à la lésion – du fait de la décussation des fibres au niveau du tronc cérébral – et se manifestent par un biais ipsilatéral des performances des animaux dans nos tests comportementaux.

1.2.2. Lésion bilatérale partielle

L'étendue des lésions dopaminergiques partielles varie selon la dose de 6-OHDA administrée dans le striatum : 31.5% (Courtière et al., 2005), 35 % (Chen et al., 2014), 36-40% (Branchi et al., 2008; 2010), 40-60% (Drui et al., 2014), 65% (Bonito-Oliva et al., 2014a; 2014b) et jusqu'à 75% (De Leonibus et al., 2007) de perte des terminaisons dopaminergiques striatales. Dans nos conditions, la lésion bilatérale par injection de 6-OHDA dans le striatum dorsal chez la souris, entraîne une déplétion partielle en DA, avec une perte de 40% des neurones dopaminergiques de la SNc, et une perte de 48% des terminaisons dopaminergiques dans le striatum (Ztaou et al., *en préparation*).

Au niveau fonctionnel, la lésion 6-OHDA bilatérale partielle réalisée dans cette troisième étude n'altère pas l'activité locomotrice spontanée mesurée lors des différents tests comportementaux

évaluant les capacités mnésiques et l'état émotionnel des animaux. En effet, les souris lésées ne présentent pas de déficits posturaux, comme il l'a été observé dans des études précédemment réalisées chez le rat (Chen et al., 2014) et la souris (De Leonibus et al., 2007; Bonito-Oliva et al., 2014a). Elle induit par contre des déficits non-moteurs tels que des déficits mnésiques (mémoire sociale et mémoire spatiale à court terme) et de l'anxiété, comme il l'a été récemment décrit dans la littérature (De Leonibus et al., 2007; Tadaiesky et al., 2008; Chen et al., 2014; Bonito-Oliva et al., 2014a). De manière intéressante, la lésion partielle n'entraîne pas de déficits de la reconnaissance d'un nouvel objet – la reconnaissance de la nouveauté est intacte – mais altère spécifiquement la mémoire spatiale, ce qui conforte des données précédemment obtenues chez le rat dans notre laboratoire (Chen et al., 2014; Aidi-Knani et al., 2015) et la souris (De Leonibus et al., 2007).

L'utilisation d'un modèle de lésion partielle, qui n'altère pas les aspects moteurs, constitue un outil de choix lorsque l'on s'intéresse aux phases précoces de la pathologie. La caractérisation des symptômes dans cette phase pré-motrice (ou prodromique) pourrait à terme permettre un diagnostic plus précoce de la MP (Meissner, 2012) et d'explorer des stratégies neuroprotectrices. Cependant, bien que la lésion bilatérale partielle induite par une injection de 6-OHDA au niveau du striatum soit un modèle de choix pour mimer l'aspect progressif (Blandini and Armentero, 2012; Stott and Barker, 2014) et bilatéralisée de l'atteinte dopaminergique, l'accumulation d' α -synucléine et l'apparition de corps de Lewy ne sont pas observées. Ces caractéristiques anatomopathologiques observées chez l'Homme dans la MP, mais absentes chez les souris lésées bilatéralement par la 6-OHDA, constituent la principale limite de notre modèle.

2. Rôle des ChIs striataux dans les déficits moteurs de la MP

2.1. Effets comportementaux de l'inhibition des ChIs striataux

Nous avons évalué les effets de la photo-modulation des ChIs striataux dans deux modèles expérimentaux de la MP : le modèle pharmacologique à l'halopéridol et le modèle de lésion unilatérale, totale, à la 6-OHDA. Conformément aux données de la littérature (Sanberg, 1980), l'halopéridol, en agissant principalement sur les récepteurs dopaminergiques de type D2, produit un

état cataleptique qui s'apparente à l'akinésie parkinsonienne. Lorsque la catalepsie est induite, les latences de descente de la barre sont augmentées, témoignant de la difficulté des animaux à initier le mouvement. La photoinhibition des ChIs diminue l'état cataleptique des souris (ayant reçu l'AAV contenant l'eNpHR) pendant les phases d'induction et de plateau de la catalepsie. Elle augmente aussi le nombre des ébauches de mouvements de tête effectués par les animaux pour tenter de sortir de l'état cataleptique, et ce spécifiquement pendant les phases d'illumination du laser (3 min), ce qui démontre la spécificité d'action de la stimulation optogénétique. L'effet bénéfique de la photoinhibition des ChIs sur les déficits moteurs est également observé dans le modèle de lésion 6-OHDA, où elle réduit l'asymétrie posturale dans le test du cylindre et le déficit sensori-moteur dans le cross maze.

De manière paradoxale, la photostimulation des ChIs striataux chez les animaux du groupe ChR2 (recevant l'AAV contenant le gène ChR2) n'induit aucun effet dans les deux modèles étudiés. Nous pouvions nous attendre à ce que la photoactivation des ChIs striataux chez ces souris ChR2 facilite l'induction de la catalepsie, ou plus globalement aggrave les déficits moteurs causés par la lésion 6-OHDA. Les déficits moteurs induits par l'halopéridol ou la 6-OHDA dans nos expériences sont sans doute déjà « tellement importants » qu'ils ne peuvent être modulés dans ce sens. La vérification (1) du niveau d'expression de l'opsine ChR2 dans le striatum dorsal, qui est comparable à celui de l'eNpHR, (2) des conditions de stimulation de la ChR2 (la fréquence de 10 Hz utilisée est la fréquence de stimulation qui montre une probabilité d'induire 100% de potentiels d'action; plus cette fréquence est augmentée, plus la probabilité diminue) permet d'écarter l'hypothèse d'éventuels écueils méthodologiques dans nos conditions expérimentales. Néanmoins, plusieurs points sont cependant à mentionner concernant l'expression de la ChR2. En effet, des motifs d'exportation du réticulum endoplasmique et des signaux contrôlant le trafic cellulaire ont été rajoutés à la séquence contenant l'eNpHR, permettant ainsi une meilleure expression dans les fibres nerveuses (Gradinaru et al., 2010). Or, la ChR2 ne contient pas ces séquences, elle pourrait donc être plus difficilement transportée dans les compartiments neuronaux. Les propriétés intrinsèques du canal ChR2 (cinétique d'ouverture et de fermeture, conductivité) ne cessent d'être améliorées par mutagenèse (Mattis et al., 2012). L'utilisation d'une ChR2 modifiée pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de la photoactivation des ChIs.

Dans nos conditions expérimentales, l'inhibition des ChIs striataux n'induit aucune modification de la sévérité des dyskinésies induites par le traitement à la L-DOPA. Une étude antérieure a par contre montré dans un modèle de lésion 6-OHDA injectée dans le MFB et dans un modèle génétique de la MP (souris invalidées pour le facteur de transcription Pitx3, souris Pitx3^{ak/ak}) que la prise répétée de L-DOPA activent les kinases ERK ½, et en retour augmente l'excitabilité des ChIs (Ding et al., 2011). Ces réponses électrophysiologiques des ChIs sont corrélées avec l'expression des dyskinésies, et suggèrent que l'utilisation d'antagonistes cholinergiques (muscariniques ou nicotiniques) pourrait atténuer les dyskinésies induites par la L-DOPA.

2.2. Effets cellulaires de l'inhibition des ChIs striataux

Les corrélats cellulaires de l'amélioration des déficits moteurs ont également étudiés.

Les enregistrements électrophysiologiques *in vivo* chez la souris anesthésiée révèlent que la photoinhibition des ChIs striataux normalise le patron d'activité des neurones de la SNr, altéré par la lésion 6-OHDA. De nombreuses études rapportent, en effet, que la MP est associée à une augmentation de l'activité de décharge des noyaux des ganglions de la base (GB), incluant la SNr, que ce soit chez l'Homme ou dans des modèles animaux de la pathologie (Wichmann et al., 1999; Rivlin-Etzion et al., 2006; Lobb, 2014). Il apparaît donc dans notre étude que la diminution de l'activité en bouffées des neurones de la SNr induite par la photoinhibition des ChIs contribue à améliorer les déficits moteurs observés dans nos tests comportementaux.

Nos données électrophysiologiques obtenues *in vitro* à partir de tranches de cerveau de souris lésées montrent que la photoinhibition des ChIs potentialise la transmission cortico-striatale glutamatergique tant sur les MSN-D1 de la voie directe que sur les MSN-D2 de la voie indirecte (Maurice et al., 2015). L'activité résultant de cette potentialisation sur l'activité des voies directe et indirecte au niveau du striatum s'exprime cependant en sortie des GB, par une diminution de l'activité des neurones de la SNr (activité exacerbée par la lésion 6-OHDA). Ces données laissent supposer que l'inactivation des ChIs striataux renforce préférentiellement l'influence inhibitrice des MSNs-D1 de la voie directe – voie connue pour être hypoactive dans la MP – sur les neurones de la SNr. L'hypothèse d'une action spécifiquement dirigée sur la voie directe est confirmée par les données électrophysiologiques *in vivo* obtenues par Nicolas Maurice lors de l'enregistrement des

neurones de la SNr chez la souris anesthésiée. En effet, en réponse à une stimulation corticale, la réponse triphasique typique enregistrée dans les neurones de la SNr se compose d'excitations précoce et tardive séparées par une inhibition, représentant respectivement l'activation des voies hyperdirecte, directe et indirecte. Nos données montrent que la photoinhibition des ChIs striataux n'agit que sur la composante inhibitrice de cette réponse triphasique dans les neurones de la SNr – elle augmente sa durée –, suggérant un renforcement de l'influence inhibitrice de la voie directe, qui a pour conséquence d'atténuer les déficits moteurs induits par la lésion 6-OHDA unilatérale. Des données antérieures montrant qu'une photoactivation des MSNs-D1 de la voie directe par la ChR2 réduit les déficits moteurs (diminution du freezing et de la bradykinésie, augmentation de l'activité locomotrice) des souris lésées par la 6-OHDA (Kravitz et al., 2010) confortent nos résultats.

L'important degré de convergence des MSNs-D1 de la voie directe sur les neurones de la SNr (48 neurones du striatum converge sur un seul neurone de la SNr) (Smith et al., 1998) pourrait expliquer comment cette augmentation, même « modeste », de la transmission glutamatergique cortico-striatale sur les MSNs-D1 peut inhiber en sortie l'activité des neurones de la SNr. La photoinhibition des ChIs striataux aurait cependant pu également agir au niveau des MSNs-D2 de la voie indirecte pour diminuer l'influence de cette voie (connue pour être hyperactive dans la MP) et réduire en conséquence l'activité des neurones de la SNr. Kravitz et coll. montre ainsi que l'activation optogénétique des MSNs-D2 aggrave les déficits moteurs (augmentation du freezing, de la bradykinésie et diminution de l'activité locomotrice) de souris lésées par la 6-OHDA (Kravitz et al., 2010). Nos données électrophysiologiques *in vivo* montrent à l'inverse une absence d'effet inhibiteur de la photoinhibition des ChIs sur la composante excitatrice tardive (correspondant à l'activité de la voie indirecte) de la réponse triphasique des neurones de la SNr. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que la voie indirecte est une voie polysynaptique où l'intégration complexe des informations au niveau de chaque relai synaptique pourrait minimiser les effets de l'augmentation de la transmission cortico-striatale sur les MSNs-D2 (Maurice et al., 2015).

Afin de mieux comprendre comment une inactivation des ChIs striataux module l'activité des voies directe et indirecte, et réduit au final les troubles moteurs, avons aussi évalué l'impact de cette inactivation sur l'excitabilité des deux populations de MSNs en conditions physiologique et lésionnelle. De nombreuses études (Surmeier et al., 2007; Gerfen and Surmeier, 2011; Fieblinger et al.,

2014; Surmeier et al., 2014) montrent une différence d'excitabilité entre les MSNs-D1 et les MSNs-D2 en condition physiologique ; les MSNs-D2 sont plus excitable que les MSNs-D1, déséquilibre d'excitabilité que nous enregistrons aussi dans cette étude, et qui semble crucial au fonctionnement normal des GB. Nous avons observé que la déplétion dopaminergique striatale ne modifie pas l'excitabilité des MSNs-D2, en revanche elle augmente l'excitabilité des MSNs-D1. Ces deux effets réduisent le déséquilibre d'excitabilité qu'il existe entre les MSN-D1 et les MSNs-D2 en condition physiologique, et cette réduction contribuerait au déclenchement des troubles moteurs induit par la lésion dopaminergique (Maurice et al., 2015). Nos résultats montrent que l'inactivation optogénétique des ChIs striataux en condition lésionnelle, réduit l'excitabilité des deux types de MSNs, mais cette diminution est plus marquée pour les MSNs-D1 que pour les MSNs-D2. Ces effets tendent donc à rétablir le déséquilibre d'excitabilité entre les voies directe et indirecte qui existe en condition physiologique, et pourraient expliquer l'amélioration des déficits moteurs observés dans les tests comportementaux après photoinhibition des ChIs.

Il apparaît donc au vu de l'ensemble de ces résultats qu'une réduction du différentiel d'activité entre les voies directe et indirecte, plus qu'une augmentation de l'activité de la voie directe et/ou d'une diminution de celle de la voie indirecte, serait responsable de l'apparition des troubles moteurs induit par une déplétion en DA striatale. L'inactivation optogénétique des ChIs striataux, en réduisant préférentiellement l'activation cholinergique des MSNs de la voie directe, contribue à l'amélioration des troubles moteurs observés, en restaurant cette différence d'activité, essentielle au fonctionnement normal des GB.

3. Rôle des mAChRs M1 et M4 striataux dans les déficits moteurs

Afin d'identifier par quels mécanismes l'augmentation des taux d'ACh striatale, associée à la baisse de ceux de DA, module l'excitabilité des MSNs et induit les troubles moteurs observés, nous avons étudié plus spécifiquement les récepteurs cholinergiques potentiellement impliqués dans les effets antiparkinsoniens précédemment observés. En effet, une fois libérée, l'ACh diffuse dans la fente synaptique et exerce son action en se fixant aussi bien sur les récepteurs nicotiniens (nAChRs) que sur les muscariniques (mAChRs). L'expression hétérogène de ces récepteurs dans le striatum rend

l'étude de la transmission cholinergique dans le striatum très complexe (Pisani et al., 2007; Bonsi et al., 2011; Oldenburg and Ding, 2011).

Cette deuxième étude montre que l'injection périphérique de scopolamine, un antagoniste non sélectif des mAChRs, réduit les déficits moteurs (asymétrie posturale et déficit sensori-moteur) des souris lésées unilatéralement après injection de 6-OHDA dans la SNc de manière aussi efficace que la L-DOPA (Ztaou et al., 2016) le traitement de référence actuellement utilisé dans la MP chez l'Homme (Carlsson et al., 1957; Birkmayer and Hornykiewicz, 1961; Cotzias et al., 1969). Les résultats obtenus avec la scopolamine ne sont pas surprenants. En effet, ils (1) sont en accord avec les données recueillies lors d'études cliniques chez l'Homme visant à évaluer les effets d'antagonistes muscariniques classiques (benzatropine, bipéridène, trihexyphénydile, tropatépine) sur la symptomatologie motrice de la MP (Katzenschlager et al., 2003; Clarke, 2004; Ferreira et al., 2013), ou lors d'études récentes réalisées sur des modèles animaux de la maladie utilisant la dicyclimone ou la scopolamine (Ding et al., 2011; Xiang et al., 2012) et (2) confirment l'hypothèse d'un antagonisme fonctionnel entre la DA et l'ACh striatales (Duvoisin, 1967; Hornykiewicz and Kish, 1987).

Nous nous sommes ensuite plus particulièrement intéressés aux rôles de deux sous-types de mAChRs, les mAChRs M1 et M4, du fait de leur expression prédominante dans le striatum (Weiner et al., 1990; Hersch and Levey, 1995; Volpicelli and Levey, 2004; Chapman et al., 2011).

3.1. Effets du blocage pharmacologique des mAChRs M1 striataux

L'injection périphérique ou intrastriatale de télenzépine, un antagoniste préférentiel des mAChRs M1, reproduit les effets bénéfiques de la scopolamine, suggérant que les mAChRs M1 du striatum dorsal jouent un rôle important dans la symptomatologie motrice de la MP.

Du point de vue comportemental, nos résultats sont dans la ligne de données obtenues chez des souris M1-KO qui présentent une transmission dopaminergique striatale exacerbée (Gerber et al., 2001). D'après ces auteurs, la délétion des récepteurs M1 des MSNs chez ces souris, réduit leur action inhibitrice sur les neurones dopaminergiques de la SNc, induisant ainsi une activité de décharge plus importante et, par conséquent, une libération accrue de DA dans le striatum. Une étude récente montre que l'utilisation d'un antagoniste sélectif des mAChRs M1 (VU0255035) a un effet bénéfique sur les déficits moteurs, toutefois moins efficace que celui de la scopolamine : il réverse partiellement

l'akinésie et la catalepsie, alors que l'inhibition est totale avec la scopolamine (Xiang et al., 2012). Leurs données électrophysiologiques *in vitro* montrent également que l'activation des mAChRs M1 (par un agoniste des mAChRs M1, le BQCA pour « benzylquinolone carboxylic acid ») induit un effet exciteur sur les MSNs (Xiang et al., 2012).

Les mAChRs M1 sont couplés aux protéines Gq/11. Leur stimulation active la phospholipase C, responsable de la synthèse d'inositol trisphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG), et au final d'une augmentation des taux de calcium intracellulaire (Oldenburg and Ding, 2011; Goldberg et al., 2012). D'après les revues de la littérature, les mAChRs M1 sont largement exprimés par les deux populations de MSNs (Kreitzer, 2009; Bonsi et al., 2011; Goldberg and Reynolds, 2011; Goldberg et al., 2012). Les effets post-synaptiques de l'activation des mAChRs présents sur les MSNs sont complexes. Néanmoins, comme il l'a été précédemment évoqué, de nombreuses études montrent que l'activation des mAChRs M1 augmente l'excitabilité des MSNs (Goldberg and Reynolds, 2011; Xiang et al., 2012) et en conséquence leur activité (Calabresi et al., 1998a; 1999; Kreitzer and Malenka, 2008; Bonsi et al., 2011; Oldenburg and Ding, 2011; Goldberg et al., 2012). Dans nos tests comportementaux réalisés après lésion dopaminergique, le blocage des mAChRs M1 post-synaptiques des MSNs striataux pourrait contribuer à réduire leur excitabilité exacerbée par la lésion 6-OHDA. Dans le schéma classique de fonctionnement des GB, la voie directe est considérée comme hypoactive et la voie indirecte comme hyperactive dans la MP, nous pouvons faire l'hypothèse que l'amélioration des déficits moteurs induits par la télenzépine dans notre étude s'effectue par une action antagoniste préférentiellement dirigée sur les mAChRs M1 présents sur les MSNs-D2 à l'origine de la voie indirecte.

3.2. Effets du blocage pharmacologique des mAChRs M4 striataux

Notre étude a montré que les injections périphérique, ou centrale, de tropicamide, un antagoniste préférentiel des mAChRs M4, entraînent des effets comportementaux bénéfiques ; elles réduisent les déficits moteurs, révélant l'implication des mAChRs M4 du striatum dorsal dans la symptomatologie motrice.

Il a été montré que la tropicamide supprime les tremblements de la mâchoire dans deux modèles rongeurs expérimentaux, les tremblements induits soit par injection d'un agoniste

muscarinique non-sélectif (pilocarpine), soit par injection d'un antagoniste des récepteurs D2 (pimozide) (Betz et al., 2007). De manière intéressante, une étude rapporte que la scopolamine réduit la catalepsie induite par une injection d'halopéridol chez des souris *wild-type*, mais a un effet moindre chez des souris M4 KO, suggérant un rôle important des mAChRs M4 dans l'akinésie, qui caractérise la MP (Karasawa et al., 2003).

Les mAChRs M4 sont couplés aux protéines Gi/o, leur activation réduit la concentration intracellulaire en AMPc et inhibe les canaux calciques (Wess, 1996; Pisani et al., 2007; Wess et al., 2007; Bonsi et al., 2011; Oldenburg and Ding, 2011; Goldberg et al., 2012). Ils sont majoritairement exprimés sur les MSNs-D1 (Bernard et al., 1992; Ince et al., 1997; Santiago and Potter, 2001; Yan et al., 2001; Kreitzer, 2009), mais aussi par les ChIs du striatum où ils jouent le rôle d'autorécepteurs en diminuant la libération d'ACh (Calabresi et al., 2000a; Ding et al., 2006; Pisani et al., 2007; Bonsi et al., 2011; Oldenburg and Ding, 2011). Une étude rapporte qu'une déplétion en DA striatale réduit l'efficacité des autorécepteurs M4 à inhiber la libération d'ACh, elle serait un des facteurs expliquant l'augmentation de l'excitabilité des ChIs dans la MP (Ding et al., 2006). L'activation des mAChRs M4 striataux module l'activité synaptique striatale par une action double ; (1) elle diminue la libération d'ACh et (2) diminue l'excitabilité des MSNs-D1. Dans notre étude, la tropicamide injectée dans le striatum dorsal peut en conséquence (1) bloquer les autorécepteurs M4, dont l'activité est réduite par la déplétion dopaminergique, supprimant ainsi leur capacité à inhiber la libération d'ACh (ce qui produit un excès d'ACh dans les fentes synaptiques) et (2) bloquer les mAChRs M4 post-synaptiques exprimés sur les MSNs-D1. L'amélioration des déficits moteurs que nous observons après l'injection intrastriatale de tropicamide suggère une action préférentielle de la tropicamide sur les mAChRs post-synaptiques M4 exprimés sur les MSNs-D1.

Nous avons confirmé cette hypothèse en utilisant des souris *knock-out*, génétiquement modifiées pour ne plus exprimer de mAChRs M4 post-synaptiques sur les MSNs-D1 de la voie directe (souris D1-M4-KO). L'injection de tropicamide chez les souris D1-M4-KO lésées par la 6-OHDA n'améliore plus les déficits moteurs, suggérant que les mAChRs M4 exprimés sur les MSNs-D1 jouent un rôle crucial dans la symptomatologie motrice parkinsonienne. La tropicamide, en bloquant l'action de l'ACh sur les mAChRs M4 post-synaptiques des MSNs-D1, rétablit vraisemblablement le déséquilibre d'excitabilité entre les voies indirecte et directe, réduit par la lésion

6-OHDA. Ces résultats corroborent ceux de notre première étude qui montre que l'inhibition des ChIs diminue ce déséquilibre d'excitabilité, en réduisant préférentiellement l'hyperexcitabilité des MSNs-D1 induite par la lésion 6-OHDA (Maurice et al., 2015).

Des données obtenues chez des souris M4 KO montrent que ces animaux présentent une activité locomotrice basale augmentée, et que l'activation des récepteurs D1 aggrave cette hyperactivité locomotrice (Gomez et al., 1999b). L'activation des mAChRs M4 par l'ACh exercent donc vraisemblablement un rôle inhibiteur sur la stimulation de la locomotion médiée par les récepteurs D1, probablement au niveau des MSNs-D1 où ces deux récepteurs coexistent. La stimulation des mAChRs M4 s'oppose à l'activation de l'adénylate cyclase induite par un agoniste sélectif des récepteurs D1, ce qui suggère une interaction des activités dopaminergique et cholinergique au niveau des MSNs-D1 (Onali and Olanas, 2002). Dans notre étude, les souris D1-M4-KO présentent une activité locomotrice basale augmentée et sont plus anxieuses. Ces deux comportements pourraient s'expliquer par une augmentation de l'activité dopaminergique. En effet, une augmentation de la libération de DA a été observée dans la partie ventrale du striatum chez ces souris mutantes dans deux études antérieures (Jeon et al., 2010; Dencker et al., 2011). Si une telle augmentation de la libération de DA s'observait également dans le striatum dorsal, nous aurions pu nous attendre à ce que nos souris mutantes présentent moins de déficits moteurs que les souris *wild-type*. Mais la lésion dopaminergique est tellement extensive dans nos conditions expérimentales, qu'elle entraîne la dégénérescence de la totalité des neurones dopaminergiques ; la DA ne peut donc être libérée.

Une étude électrophysiologique récente a révélé que l'activation par l'ACh des mAChRs M4 présents au niveau des terminaisons pré-synaptiques glutamatergiques diminue la libération de glutamate (Pancani et al., 2014). Le blocage des mAChRs M4 des terminaisons pré-synaptiques glutamatergiques par la tropicamide pourrait donc conduire à un excès de libération de glutamate dans les fentes synaptiques. Nous pouvons cependant écarter cette hypothèse d'action de la tropicamide dans notre étude. En effet, si tel était le cas, elle s'accompagnerait d'aggravations des déficits moteurs chez les animaux lésés. Pancani et coll. proposent, quant à eux, l'utilisation d'un agoniste des mAChRs M4 (VU0152100, ML108) pour réduire l'augmentation de la transmission glutamatergique des synapses cortico-striatales chez les patients parkinsoniens.

4. Rôle des ChIs striataux dans les déficits non-moteurs de la MP

Comme décrit dans la littérature (De Leonibus et al., 2007; Tadaiesky et al., 2008; Chen et al., 2014; Bonito-Oliva et al., 2014a; Aidi-Knani et al., 2015), la lésion bilatérale partielle induit un phénotype anxieux, des déficits de mémoire sociale et spatiale à court-terme, mais n'affecte pas la mémoire de la nouveauté, reconnue pour être préservée en dépit de la déplétion dopaminergique (De Leonibus et al., 2007).

Les données cliniques et expérimentales obtenues au cours de ces dernières décennies ont montré que la fonction du striatum n'est pas uniquement orientée vers l'acte moteur mais qu'elle englobe des fonctions variées allant de l'apprentissage et la mémoire, à la motivation et aux processus émotionnels. La prise en charge de ces divers processus engage des territoires précis du striatum dont la spécialisation dépend étroitement de la topographie des afférences corticales. Les projections dopaminergiques issues de la SNc et de la VTA, qui innervent respectivement le striatum dorsal et ventral, modulent l'ensemble de ces fonctions. Les données obtenues avec les modèles de lésion dopaminergique nigrostriée chez le rongeur ont montré que la déplétion en DA dans le striatum dorsal induit des déficits dans différentes tâches cognitives faisant appel à la mémoire de travail, spatiale, de reconnaissance d'objets et produit des troubles attentionnels et émotionnels (De Leonibus et al., 2007; Tadaiesky et al., 2008; Dunnett and Lelos, 2010; Chen et al., 2014; Bonito-Oliva et al., 2014a).

Les déficits cognitifs observés dans la MP sont généralement attribués à une altération des projections dopaminergiques de la voie mésocorticale (Crofts et al., 2001; Cools et al., 2002). Cependant, il a été suggéré qu'ils pourraient être aussi liés à une altération de la transmission dopaminergique sous-corticale (Dubois and Pillon, 1997; Collins et al., 2000; Crofts et al., 2001; Berger et al., 2004; Cools et al., 2007). En effet, les troubles cognitifs (troubles attentionnels et de flexibilité comportementale) observés chez les patients parkinsoniens diffèrent de ceux dont souffrent les patients atteints de lésions du lobe frontal (Owen et al., 1993). De plus, les déficits cognitifs de la MP sont observés dans les stades précoces de la maladie lorsque la dégénérescence dopaminergique est restreinte aux projections striatales (Owen et al., 1997; Pillon et al., 1997) suggérant qu'ils pourraient être dus à l'altération des voies dopaminergiques sous-corticales.

Le rôle de l'ACh dans l'expression des déficits cognitifs de la MP semble plus complexe que celui de la DA, et diffère selon les structures cérébrales concernées. En effet, un déficit de la transmission cholinergique corticale lié à la dégénérescence des neurones cholinergiques issus du noyau basal de Meynert est décrit dans la pathologie de Parkinson (Bohnen and Albin, 2011; Müller and Bohnen, 2013). Alors qu'une augmentation de l'activité cholinergique striatale associée à la forte dégénérescence (70-90%) des neurones dopaminergiques de la SNc est abondamment décrite lorsqu'apparaissent les troubles moteurs de la MP au cours des stades avancés de la pathologie, il n'existe à ce jour, à notre connaissance, qu'une seule étude (Tozzi et al., 2016) qui ait évalué l'activité des ChIs du striatum dans un modèle mimant les stades précoces de la MP, lorsque les taux de DA striatale sont partiellement réduits par l' α -synucléine, et leur rôle dans la survenue des déficits cognitifs.

4.1. Effets de l'inhibition des ChIs striataux et de la modulation pharmacologique des mAChRs M1 dans les déficits mnésiques

Afin de mieux comprendre le rôle des ChIs striataux dans l'expression des déficits non-moteurs observés dans les phases précoces de la MP, nous avons évalué les effets de la photoinhibition des ChIs dans différents tests évaluant les capacités mnésiques (mémoire spatiale, sociale et de la nouveauté) de souris lésées par une injection bilatérale partielle de 6-OHDA.

Nous avons d'abord vérifié que la photoinhibition des ChIs n'altérerait pas l'activité locomotrice et exploratrice des animaux lorsqu'ils réalisaient les tests cognitifs et émotionnels. Nos données montrent que l'inactivation des ChIs ne modifie pas la locomotion des animaux, comme l'ont décrit Okada et coll. après une ablation sélective des ChIs striataux par injection d'une immunotoxine (Okada et al., 2014).

L'inhibition optogénétique des ChIs striataux réduit par contre les déficits de mémoire spatiale et sociale des animaux lésés, suggérant que ces troubles cognitifs pourraient résulter d'une augmentation de l'excitabilité des ChIs du striatum dorsal comme nous l'avons observé pour les déficits moteurs dans nos deux premières études (Maurice et al., 2015; Ztaou et al., 2016).

Ces résultats s'opposent toutefois aux données classiques de la littérature décrivant le rôle crucial de l'ACh striatale dans les processus mnésiques, attentionnels ou de flexibilité comportementale (Chang and Gold, 2003; Kitabatake et al., 2003; Ragozzino et al., 2009; Aoki et al., 2015). Cependant, ces données de la littérature peuvent parfois aussi être discordantes. Elles dépendent des tâches comportementales et des méthodes utilisées pour moduler l'activité cholinergique, ce qui ne permet pas de dégager un constat clair du rôle des ChIs striataux en condition physiologique. En effet, pour exemple, Ragozzino et coll. montrent une augmentation de l'ACh libérée dans le striatum dorsal chez le rat lors de la réalisation d'une tâche d'apprentissage inversée évaluant la flexibilité comportementale (Ragozzino et al., 2002). Le blocage pharmacologique des mAChRs M1 striataux s'accompagne d'une altération de cette flexibilité (Ragozzino et al., 2002; Tzavos et al., 2004). À l'inverse, Okada et coll. indiquent que la lésion des ChIs induit des effets opposés dans la même tâche comportementale et concluent que les ChIs striataux inhibent la flexibilité (Okada et al., 2014). Enfin, Aoki et coll. n'observent pas d'effet d'une lésion des ChIs sur l'apprentissage inversé (Aoki et al., 2015).

Finalement, les résultats bénéfiques que nous observons après photoinhibition des ChIs striataux sur la mémoire spatiale sont en ligne avec ceux obtenus par Okada et coll. (Okada et al., 2014). Ils peuvent également être corrélés aux travaux de Brown et coll. qui montrent qu'une pause des ChIs induite par l'activation optogénétique des neurones de projection GABAergiques de la VTA vers le striatum ventral (qui ne représentent que 25% de l'ensemble des neurones de projection, les autres neurones de la VTA étant dopaminergiques) favorise l'apprentissage associatif (Brown et al., 2012).

Peu d'études n'ont à ce jour évalué l'effet d'une déplétion partielle en DA striatale sur l'activité cholinergique striatale, et les déficits cognitifs qui en découlent, ce qui contribue à rendre l'interprétation de nos résultats difficile. Si l'ACh est indispensable à de nombreux processus mnésiques, comment expliquer pourquoi, alors que l'activité cholinergique striatale est probablement augmentée par la déplétion en DA (Cf. Etudes 1 et 2) les déficits mnésiques ne sont-ils pas moindres ?

Dans le striatum, les neurones dopaminergiques et les ChIs exercent un contrôle réciproque de la libération de leurs neurotransmetteurs (Pisani et al., 2003a; Cragg, 2006; Threlfell et al., 2012). Cependant, une déplétion en DA striatale partielle n'induit probablement pas la même régulation de l'activité des ChIs qu'une déplétion totale. En effet, dans le cas d'une déplétion totale en DA,

l'absence de stimulation des récepteurs D2 présents sur les ChIs par la DA (récepteurs D2 inhibiteurs de la libération d'ACh), augmente la libération d'ACh striatale. En revanche, la déplétion partielle pourrait induire, non pas une augmentation de l'activité cholinergique mais plus vraisemblablement une baisse de cette activité. La DA, libérée par les neurones dopaminergiques épargnés de la dégénérescence, pourrait moduler négativement, via les récepteurs D2, l'activité des ChIs et en conséquence la libération d'ACh. Une baisse de la libération d'ACh striatale couplée à celle de DA, pourrait ainsi rendre compte des déficits cognitifs observés dans notre étude.

Cette hypothèse est confortée par les travaux de Tozzi et coll. qui montrent qu'une injection d' α -synucléine humaine dans la substance noire induit une réduction partielle des taux de DA striatale, qui bloque sélectivement l'induction de la LTP des ChIs striataux sans affecter celle des MSNs (Tozzi et al., 2016). La diminution de l'activité cholinergique striatale est associée à une altération des capacités mnésiques des animaux dans un test opérant d'évitement actif. Pour ces auteurs, le dysfonctionnement de la transmission cholinergique striatale et les troubles cognitifs qui en résultent seraient des marqueurs biologiques précoces de la pathologie de Parkinson (Tozzi et al., 2016).

Cette hypothèse est également confortée par des études comportementales et anatomiques récentes (Bradfield et al., 2013; Smith et al., 2014). Smith et coll. rapportent que l'analyse post-mortem de cerveaux de patients parkinsoniens, présentant des déficits moteurs modérés, montre une perte de 30-40% des neurones glutamatergiques issus des noyaux centromédian et parafasciculaire du thalamus, et que la dégénérescence de cette voie thalamo-striatale ne s'aggrave pas avec la sévérité des symptômes moteurs. Bradfield et coll. montrent qu'une lésion de la voie glutamatergique thalamo-striatale chez le rat – voie issue du noyau parafasciculaire du thalamus et qui projette majoritairement vers les ChIs du striatum dorsal – entraîne une diminution de l'activité de ces neurones, et s'accompagne de déficits d'acquisition d'apprentissages nouveaux. Les déficits cognitifs observés chez les patients parkinsoniens dans les phases précoces de la pathologie pourraient résulter de la perte des neurones glutamatergiques de cette voie thalamo-striatale qui s'ajouterait à celle des neurones des systèmes dopaminergique et cholinergique, depuis longtemps décrits dans la pathologie.

Nos résultats montrent également, qu'au-delà de la perte partielle de DA dans le striatum dorsal, notre lésion 6-OHDA entraîne également une perte dopaminergique dans l'hippocampe. Des données récentes révèlent que l' α -synucléine altère deux mécanismes majeurs qui sous-tendent les fonctions cognitives, (1) la LTP dans les ChIs striataux, support cellulaire de la mémoire procédurale et (2) la LTP des neurones hippocampaux qui interviennent dans la mémoire épisodique. Cette perte en DA dans l'hippocampe pourrait aussi participer aux déficits cognitifs observés dans nos tests comportementaux (Calabresi et al., 2016).

Finalement, nos données concernant les déficits mnésiques restent difficiles à interpréter car nous n'avons pas encore mesuré l'activité électrophysiologique des ChIs dans nos conditions de déplétion dopaminergique partielle ; comme nous l'avons réalisé pour la déplétion dopaminergique totale qui s'accompagne d'une augmentation de l'excitabilité des ChIs. Comme nous observons qu'une diminution de l'activation cholinergique striatale par photoinhibition des ChIs améliore les troubles cognitifs – amélioration que l'on observe également pour les troubles moteurs – nous ne pouvons exclure que la déplétion dopaminergique partielle induise aussi une hyperexcitabilité des ChIs qui serait responsable des troubles cognitifs. En effet, Newman et Gold rapportent qu'un tonus cholinergique qu'il soit trop faible ou trop important (induit par injection d'agonistes cholinergiques ou d'inhibiteurs de l'AChE) altère les processus mnésiques (Newman and Gold, 2016).

Pour tenter de comprendre par quels mécanismes d'action, sur quels mAChRs, l'ACh agit pour induire l'expression des déficits cognitifs chez les souris partiellement lésées, nous avons modulé pharmacologiquement l'activité des mAChRs M1 par l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes de ces récepteurs.

Nos données révèlent que l'injection de l'agoniste des récepteurs M1, le McN-A-434 (McN), dans le striatum dorsal améliore la mémoire de reconnaissance spatiale à court terme altérée par la lésion 6-OHDA, alors que leur blocage par la télenzépine est sans effet. Ces derniers résultats, obtenus après injection intrastriatale de McN, ne corroborent pas ceux que l'on enregistre après photoinhibition des ChIs. Ils supportent l'hypothèse qu'une diminution de l'activité cholinergique striatale pourrait expliquer les altérations mnésiques observées en condition parkinsonienne.

Le McN, classiquement utilisé comme agoniste sélectif des récepteurs M1, présente cependant aussi une affinité non négligeable pour les récepteurs M4 (efficacité maximale $E_{\max}$ plus importante, et

constante de dissociation K_i plus faible, pour les récepteurs M1 et M4 comparativement aux autres mAChRs) (Mitchelson, 2012). Il est dorénavant décrit comme un agoniste « partiel » des récepteurs M1. On ne peut ainsi négliger une action potentielle sur les autorécepteurs M4 qui réduirait la libération d'ACh et serait associé à l'amélioration des déficits mnésiques obtenus dans les tests comportementaux.

Dans notre étude, l'injection périphérique de l'antagoniste des récepteurs M1, la télenzépine, induit des effets paradoxaux sur les processus mnésiques, à savoir, une absence d'effet sur la mémoire spatiale et une amélioration de la mémoire sociale à court terme. Ces résultats s'opposent aux données rapportées par le groupe de Ragozzino qui montre que l'injection périphérique d'un agoniste partiel des récepteurs M1 (CDD-0102A) améliore la mémoire de travail et la flexibilité comportementale (Ragozzino et al., 2012), et que l'antagoniste de ces récepteurs, la pirenzépine, altère la flexibilité lorsqu'elle est administrée dans le striatum dorsomédian (Tzavos et al., 2004).

D'une manière plus générale, l'injection périphérique d'antagonistes muscariniques non-spécifiques d'un sous-type de récepteurs est connue pour entraîner des dysfonctionnements des processus mnésiques différents selon la dose administrée (Newman and Gold, 2016), et de ce fait rend la compréhension du rôle de l'ACh cérébrale dans les fonctions mnésiques difficile. Ainsi que le tonus cholinergique soit très faible ou très élevé il produirait les mêmes effets délétères. Par ailleurs, toujours selon ces auteurs, un antagoniste des récepteurs muscariniques, comme la scopolamine, altère les processus mnésiques en agissant sur les mAChRs post-synaptiques. Mais elle agit aussi sur les mAChRs pré-synaptiques (M2), augmentant alors la libération d'ACh, et en conséquence améliore les processus mnésiques (Newman and Gold, 2016). Dans notre étude, l'absence d'effet de la télenzépine dans le test évaluant la mémoire spatiale pourrait résulter de ces deux effets opposés de la télenzépine. Une étude pharmacologique a en effet montré que la télenzépine qui a une forte affinité pour les mAChRs de type M1, mais présente aussi une affinité, même si elle est faible, pour les récepteurs M2 (Christofi et al., 1991).

Il a également été montré que l'injection périphérique de scopolamine peut aussi induire une libération de DA dans le striatum (Chapman et al., 1997). Cette double action activatrice de la télenzépine : (1) sur la libération de DA striatale et (2) sur la libération d'ACh via son action sur les mAChRs M2, pourrait expliquer l'amélioration des déficits mnésiques observés dans le test de

mémoire sociale. Afin de s'affranchir des mécanismes d'action extrastriataux, ou non spécifiques, de l'injection périphérique de télenzépine, des expériences complémentaires où la télenzépine sera injectée dans le striatum devront être effectuées.

4.2. Effets de l'inhibition des ChIs striataux et de la modulation pharmacologique de l'activité des mAChRs M1 sur l'anxiété

Concernant le comportement anxieux des souris lésées partiellement à la 6-OHDA, l'injection intrastriatale de l'agoniste préférentiel des récepteurs M1, le McN, aggrave ce comportement, alors que l'injection périphérique de la télenzépine est anxiolytique. Des études antérieures ont montré qu'une augmentation de l'activité cholinergique dans le striatum ventral (Chen et al., 2012) ou dans le cortex préfrontal ventromédian (Wall et al., 2001) chez des animaux non lésés est responsable de l'anxiété. En effet, Wall et coll., montrent qu'une injection de McN dans ces structures, entraîne un comportement anxieux alors que l'injection d'un antagoniste préférentiel des récepteurs M1, la pirenzépine, produit le comportement inverse (Wall et al., 2001). Nos données pharmacologiques, confortées par les résultats bénéfiques de la photoinhibition des ChIs striataux, suggèrent que l'ACh par une action sur les récepteurs M1, pourrait favoriser le comportement anxieux que l'on observe chez les patients dans les phases précoces de la maladie.

Pour résumer, le rôle des mAChRs M1 semble bien établi dans le phénotype anxieux, par contre leur implication dans les processus mnésiques n'apparaît pas aussi évidente. Il est probable que d'autres sous-types de mAChRs ou nAChRs soient également engagés. Par ailleurs, les liens qui relient ACh/DA striatales et ACh/DA corticales ne sont encore totalement élucidés, en particulier en condition parkinsonienne. Une étude récente chez le rongeur a ainsi montré qu'une ablation sélective de ChIs du striatum ventral (noyau accumbens) par immunotoxine altère la voie dopaminergique mésocorticale et en conséquence les fonctions cognitives (mémoire de travail) (Laplante et al., 2012).

5. Conclusion

L'ensemble de nos travaux suggère que les ChIs striataux occupent une place fonctionnelle importante au sein des GB. En effet, nos données montrent que les ChIs, bien qu'en faible proportion dans le striatum, exercent un rôle crucial dans le contrôle de l'excitabilité des MSNs, et ce uniquement en condition pathologique, lorsque le tonus dopaminergique striatal est diminué. Nous avons montré que l'inactivation optogénétique des ChIs striataux diminue l'excitabilité des MSNs et agit en faveur d'un rétablissement de l'activité de la voie directe lorsque la déplétion en DA striatale est unilatérale et totale, ce qui a pour conséquence de réduire les déficits moteurs induits par la lésion. Le blocage pharmacologique des mAChRs du striatum dorsal améliore les déficits moteurs et suggère que l'ACh striatale agit sur les mAChRs striataux pour induire ces troubles. Cet effet antiparkinsonien serait dû à une action préférentielle sur les récepteurs M1 et M4 post-synaptiques exprimés sur les MSNs à l'origine de la voie directe (MSN-D1).

Alors que des études s'intéressent au rôle potentiel des autorécepteurs M4 comme cible thérapeutique (Zhang et al., 2002; Ding et al., 2006; Bonsi et al., 2008), l'originalité de nos travaux a été de mettre en évidence le rôle tout aussi important des récepteurs M4 post-synaptiques pour le traitement des troubles moteurs de la MP. Il est admis qu'en pharmacologie est plus aisé de développer un antagoniste sélectif qu'un agoniste (Langmead et al., 2008). Le manque de sélectivité d'action des substances muscariniques utilisées en clinique peut expliquer les effets secondaires que l'on observe chez les patients parkinsoniens. Les résultats de nos études suggèrent qu'un blocage « sélectif » des récepteurs M4 pourrait être utilisé dans le cadre du développement d'un traitement des troubles moteurs de la MP. De plus, l'antagonisme fonctionnel entre ACh et DA mis en évidence dans le striatum suggère qu'un traitement basé sur la co-administration d'antagonistes M4 et d'agonistes dopaminergiques pourrait constituer une nouvelle stratégie dans le cadre d'un traitement des troubles moteurs de la pathologie.

Cependant, l'utilisation d'antagonistes mAChRs sélectifs pour le traitement des troubles non-moteurs apparaît beaucoup moins évidente que pour les troubles moteurs. La transmission cholinergique corticale, qui est altérée dans la MP, affecte les fonctions cognitives, et la distribution des mAChRs – expression prédominante des récepteurs M1 dans l'hippocampe et le cortex – rend

l'utilisation d'antagonistes sélectifs des récepteurs M1 complexe. En effet, s'il apparaît que le blocage des récepteurs M1 réduit le trouble anxieux, il semble que l'administration d'antagonistes sélectifs des récepteurs M1 soit délétère du point de vue des processus mnésiques. Interpréter les effets des substances pharmacologiques sur l'activité cholinergique qui sous-tend les processus de mémorisation est complexe car la libération de l'ACh dépend de multiples contrôles, et il a récemment été suggéré qu'un tonus cholinergique qu'il soit trop faible ou trop élevé, cause dans les deux cas, une altération des fonctions mnésiques (Newman and Gold, 2016)

Plus généralement, l'ACh module de nombreuses fonctions cérébrales, en agissant par deux mécanismes principaux; (1) soit directement en activant des récepteurs post-synaptiques et (2) soit indirectement via la modulation de sa propre libération par les terminaisons pré-synaptiques (feedback négatif). Les variations du tonus cholinergique striatal produisent en aval une série complexe d'effets sur les neurones de projection en sortie. Compte tenu de forte expression et de la distribution hétérogène des mAChRs et nAChRs dans l'ensemble du réseau striatal, le changement de fonction d'un seul récepteur ou de son expression dans une population neuronale entraîne un déséquilibre et un dysfonctionnement des différents systèmes au sein du striatum.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarsland D (2016) Cognitive impairment in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Parkinsonism Relat Disord* 22 Suppl 1:S144–S148.
- Aarsland D, Laake K, Larsen JP, Janvin C (2002) Donepezil for cognitive impairment in Parkinson's disease: a randomised controlled study. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 72:708–712.
- Acquas E, Di Chiara G (1999) Dopamine D(1) receptor-mediated control of striatal acetylcholine release by endogenous dopamine. *Eur J Pharmacol* 383:121–127.
- Acquas E, Di Chiara G (2002) Dopamine — Acetylcholine Interactions. In: *Dopamine in the CNS II*, pp 85–115 *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450:420–424.
- Agid Y (1991) Parkinson's disease: pathophysiology. *Lancet* 337:1321–1324.
- Agid Y, Ruberg M, Javoy-Agid F, Hirsch E, Raisman-Vozari R, Vyas S, Faucheux B, Michel P, Kastner A, Blanchard V (1993) Are dopaminergic neurons selectively vulnerable to Parkinson's disease? *Adv Neurol* 60:148–164.
- Aidi-Knani S, Regaya I, Amalric M, Mourre C (2015) Kv4 channel blockade reduces motor and neuropsychiatric symptoms in rodent models of Parkinson's disease. *Behav Pharmacol* 26:91–100.
- Aizman O, Brismar H, Uhlén P, Zettergren E, Levey AI, Forssberg H, Greengard P, Aperia A (2000) Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci* 3:226–230.
- Albani D, Peverelli E, Rametta R, Batelli S, Veschini L, Negro A, Forloni G (2004) Protective effect of TAT-delivered alpha-synuclein: relevance of the C-terminal domain and involvement of HSP70. *FASEB J* 18:1713–1715.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366–375.
- Alcantara AA, Mrzljak L, Jakab RL, Levey AI, Hersch SM, Goldman-Rakic PS (2001) Muscarinic m1 and m2 receptor proteins in local circuit and projection neurons of the primate striatum: anatomical evidence for cholinergic modulation of glutamatergic prefronto-striatal pathways. *J Comp Neurol* 434:445–460.
- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266–271.

- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res* 85:119–146.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9:357–381.
- Aliane V, Pérez S, Bohren Y, Deniau J-M, Kemel M-L (2011) Key role of striatal cholinergic interneurons in processes leading to arrest of motor stereotypies. *Brain* 134:110–118.
- Amalric M (2015) Targeting metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in Parkinson's disease. *Current Opinion in Pharmacology* 20:29–34.
- Amalric M, Koob GF (1987) Depletion of dopamine in the caudate nucleus but not in nucleus accumbens impairs reaction-time performance in rats. *J Neurosci* 7:2129–2134.
- Amalric M, Koob GF (1989) Dorsal pallidum as a functional motor output of the corpus striatum. *Brain Res* 483:389–394.
- Amalric M, Moukhles H, Nieoullon A, Daszuta A (1995) Complex deficits on reaction time performance following bilateral intrastriatal 6-OHDA infusion in the rat. *Eur J Neurosci* 7:972–980.
- Anden NE, Carlsson A, Dahlstroem A, Fuxe K, Hillarp NA, Larsson K (1964) Demonstration and Mapping out of Nigro-Neostriatal Dopamine Neurons. *Life Sci* 3:523–530.
- Aoki S, Liu AW, Zucca A, Zucca S, Wickens JR (2015) Role of Striatal Cholinergic Interneurons in Set-Shifting in the Rat. *J Neurosci* 35:9424–9431.
- Aosaki T, Graybiel AM, Kimura M (1994) Effect of the nigrostriatal dopamine system on acquired neural responses in the striatum of behaving monkeys. *Science* 265:412–415.
- Aosaki T, Kimura M, Graybiel AM (1995) Temporal and spatial characteristics of tonically active neurons of the primate's striatum. *J Neurophysiol* 73:1234–1252.
- Aosaki T, Kiuchi K, Kawaguchi Y (1998) Dopamine D1-like receptor activation excites rat striatal large aspiny neurons in vitro. *J Neurosci* 18:5180–5190.
- Aosaki T, Miura M, Suzuki T, Nishimura K, Masuda M (2010) Acetylcholine-dopamine balance hypothesis in the striatum: an update. *Geriatr Gerontol Int* 10 Suppl 1:S148–S157.
- Apicella P (2007) Leading tonically active neurons of the striatum from reward detection to context recognition. *Trends Neurosci* 30:299–306.
- Apicella P (2002) Tonically active neurons in the primate striatum and their role in the processing of information about motivationally relevant events. *Eur J Neurosci* 16:2017–2026.

- Apicella P, Legallet E, Trouche E (1997) Responses of tonically discharging neurons in the monkey striatum to primary rewards delivered during different behavioral states. *Exp Brain Res* 116:456–466.
- Apicella P, Ravel S, Sardo P, Legallet E (1998) Influence of predictive information on responses of tonically active neurons in the monkey striatum. *J Neurophysiol* 80:3341–3344.
- Aravanis AM, Wang L-P, Zhang F, Meltzer LA, Mogri MZ, Schneider MB, Deisseroth K (2007) An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *J Neural Eng* 4:S143–S156.
- Arenas E, Alberch J, Perez-Navarro E, Solsona C, Marsal J (1991) Neurokinin receptors differentially mediate endogenous acetylcholine release evoked by tachykinins in the neostriatum. *J Neurosci* 11:2332–2338.
- Arenkiel BR, Peca J, Davison IG, Feliciano C, Deisseroth K, Augustine GJ, Ehlers MD, Feng G (2007) In vivo light-induced activation of neural circuitry in transgenic mice expressing channelrhodopsin-2. *Neuron* 54:205–218.
- Assous M, Had-Aissouni L, Gubellini P, Melon C, Nafia I, Salin P, Kerkerian-Le Goff L, Kachidian P (2014) Progressive Parkinsonism by acute dysfunction of excitatory amino acid transporters in the rat substantia nigra. *Neurobiol Dis* 65:69–81.
- Aubert I, Araujo DM, Cécyre D, Robitaille Y, Gauthier S, Quirion R (1992) Comparative alterations of nicotinic and muscarinic binding sites in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Neurochem* 58:529–541.
- Aznavour N, Mechawar N, Watkins KC, Descarries L (2003) Fine structural features of the acetylcholine innervation in the developing neostriatum of rat. *J Comp Neurol* 460:280–291.
- Ballanger B, Klinger H, Eche J, Lerond J, Vallet A-E, Le Bars D, Tremblay L, Sgambato-Faure V, Broussolle E, Thobois S (2012) Role of serotonergic 1A receptor dysfunction in depression associated with Parkinson's disease. *Mov Disord* 27:84–89.
- Ballard CG, Aarsland D, McKeith I, O'Brien J, Gray A, Cormack F, Burn D, Cassidy T, Starfeldt R, Larsen JP, Brown R, Tovee M (2002) Fluctuations in attention: PD dementia vs DLB with parkinsonism. *Neurology* 59:1714–1720.
- Bara-Jimenez W, Bibbiani F, Morris MJ, Dimitrova T, Sherzai A, Mouradian MM, Chase TN (2005) Effects of serotonin 5-HT_{1A} agonist in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord* 20:932–936.
- Barbeau A (1962) The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. *Can Med Assoc J* 87:802–807.
- Bastide MF et al. (2015) Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 132:96–168.

Références bibliographiques

- Baudrexel S, Witte T, Seifried C, Wegner von F, Beissner F, Klein JC, Steinmetz H, Deichmann R, Roeper J, Hilker R (2011) Resting state fMRI reveals increased subthalamic nucleus-motor cortex connectivity in Parkinson's disease. *Neuroimage* 55:1728–1738.
- Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2:325–334.
- Beer Z, Chwiesko C, Sauvage MM (2014) Processing of spatial and non-spatial information reveals functional homogeneity along the dorso-ventral axis of CA3, but not CA1. *Neurobiol Learn Mem* 111:56–64.
- Benabid AL, Deuschl G, Lang AE, Lyons KE, Rezai AR (2006) Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Mov Disord* 21 Suppl 14:S168–S170.
- Benabid AL, Koudsié A, Benazzouz A, Fraix V, Ashraf A, Le Bas JF, Chabardes S, Pollak P (2000) Subthalamic stimulation for Parkinson's disease. *Arch Med Res* 31:282–289.
- Benazzouz A, Boraud T, Féger J, Burbaud P, Bioulac B, Gross C (1996) Alleviation of experimental hemiparkinsonism by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus in primates: a comparison with L-Dopa treatment. *Mov Disord* 11:627–632.
- Benazzouz A, Gross C, Féger 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.
- Bennett BD, Callaway JC, Wilson CJ (2000) Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 20:8493–8503.
- Berendse HW, Groenewegen HJ (1990) Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *J Comp Neurol* 299:187–228.
- Berger HJC, Cools AR, Horstink MWIM, Oyen WJG, Verhoeven EWM, van der Werf SP (2004) Striatal dopamine and learning strategy-an (123)I-FP-CIT SPECT study. *Neuropsychologia* 42:1071–1078.
- Bergman H, Raz A, Feingold A, Nini A, Nelken I, Hansel D, Ben-Pazi H, Reches A (1998) Physiology of MPTP tremor. *Mov Disord* 13 Suppl 3:29–34.
- 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.
- Bernard V, Normand E, Bloch B (1992) Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing muscarinic receptor genes. *J Neurosci* 12:3591–3600.

Références bibliographiques

- Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* 42:33–84.
- Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamalas M, Hervé D, Valjent E, Girault J-A (2008) Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci* 28:5671–5685.
- Bertran-Gonzalez J, Hervé D, Girault J-A, Valjent E (2010) What is the Degree of Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections? *Front Neuroanat* 4:1–9.
- Betz AJA, McLaughlin PJP, Burgos MM, Weber SMS, Salamone JDJ (2007) The muscarinic receptor antagonist tropicamide suppresses tremulous jaw movements in a rodent model of parkinsonian tremor: possible role of M4 receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 194:347–359.
- Bezard E, Przedborski S (2011) A tale on animal models of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26:993–1002.
- Bezard E, Yue Z, Kirik D, Spillantini MG (2013) Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov Disord* 28:61–70.
- Birkmayer W, Hornykiewicz O (1961) [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien Klin Wochenschr* 73:787–788.
- Bishop GA, Chang HT, Kitai ST (1982) Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 7:179–191.
- Björklund A, Dunnett SB (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194–202.
- Blanchet F, Gauchy C, Perez S, Soubrié P, Glowinski J, Kemel ML (1998a) Distinct modifications by neurokinin1 (SR140333) and neurokinin2 (SR48968) tachykinin receptor antagonists of the N-methyl-D-aspartate-evoked release of acetylcholine in striosomes and matrix of the rat striatum. *Neuroscience* 85:1025–1036.
- Blanchet PJ, Konitsiotis S, Chase TN (1998b) Amantadine reduces levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. *Mov Disord* 13:798–802.
- Blandini F, Armentero M-T (2012) Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J* 279:1156–1166.
- Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S (2012) Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol* 2012:845618.
- Bloem BR (1992) Postural instability in Parkinson's disease. *Clin Neurol Neurosurg* 94 Suppl:S41–S45.

Références bibliographiques

- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65:135–172.
- Bohnen NI, Albin RL (2011) The cholinergic system and Parkinson disease. *Behav Brain Res* 221:564–573.
- Bohnen NI, Müller MLTM, Kotagal V, Koeppe RA, Kilbourn MA, Albin RL, Frey KA (2010) Olfactory dysfunction, central cholinergic integrity and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Brain* 133:1747–1754.
- Bolam JP, Ingham CA, Izzo PN, Levey AI, Rye DB, Smith AD, Wainer BH (1986) Substance P-containing terminals in synaptic contact with cholinergic neurons in the neostriatum and basal forebrain: a double immunocytochemical study in the rat. *Brain Res* 397:279–289.
- Bolam JP, Smith Y (1990) The GABA and substance P input to dopaminergic neurones in the substantia nigra of the rat. *Brain Res* 529:57–78.
- Bolam JPJ, Wainer BHB, Smith ADA (1984) Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 12:711–718.
- Bonanno G, Marchi M, Raiteri M (1985) Activation of muscarinic receptors on striatal synaptosomes increases the release of endogenous dopamine. *Neuropharmacology* 24:261–264.
- Bonifati V, Fabrizio E, Cipriani R, Vanacore N, Meco G (1994) Buspirone in levodopa-induced dyskinesias. *Clin Neuropharmacol* 17:73–82.
- Bonito-Oliva A, Masini D, Fisone G (2014a) A mouse model of non-motor symptoms in Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. *Front Behav Neurosci* 8:290.
- Bonito-Oliva A, Pignatelli M, Spigolon G, Yoshitake T, Seiler S, Longo F, Piccinin S, Kehr J, Mercuri NB, Nisticò R, Fisone G (2014b) Cognitive impairment and dentate gyrus synaptic dysfunction in experimental parkinsonism. *Biol Psychiatry* 75:701–710.
- Bonsi P, Cuomo D, Ding J, Sciamanna G, Ulrich S, Tscherter A, Bernardi G, Surmeier DJ, Pisani A (2007) Endogenous serotonin excites striatal cholinergic interneurons via the activation of 5-HT_{2C}, 5-HT₆, and 5-HT₇ serotonin receptors: implications for extrapyramidal side effects of serotonin reuptake inhibitors. *Neuropsychopharmacology* 32:1840–1854.
- Bonsi P, Cuomo D, Martella G, Madeo G, Schirizzi T, Puglisi F, Ponterio G, Pisani A (2011) Centrality of striatal cholinergic transmission in Basal Ganglia function. *Front Neuroanat* 5:6.

Références bibliographiques

- Bonsi P, Martella G, Cuomo D, Platania P, Sciamanna G, Bernardi G, Wess J, Pisani A (2008) Loss of muscarinic autoreceptor function impairs long-term depression but not long-term potentiation in the striatum. *J Neurosci* 28:6258–6263.
- Bortolozzi A, Díaz-Mataix L, Scorza MC, Celada P, Artigas F (2005) The activation of 5-HT receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. *J Neurochem* 95:1597–1607.
- Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S (2005) Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2:484–494.
- Boyce S, Kelly E, Reavill C, Jenner P, Marsden CD (1984) Repeated administration of N-methyl-4-phenyl 1,2,5,6-tetrahydropyridine to rats is not toxic to striatal dopamine neurones. *Biochem Pharmacol* 33:1747–1752.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8:1263–1268.
- Braak H, Del Tredici K (2008) Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology* 70:1916–1925.
- Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rüb U (2002) Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol* 249 Suppl 3:III–1–5.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197–211.
- Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318:121–134.
- Bradfield LA, Bertran-Gonzalez J, Chieng B, Balleine BW (2013) The thalamostriatal pathway and cholinergic control of goal-directed action: interlacing new with existing learning in the striatum. *Neuron* 79:153–166.
- Branchi I, D'Andrea I, Armida M, Carnevale D, Ajmone-Cat MA, Pèzzola A, Potenza RL, Morgese MG, Cassano T, Minghetti L, Popoli P, Alleva E (2010) Striatal 6-OHDA lesion in mice: Investigating early neurochemical changes underlying Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 208:137–143.
- Branchi I, D'Andrea I, Armida M, Cassano T, Pèzzola A, Potenza RL, Morgese MG, Popoli P, 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.
- Brichta L, Greengard P, Flajolet M (2013) Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems. *Trends Neurosci* 36:543–554.

Références bibliographiques

- Briggs F, Usrey WM (2008) Emerging views of corticothalamic function. *Curr Opin Neurobiol* 18:403–407.
- Britt JP, Benaliouad F, McDevitt RA, Stuber GD, Wise RA, Bonci A (2012) Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron* 76:790–803.
- Britt JP, McGehee DS (2008) Presynaptic opioid and nicotinic receptor modulation of dopamine overflow in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 28:1672–1681.
- Brooks DJ, Pavese N (2011) Imaging biomarkers in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 95:614–628.
- Brochie JM, Lee J, Venderova K (2005) Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 112:359–391.
- Brown MTC, Tan KR, O'Connor EC, Nikonenko I, Muller D, Lüscher C (2012) Ventral tegmental area GABA projections pause accumbal cholinergic interneurons to enhance associative learning. *Nature* 492:452–456.
- Brown RG, Marsden CD (1990) Cognitive function in Parkinson's disease: from description to theory. *Trends Neurosci* 13:21–29.
- Brunenberg EJJ, Moeskops P, Backes WH, Pollo C, Cammoun L, Vilanova A, Janssen MLF, Visser-Vandewalle VERM, Haar Romeny ter BM, Thiran J-P, Platel B (2012) Structural and resting state functional connectivity of the subthalamic nucleus: identification of motor STN parts and the hyperdirect pathway. *PLoS One* 7:e39061.
- Buchen L (2010) Neuroscience: Illuminating the brain. *Nature* 465:26–28.
- Caballol N, Martí MJ, Tolosa E (2007) Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson disease. *Mov Disord* 22 Suppl 17:S358–S366.
- Cachope R, Mateo Y, Mathur BN, Irving J, Wang H-L, Morales M, Lovinger DM, Cheer JF (2012) Selective activation of cholinergic interneurons enhances accumbal phasic dopamine release: setting the tone for reward processing. *Cell Rep* 2:33–41.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G (1998a) Endogenous ACh enhances striatal NMDA-responses via M1-like muscarinic receptors and PKC activation. *Eur J Neurosci* 10:2887–2895.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G (1998b) Blockade of M2-like muscarinic receptors enhances long-term potentiation at corticostriatal synapses. *Eur J Neurosci* 10:3020–3023.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G (2000a) Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci* 23:120–126.

- Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Picconi B, Bernardi G, Chergui K, Svenningsson P, Fienberg AA, Greengard P (2000b) Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. *J Neurosci* 20:8443–8451.
- Calabresi P, Maj R, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G (1992) Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J Neurosci* 12:4224–4233.
- Calabresi P, Picconi B, Parnetti L, Di Filippo M (2006) A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance. *Lancet Neurol* 5:974–983.
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V (2016) Interaction between basal ganglia and limbic circuits in learning and memory processes. *Parkinsonism Relat Disord* 22 Suppl 1:S65–S68.
- Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M (2014) Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci* 17:1022–1030.
- Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G (1996) The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 19:19–24.
- Calabresi PP, Centonze DD, Gubellini PP, Bernardi GG (1999) Activation of M1-like muscarinic receptors is required for the induction of corticostriatal LTP. *Neuropharmacology* 38:323–326.
- Calabresi PP, Centonze DD, Pisani AA, Sancesario GG, North RAR, Bernardi GG (1998c) Muscarinic IPSPs in rat striatal cholinergic interneurons. *J Physiol* 510 (Pt 2):421–427.
- Calzavara R, Mailly P, Haber SN (2007) Relationship between the corticostriatal terminals from areas 9 and 46, and those from area 8A, dorsal and rostral premotor cortex and area 24c: an anatomical substrate for cognition to action. *Eur J Neurosci* 26:2005–2024.
- Carli M, Evenden JL, Robbins TW (1985) Depletion of unilateral striatal dopamine impairs initiation of contralateral actions and not sensory attention. *Nature* 313:679–682.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180:1200.
- Carlsson M, Carlsson A (1989) The NMDA antagonist MK-801 causes marked locomotor stimulation in monoamine-depleted mice. *J Neural Transm* 75:221–226.
- Carta M, Carlsson T, Kirik D, Björklund A (2007) Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain* 130:1819–1833.
- Centonze D, Gubellini P, Picconi B, Calabresi P, Giacomini P, Bernardi G (1999) Unilateral dopamine denervation blocks corticostriatal LTP. *J Neurophysiol* 82:3575–3579.

Références bibliographiques

- Chang HT, Kita H (1992) Interneurons in the rat striatum: relationships between parvalbumin neurons and cholinergic neurons. *Brain Res* 574:307–311.
- Chang Q, Gold PE (2003) Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *J Neurosci* 23:3001–3005.
- Chapman CA, Yeomans JS, Blaha CD, Blackburn JR (1997) Increased striatal dopamine efflux follows scopolamine administered systemically or to the tegmental pedunculopontine nucleus. *Neuroscience* 76:177–186.
- Chapman KL, Vaswani D, Hendry N, Langmead CJ, Kew JNC, Watson JM (2011) The muscarinic M(4) receptor is the functionally predominant subtype in rat and mouse striatum as demonstrated using [(35)S] GTPγS binding. *Eur J Pharmacol* 652:1–6.
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AHV, National Institute for Clinical Excellence (2006) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 5:235–245.
- Chaudhuri KR, Odin P (2010) The challenge of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 184:325–341.
- Chaudhuri KR, Odin P, Antonini A, Martinez-Martin P (2011) Parkinson's disease: the non-motor issues. *Parkinsonism Relat Disord* 17:717–723.
- Chaudhuri KR, Schapira AHV (2009) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol* 8:464–474.
- Chen JJ, Marsh L (2013) Depression in Parkinson's disease: identification and management. *Pharmacotherapy* 33:972–983.
- Chen L, Deltheil T, Turle-Lorenzo N, Liberge M, Rosier C, Watabe I, Sreng L, Amalric M, Mourre C (2014) SK channel blockade reverses cognitive and motor deficits induced by nigrostriatal dopamine lesions in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:1295–1306.
- Chen Y-W, Rada PV, Bützler BP, Leibowitz SF, Hoebel BG (2012) Corticotropin-releasing factor in the nucleus accumbens shell induces swim depression, anxiety, and anhedonia along with changes in local dopamine/acetylcholine balance. *Neuroscience* 206:155–166.
- Chesselet M-F, Fleming S, Mortazavi F, Meurers B (2008) Strengths and limitations of genetic mouse models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 14 Suppl 2:S84–S87.
- Chesselet M-F, Richter F (2011) Modelling of Parkinson's disease in mice. *Lancet Neurol* 10:1108–1118.
- Chow BY, Han X, Dobry AS, Qian X, Chuong AS, Li M, Henninger MA, Belfort GM, Lin Y, Monahan PE, Boyden ES (2010) High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps. *Nature* 463:98–102.

Références bibliographiques

- Christofi FL, Palmer JM, Wood JD (1991) Neuropharmacology of the muscarinic antagonist telenzepine in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. *Eur J Pharmacol* 195:333–339.
- Churchyard A, Lees AJ (1997) The relationship between dementia and direct involvement of the hippocampus and amygdala in Parkinson's disease. *Neurology* 49:1570–1576.
- Clarke CE (2004) Neuroprotection and pharmacotherapy for motor symptoms in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 3:466–474.
- Collins P, Wilkinson LS, Everitt BJ, Robbins TW, Roberts AC (2000) The effect of dopamine depletion from the caudate nucleus of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) on tests of prefrontal cognitive function. *Behav Neurosci* 114:3–17.
- Conner JM, Culberson A, Packowski C, Chiba AA, Tuszynski MH (2003) Lesions of the Basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning. *Neuron* 38:819–829.
- Consolo S, Girotti P, Zambelli M, Russi G, Benzi M, Bertorelli R (1993) D1 and D2 dopamine receptors and the regulation of striatal acetylcholine release in vivo. *Prog Brain Res* 98:201–207.
- Contant C, Umbriaco D, Garcia S, Watkins KC, Descarries L (1996) Ultrastructural characterization of the acetylcholine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience* 71:937–947.
- Conti G, Blandini F, Tassorelli C, Giubilei F, Fornai F, Zocchi A, Orzi F (2001) Intrastratial injection of D1 or D2 dopamine agonists affects glucose utilization in both the direct and indirect pathways of the rat basal ganglia. *Neurosci Lett* 309:161–164.
- Cools R (2006) Dopaminergic modulation of cognitive function-implications for L-DOPA treatment in Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 30:1–23.
- Cools R, Lewis SJG, Clark L, Barker RA, Robbins TW (2007) L-DOPA disrupts activity in the nucleus accumbens during reversal learning in Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology* 32:180–189.
- Cools R, Stefanova E, Barker RA, Robbins TW, Owen AM (2002) Dopaminergic modulation of high-level cognition in Parkinson's disease: the role of the prefrontal cortex revealed by PET. *Brain* 125:584–594.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) Modification of Parkinsonism: chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* 280:337–345.
- Courtière A, Hardouin J, Locatelli V, Turle-Lorenzo N, Amalric M, Vidal F, Hasbroucq T (2005) Selective effects of partial striatal 6-OHDA lesions on information processing in the rat. *Eur J Neurosci* 21:1973–1983.

Références bibliographiques

- Courtière AA, Hardouin JJ, Burle BB, Vidal FF, Turle-Lorenzo NN, Amalric MM, Hasbroucq TT (2011) Dynamics of executive control and motor deficits in parkinsonian rats. *J Neurosci* 31:11929–11933.
- Cragg SJ (2006) Meaningful silences: how dopamine listens to the ACh pause. *Trends Neurosci* 29:125–131.
- Crittenden JR, Graybiel AM (2011) Basal Ganglia disorders associated with imbalances in the striatal striosome and matrix compartments. *Front Neuroanat* 5:59.
- Crofts HS, Dalley JW, Collins P, Van Denderen JC, Everitt BJ, Robbins TW, Roberts AC (2001) Differential effects of 6-OHDA lesions of the frontal cortex and caudate nucleus on the ability to acquire an attentional set. *Cereb Cortex* 11:1015–1026.
- Cui G, Jun SB, Jin X, Pham MD, Vogel SS, Lovinger DM, Costa RM (2013) Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494:238–242.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999) The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 122 (Pt 8):1437–1448.
- Damsma G, Robertson GS, Tham CS, Fibiger HC (1991) Dopaminergic regulation of striatal acetylcholine release: importance of D1 and N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 259:1064–1072.
- Damsma G, Tham CS, Robertson GS, Fibiger HC (1990) Dopamine D1 receptor stimulation increases striatal acetylcholine release in the rat. *Eur J Pharmacol* 186:335–338.
- Dani JA (2001) Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 49:166–174.
- Darbaky Y, Forni C, Amalric M, Baunez C (2003) High frequency stimulation of the subthalamic nucleus has beneficial antiparkinsonian effects on motor functions in rats, but less efficiency in a choice reaction time task. *Eur J Neurosci* 18:951–956.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889–909.
- Dautan D, Huerta-Ocampo I, Witten IB, Deisseroth K, Bolam JP, Gerdjikov T, Mena-Segovia J (2014) A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the brainstem. *J Neurosci* 34:4509–4518.
- Dawson T, Mandir A, Lee M (2002) Animal models of PD: pieces of the same puzzle? *Neuron* 35:219–222.
- Dawson TM, Dawson VL (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302:819–822.

- Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham CA, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ (2006) Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci* 9:251–259.
- Day M, Wokosin D, Plotkin JL, Tian X, Surmeier DJ (2008) Differential excitability and modulation of striatal medium spiny neuron dendrites. *J Neurosci* 28:11603–11614.
- de Lau LML, Breteler MMB (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5:525–535.
- De Leonibus E, Pascucci T, Lopez S, Oliverio A, Amalric M, Mele A (2007) Spatial deficits in a mouse model of Parkinson disease. *Psychopharmacology (Berl)* 194:517–525.
- de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A (2000) Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology* 54:S21–S23.
- DeBoer P, Abercrombie ED (1996) Physiological release of striatal acetylcholine in vivo: modulation by D1 and D2 dopamine receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 277:775–783.
- DeBoer P, Heeringa MJ, Abercrombie ED (1996) Spontaneous release of acetylcholine in striatum is preferentially regulated by inhibitory dopamine D2 receptors. *Eur J Pharmacol* 317:257–262.
- Decressac M, Mattsson B, Björklund A (2012a) Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and α -synuclein rat models of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 235:306–315.
- Decressac M, Mattsson B, Lundblad M, Weikop P, Björklund A (2012b) Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of α -synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol Dis* 45:939–953.
- Deffains M, Bergman H (2015) Striatal cholinergic interneurons and cortico-striatal synaptic plasticity in health and disease. *Mov Disord* 30:1014–1025.
- Deisseroth K (2011) Optogenetics. *Nat Methods* 8:26–29.
- Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, Miesenböck G, Ting A, Schnitzer MJ (2006) Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci* 26:10380–10386.
- Del Tredici K, Braak H (2016) Review: Sporadic Parkinson's disease: development and distribution of α -synuclein pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 42:33–50.
- Delaville C, Deurwaerdère PD, Benazzouz A (2011) Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci* 5:31.

Références bibliographiques

- DeLong M, Wichmann T (2009) Update on models of basal ganglia function and dysfunction. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 3:S237–S240.
- DeLong MRM (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13:281–285.
- Delwaide PJ, Sabbatino M, Delwaide C (1986) Some pathophysiological aspects of the parkinsonian rigidity. *J Neural Transm Suppl* 22:129–139.
- Dencker D, Wortwein G, Weikop P, Jeon J, Thomsen M, Sager TN, Mork A, Woldbye DPD, Wess J, Fink-Jensen A (2011) Involvement of a Subpopulation of Neuronal M4 Muscarinic Acetylcholine Receptors in the Antipsychotic-like Effects of the M1/M4 Preferring Muscarinic Receptor Agonist Xanomeline. *J Neurosci* 31:5905–5908.
- Descarries L, Gisiger V, Steriade M (1997) Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol* 53:603–625.
- Descarries L, Mechawar N (2000) Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Prog Brain Res* 125:27–47.
- Deumens RR, Blokland AA, Prickaerts JJ (2002) Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 175:303–317.
- Di Chiara G, Imperato A (1988a) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5274–5278.
- Di Chiara G, Imperato A (1988b) Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 244:1067–1080.
- Di Chiara G, Morelli M, Consolo S (1994) Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends Neurosci* 17:228–233.
- 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.
- DiFiglia M, Pasik P, Pasik T (1976) A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res* 114:245–256.
- Dimova R, Vuillet J, Nieoullon A, Kerkerian-Le Goff L (1993) Ultrastructural features of the choline acetyltransferase-containing neurons and relationships with nigral dopaminergic and cortical afferent pathways in the rat striatum. *Neuroscience* 53:1059–1071.

- Ding JJ, Guzman JNJ, Tkatch TT, Chen SS, Goldberg JAJ, Ebert PJP, Levitt PP, Wilson CJC, Hamm HEH, Surmeier DJD (2006) RGS4-dependent attenuation of M4 autoreceptor function in striatal cholinergic interneurons following dopamine depletion. *Nat Neurosci* 9:832–842.
- Ding Y, Won L, Britt JP, Lim SAO, McGehee DS, Kang UJ (2011) Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:840–845.
- Donoghue JP, Herkenham M (1986) Neostriatal projections from individual cortical fields conform to histochemically distinct striatal compartments in the rat. *Brain Res* 365:397–403.
- Doty RL (2012) Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis* 46:527–552.
- Dourmap N, Clero E, Costentin J (1997) Involvement of cholinergic neurons in the release of dopamine elicited by stimulation of mu-opioid receptors in striatum. *Brain Res* 749:295–300.
- Drui G, Carnicella S, Carcenac C, Favier M, Bertrand A, Boulet S, Savasta M (2014) Loss of dopaminergic nigrostriatal neurons accounts for the motivational and affective deficits in Parkinson's disease. *Mol Psychiatry* 19:358–367.
- Dubois B, Danzé F, Pillon B, Cusimano G, Lhermitte F, Agid Y (1987) Cholinergic-dependent cognitive deficits in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 22:26–30.
- Dubois B, Pillon B (1997) Cognitive deficits in Parkinson's disease. *J Neurol* 244:2–8.
- Dujardin K, Laurent B (2003) Dysfunction of the human memory systems: role of the dopaminergic transmission. *Curr Opin Neurol* 16 Suppl 2:S11–S16.
- Dunnett SB, Lelos M (2010) Behavioral analysis of motor and non-motor symptoms in rodent models of Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 184:35–51.
- Duty SS, Jenner PP (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol* 164:1357–1391.
- Duvoisin RC (1967) Cholinergic-anticholinergic antagonism in parkinsonism. *Arch Neurol* 17:124–136.
- Ehringer H, 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.
- Engeln M, Ansquer S, Dugast E, Bezard E, Belin D, Fernagut P-O (2016) Multi-faceted impulsivity following nigral degeneration and dopamine replacement therapy. *Neuropharmacology* 109:69–77.

Références bibliographiques

- Engeln M, Fasano S, Ahmed SH, Cador M, Baekelandt V, Bezard E, Fernagut P-O (2013) Levodopa gains psychostimulant-like properties after nigral dopaminergic loss. *Ann Neurol* 74:140–144.
- Eskow Jaunarajs KL, Angoa-Perez M, Kuhn DM, Bishop C (2011) Potential mechanisms underlying anxiety and depression in Parkinson's disease: consequences of l-DOPA treatment. *Neurosci Biobehav Rev* 35:556–564.
- Eusebio A, Witjas T, Cohen J, Fluchère F, Jouve E, Régis J, Azulay J-P (2013) Subthalamic nucleus stimulation and compulsive use of dopaminergic medication in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 84:868–874.
- Exley R, Cragg SJ (2008) Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S283–S297.
- Faggiani E, Benazzouz A (2016) Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: From history to the interaction with the monoaminergic systems. *Prog Neurobiol*.
- Fahn S (1989) The history of parkinsonism. *Mov Disord* 4 Suppl 1:S2–S10.
- Faull RL, Carman JB (1968) Ascending projections of the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol* 132:73–92.
- Felten DL, Shetty AN (2010) *Netter's Atlas of Neuroscience*. Saunders.
- Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K (2011) The development and application of optogenetics. *Annu Rev Neurosci* 34:389–412.
- Fernagut P-O, Chesselet M-F (2004) Alpha-synuclein and transgenic mouse models. *Neurobiol Dis* 17:123–130.
- Ferreira JJ et al. (2013) Summary of the recommendations of the EFNS/MDS-ES review on therapeutic management of Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 20:5–15.
- Fieblinger T, Graves SM, Sebel LE, Alcacer C, Plotkin JL, Gertler TS, Chan CS, Heiman M, Greengard P, Cenci MA, Surmeier DJ (2014) Cell type-specific plasticity of striatal projection neurons in parkinsonism and L-DOPA-induced dyskinesia. *Nature Communications* 5:5316.
- Finkelstein DI, Stanic D, Parish CL, Tomas D, Dickson K, Horne MK (2000) Axonal sprouting following lesions of the rat substantia nigra. *Neuroscience* 97:99–112.
- Fino E, Glowinski J, Venance L (2007) Effects of acute dopamine depletion on the electrophysiological properties of striatal neurons. *Neurosci Res* 58:305–316.
- Fleming SM, Fernagut P-O, Chesselet M-F (2005) Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx* 2:495–503.

- Fornai F, Schlüter OM, Lenzi P, Gesi M, Ruffoli R, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti CL, Pontarelli F, Battaglia G, Pellegrini A, Nicoletti F, Ruggieri S, Paparelli A, Südhof TC (2005) Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3413–3418.
- Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW (1993) Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol* 60:600–608.
- François C, Grabli D, McCairn K, Jan C, Karachi C, Hirsch EC, Féger J, Tremblay L (2004) Behavioural disorders induced by external globus pallidus dysfunction in primates II. Anatomical study. *Brain* 127:2055–2070.
- François C, Yelnik J, Percheron G (1987) Golgi study of the primate substantia nigra. II. Spatial organization of dendritic arborizations in relation to the cytoarchitectonic boundaries and to the striatonigral bundle. *J Comp Neurol* 265:473–493.
- Freeze BS, Kravitz AV, Hammack N, Berke JD, Kreitzer AC (2013) Control of basal ganglia output by direct and indirect pathway projection neurons. *J Neurosci* 33:18531–18539.
- Frisina PG, Haroutunian V, Libow LS (2009) The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15:144–148.
- Galarraga E, Hernández-López S, Reyes A, Miranda I, Bermudez-Rattoni F, Vilchis C, Bargas J (1999) Cholinergic modulation of neostriatal output: a functional antagonism between different types of muscarinic receptors. *J Neurosci* 19:3629–3638.
- Gangarossa G, Espallergues J, de Kerchove d'Exaerde A, Mestikawy El S, Gerfen CR, Hervé D, Girault J-A, Valjent E (2013a) Distribution and compartmental organization of GABAergic medium-sized spiny neurons in the mouse nucleus accumbens. *Front Neural Circuits* 7:22.
- Gangarossa G, Espallergues J, Mailly P, De Bundel D, de Kerchove d'Exaerde A, Hervé D, Girault J-A, Valjent E, Krieger P (2013b) Spatial distribution of D1R- and D2R-expressing medium-sized spiny neurons differs along the rostro-caudal axis of the mouse dorsal striatum. *Front Neural Circuits* 7:124.
- 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.
- Gauchy C, Desban M, Krebs MO, Glowinski J, Kemel ML (1991) Role of dynorphin-containing neurons in the presynaptic inhibitory control of the acetylcholine-evoked release of dopamine in the striosomes and the matrix of the cat caudate nucleus. *Neuroscience* 41:449–458.
- Gauntlett-Gilbert J, Brown VJ (1998) Reaction time deficits and Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 22:865–881.

Références bibliographiques

- Gerber DJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Huang SY, Caron MG, Tonegawa S (2001) Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:15312–15317.
- Gerfen CR (1984) The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* 311:461–464.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429–1432.
- Gerfen CR, Surmeier DJ (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci* 34:441–466.
- Gertler TS, Chan CS, Surmeier DJ (2008) Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 28:10814–10824.
- Gesi M, Soldani P, Giorgi FS, Santinami A, Bonaccorsi I, Fornai F (2000) The role of the locus coeruleus in the development of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 24:655–668.
- Gesquière-Dando A, Guedj E, Loundou A, Carron R, Witjas T, Fluchère F, Delfini M, Mundler L, Régis J, Azulay J-P, Eusebio A (2015) A preoperative metabolic marker of parkinsonian apathy following subthalamic nucleus stimulation. *Mov Disord* 30:1767–1776.
- Gibb WR, Scott T, Lees AJ (1991) Neuronal inclusions of Parkinson's disease. *Mov Disord* 6:2–11.
- Giladi N, McMahon D, Przedborski S, Flaster E, Guillory S, Kostic V, Fahn S (1992) Motor blocks in Parkinson's disease. *Neurology* 42:333–339.
- Glajch KE, Fleming SM, Surmeier DJ, Osten P (2012) Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 230:309–316.
- Goetz CG, Damier P, Hicking C, Laska E, Müller T, Olanow CW, Rascol O, Russ H (2007) Sarizotan as a treatment for dyskinesias in Parkinson's disease: a double-blind placebo-controlled trial. *Mov Disord* 22:179–186.
- Goldberg JA, Ding JB, Surmeier DJ (2012) Muscarinic modulation of striatal function and circuitry. *Handb Exp Pharmacol*:223–241.
- Goldberg JA, Reynolds JNJ (2011) Spontaneous firing and evoked pauses in the tonically active cholinergic interneurons of the striatum. *Neuroscience* 198:27–43.
- Goldberg JA, Wilson CJ (2009) The Cholinergic Interneurons of the Striatum-Chapter 7:Intrinsic Properties Underlie Multiple Discharge Patterns. *Handbook of Behavioral Neuroscience* 20:133–149.

Références bibliographiques

- Gomez J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H, Wess J (1999a) Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1692–1697.
- Gomez J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Deng C, Wess J (1999b) Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10483–10488.
- Gotham AM, Brown RG, Marsden CD (1988) 'Frontal' cognitive function in patients with Parkinson's disease 'on' and 'off' levodopa. *Brain* 111 (Pt 2):299–321.
- Govindaiah G, Wang Y, Cox CL (2010) Substance P selectively modulates GABA(A) receptor-mediated synaptic transmission in striatal cholinergic interneurons. *Neuropharmacology* 58:413–422.
- Grabli D, McCairn K, Hirsch EC, Agid Y, Féger J, François C, Tremblay L (2004) Behavioural disorders induced by external globus pallidus dysfunction in primates: I. Behavioural study. *Brain* 127:2039–2054.
- Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, Mattis J, Prakash R, Diester I, Goshen I, Thompson KR, Deisseroth K (2010) Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell* 141:154–165.
- Gras C, Amilhon B, Lepicard EM, Poirel O, Vinatier J, Herbin M, Dumas S, Tzavara ET, Wade MR, Nomikos GG, Hanoun N, Saurini F, Kemel M-L, Gasnier B, Giros B, Mestikawy El S (2008) The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat Neurosci* 11:292–300.
- Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, Mestikawy El S (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 22:5442–5451.
- Graveland GA, DiFiglia M (1985) The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res* 327:307–311.
- Graybiel AM (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13:244–254.
- Graybiel AM, Ragsdale CW (1978) Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys, and cat demonstrated by acetylthiocholinesterase staining. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:5723–5726.
- Green J, McDonald WM, Vitek JL, Evatt M, Freeman A, Haber M, Bakay RAE, Triche S, Sirockman B, DeLong MR (2002) Cognitive impairments in advanced PD without dementia. *Neurology* 59:1320–1324.

Références bibliographiques

- Greenamyre JT, Eller RV, Zhang Z, Ovadia A, Kurlan R, Gash DM (1994) Antiparkinsonian effects of remacemide hydrochloride, a glutamate antagonist, in rodent and primate models of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 35:655–661.
- Greenamyre JT, O'Brien CF (1991) N-methyl-D-aspartate antagonists in the treatment of Parkinson's disease. *Arch Neurol* 48:977–981.
- Grofová I (1975) The identification of striatal and pallidal neurons projecting to substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res* 91:286–291.
- Grover S, Somaiya M, Kumar S, Avasthi A (2015) Psychiatric aspects of Parkinson's disease. *J Neurosci Rural Pract* 6:65–76.
- Gubellini P, Eusebio A, Oueslati A, Melon C, Kerkerian-Le Goff L, Salin P (2006) Chronic high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus and L-DOPA treatment in experimental parkinsonism: effects on motor behaviour and striatal glutamate transmission. *Eur J Neurosci* 24:1802–1814.
- Gubellini P, Kachidian P (2015) Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. *Rev Neurol (Paris)* 171:750–761.
- Gubellini P, Melon C, Dale E, Doller D, Kerkerian-Le Goff L (2014) Distinct effects of mGlu4 receptor positive allosteric modulators at corticostriatal vs. striatopallidal synapses may differentially contribute to their antiparkinsonian action. *Neuropharmacology* 85:166–177.
- Gubellini P, Salin P, Kerkerian-Le Goff L, Baunez C (2009) Deep brain stimulation in neurological diseases and experimental models: from molecule to complex behavior. *Prog Neurobiol* 89:79–123.
- Gut NK, Winn P (2016) The pedunculopontine tegmental nucleus-A functional hypothesis from the comparative literature. *Mov Disord* 31:615–624.
- Haber SN (2003) The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J Chem Neuroanat* 26:317–330.
- Haber SN (2016) Corticostriatal circuitry. *Dialogues Clin Neurosci* 18:7–21.
- Haber SN, Fudge JL, McFarland NR (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J Neurosci* 20:2369–2382.
- Halliday GM, Li YW, Blumbergs PC, Joh TH, Cotton RG, Howe PR, Blessing WW, Geffen LB (1990) Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 27:373–385.

Références bibliographiques

- Hassani OK, François C, Yelnik J, Féger J (1997) Evidence for a dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the rat. *Brain Res* 749:88–94.
- Hasselmo ME, Sarter M (2011) Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. *Neuropsychopharmacology* 36:52–73.
- Havekes R, Abel T, Van der Zee EA (2011) The cholinergic system and neostriatal memory functions. *Behav Brain Res* 221:412–423.
- Heeringa MJ, Abercrombie ED (1995) Biochemistry of somatodendritic dopamine release in substantia nigra: an in vivo comparison with striatal dopamine release. *J Neurochem* 65:192–200.
- Heimer L, Van Hoesen GW (2006) The limbic lobe and its output channels: implications for emotional functions and adaptive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 30:126–147.
- Henderson JM, Carpenter K, Cartwright H, Halliday GM (2000a) Degeneration of the centre median-parafascicular complex in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 47:345–352.
- Henderson JM, Carpenter K, Cartwright H, Halliday GM (2000b) Loss of thalamic intralaminar nuclei in progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease: clinical and therapeutic implications. *Brain* 123 (Pt 7):1410–1421.
- Hersch SM, Levey AI (1995) Diverse pre- and post-synaptic expression of m1-m4 muscarinic receptor proteins in neurons and afferents in the rat neostriatum. *Life Sci* 56:931–938.
- Herzog E, Gilchrist J, Gras C, Muzerelle A, Ravassard P, Giros B, Gaspar P, Mestikawy El S (2004) Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* 123:983–1002.
- Heuer A, Smith GA, Dunnett SB (2012a) Comparison of 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra and the medial forebrain bundle on a lateralised choice reaction time task in mice. *Eur J Neurosci*.
- Heuer AA, Smith GAG, Lelos MJM, Lane ELE, Dunnett SBS (2012b) Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. *Behav Brain Res* 228:30–43.
- Higley MJ, Soler-Llavina GJ, Sabatini BL (2009) Cholinergic modulation of multivesicular release regulates striatal synaptic potency and integration. *Nat Neurosci* 12:1121–1128.
- Hikida T, Kaneko S, Isobe T, Kitabatake Y, Watanabe D, Pastan I, Nakanishi S (2001) Increased sensitivity to cocaine by cholinergic cell ablation in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13351–13354.

Références bibliographiques

- Hillegaart V, Ahlenius S (1987) Effects of raclopride on exploratory locomotor activity, treadmill locomotion, conditioned avoidance behaviour and catalepsy in rats: behavioural profile comparisons between raclopride, haloperidol and preclamol. *Pharmacol Toxicol* 60:350–354.
- Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334:345–348.
- Hirsch EC, Graybiel AM, Duyckaerts C, Javoy-Agid F (1987) Neuronal loss in the pedunculopontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5976–5980.
- Hirsch EC, Graybiel AM, Hersh LB, Duyckaerts C, Agid Y (1989) Striosomes and extrastriosomal matrix contain different amounts of immunoreactive choline acetyltransferase in the human striatum. *Neurosci Lett* 96:145–150.
- Hirsch EC, Jenner P, Przedborski S (2013) Pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 28:24–30.
- Hornykiewicz O, Kish SJ (1987) Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 45:19–34.
- Höglinger GU, Féger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy P, Ruberg M, Oertel WH, Hirsch EC (2003) Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem* 84:491–502.
- Humphries MD, Prescott TJ (2010) The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy, and reward. *Prog Neurobiol* 90:385–417.
- Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G (2005) Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res* 162:1–10.
- Ince E, Ciliax BJ, Levey AI (1997) Differential expression of D1 and D2 dopamine and m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in identified striatonigral neurons. *Synapse* 27:357–366.
- Izzo PN, Bolam JP (1988) Cholinergic synaptic input to different parts of spiny striatonigral neurons in the rat. *J Comp Neurol* 269:219–234.
- Jabourian M, Bourgoin S, Perez S, Godeheu G, Glowinski J, Kemel ML (2004) Mu opioid control of the N-methyl-D-aspartate-evoked release of [3H]-acetylcholine in the limbic territory of the rat striatum in vitro: diurnal variations and implication of a dopamine link. *Neuroscience* 123:733–742.
- Jabourian M, Pérez S, Ezan P, Glowinski J, Deniau J-M, Kemel M-L (2007) Impact of 6-hydroxydopamine lesions and cocaine exposure on mu-opioid receptor expression and regulation of cholinergic transmission in the limbic-prefrontal territory of the rat dorsal striatum. *Eur J Neurosci* 25:1546–1556.

- Jabourian M, Venance L, Bourgoin S, Ozon S, Pérez S, Godeheu G, Glowinski J, Kemel M-L (2005) Functional mu opioid receptors are expressed in cholinergic interneurons of the rat dorsal striatum: territorial specificity and diurnal variation. *Eur J Neurosci* 21:3301–3309.
- Jahfari S, Waldorp L, van den Wildenberg WPM, Scholte HS, Ridderinkhof KR, Forstmann BU (2011) Effective connectivity reveals important roles for both the hyperdirect (fronto-subthalamic) and the indirect (fronto-striatal-pallidal) fronto-basal ganglia pathways during response inhibition. *J Neurosci* 31:6891–6899.
- Jankovic J, Aguilar LG (2008) Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. :1–16.
- Javoy-Agid F, Agid Y (1980) Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson disease? *Neurology* 30:1326–1330.
- Jellinger K (1988) The pedunculo-pontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 51:540–543.
- Jellinger KA (1991) Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* 14:153–197.
- Jellinger KA (2009) Formation and development of Lewy pathology: a critical update. *J Neurol* 256 Suppl 3:270–279.
- Jellinger KA (2010) Critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 67:550.
- Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE (1995) 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* 4:131–137.
- Jeon J, Dencker D, Wörtwein G, Woldbye DPD, Cui Y, Davis AA, Levey AI, Schütz G, Sager TN, Mørk A, Li C, Deng C-X, Fink-Jensen A, Wess J (2010) A subpopulation of neuronal M4 muscarinic acetylcholine receptors plays a critical role in modulating dopamine-dependent behaviors. *J Neurosci* 30:2396–2405.
- Jog MS, Kubota Y, Connolly CI, Hillegaart V, Graybiel AM (1999) Building neural representations of habits. *Science* 286:1745–1749.
- Jonkers N, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y (2000) MK801 influences L-DOPA-induced dopamine release in intact and hemi-parkinson rats. *Eur J Pharmacol* 407:281–291.
- Kalkonde YV, Shelton R, Villarreal M, Sigala J, Mishra PK, Ahuja SS, Barea-Rodriguez E, Moretti P, Ahuja SK (2011) The CC chemokine receptor 5 regulates olfactory and social recognition in mice. *Neuroscience* 197:153–161.

Références bibliographiques

- Kaneko S, Hikida T, Watanabe D, Ichinose H, Nagatsu T, Kreitman RJ, Pastan I, Nakanishi S (2000) Synaptic integration mediated by striatal cholinergic interneurons in basal ganglia function. *Science* 289:633–637.
- Karachi C, François C, Parain K, Bardinet E, Tandé D, Hirsch E, Yelnik J (2002) Three-dimensional cartography of functional territories in the human striatopallidal complex by using calbindin immunoreactivity. *J Comp Neurol* 450:122–134.
- Karachi C, Grabli D, Bernard FA, Tandé D, Wattiez N, Belaid H, Bardinet E, Prigent A, Nothacker H-P, Hunot S, Hartmann A, Lehericy S, Hirsch EC, François C (2010) Cholinergic mesencephalic neurons are involved in gait and postural disorders in Parkinson disease. *J Clin Invest* 120:2745–2754.
- Karasawa H, Taketo MM, Matsui M (2003) Loss of anti-cataleptic effect of scopolamine in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor subtype 4. *Eur J Pharmacol* 468:15–19.
- Katzenschlager R, Sampaio C, Costa J, Lees A (2003) Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003735.
- Kawaguchi Y (1993) Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci* 13:4908–4923.
- Kawaguchi Y, Aosaki T, Kubota Y (1997) Cholinergic and GABAergic interneurons in the striatum. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 17:87–90.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527–535.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC (1990) Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J Neurosci* 10:3421–3438.
- Kemel M-L, Pérez S, Godeheu G, Soubrié P, Glowinski J (2002) Facilitation by endogenous tachykinins of the NMDA-evoked release of acetylcholine after acute and chronic suppression of dopaminergic transmission in the matrix of the rat striatum. *J Neurosci* 22:1929–1936.
- Kemel ML, Desban M, Glowinski J, Gauchy C (1992a) Functional heterogeneity of the matrix compartment in the cat caudate nucleus as demonstrated by the cholinergic presynaptic regulation of dopamine release. *Neuroscience* 50:597–610.
- Kemel ML, Gauchy C, Desban M, Krebs MO, Glowinski J (1992b) Control of dopamine release by acetylcholine and dynorphin in the striosomal and matrix compartments of the cat caudate nucleus. *Neurochem Int* 20 Suppl:111S–114S.
- Kemp JM, Powell TP (1971) The synaptic organization of the caudate nucleus. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 262:403–412.

- Kim H-J, Park S-Y, Cho Y-J, Hong K-S, Cho J-Y, Seo S-Y, Lee D-H, Jeon BS (2009) Nonmotor symptoms in de novo Parkinson disease before and after dopaminergic treatment. *J Neurol Sci* 287:200–204.
- Kim SD, Allen NE, Canning CG, Fung VSC (2013) Postural instability in patients with Parkinson's disease. *Epidemiology, pathophysiology and management. CNS Drugs* 27:97–112.
- Kirik D, Rosenblad C, Björklund 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 SJ, Shannak K, Hornykiewicz O (1988) Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med* 318:876–880.
- Kish SJ, Tong J, Hornykiewicz O, Rajput A, Chang L-J, Guttman M, Furukawa Y (2008) Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain* 131:120–131.
- Kita H, Kosaka T, Heizmann CW (1990) Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res* 536:1–15.
- Kita T, Kita H, Kitai ST (1984) Passive electrical membrane properties of rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Res* 300:129–139.
- Kitabatake Y, Hikida T, Watanabe D, Pastan I, Nakanishi S (2003) Impairment of reward-related learning by cholinergic cell ablation in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7965–7970.
- Knie B, Mitra MT, Logishetty K, Chaudhuri KR (2011) Excessive daytime sleepiness in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs* 25:203–212.
- Konitsiotis S, Kafetzopoulos E, Anastasopoulos D, Blanchet PJ (1998) Opposite rotation induced by dopamine agonists in rats with unilateral lesions of the globus pallidus or substantia nigra. *Behav Brain Res* 92:77–83.
- Koós T, Tepper JM (1999) Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* 2:467–472.
- Koós T, Tepper JM (2002) Dual cholinergic control of fast-spiking interneurons in the neostriatum. *J Neurosci* 22:529–535.
- Krack P, Batir A, Van Blercom N, Chabardès 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.
- Krack P, Limousin P, Benabid AL, Pollak P (1997) Chronic stimulation of subthalamic nucleus improves levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Lancet* 350:1676.

- Kravitz AV, Bonci A (2013) Optogenetics, physiology, and emotions. *Front Behav Neurosci* 7:169.
- Kravitz AV, Freeze BS, Parker PRL, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kreitzer AC (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466:622–626.
- Kravitz AV, Tye LD, Kreitzer AC (2012) Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat Neurosci* 15:816–818.
- Krebs MO, Gauchy C, Desban M, Glowinski J, Kemel ML (1994) Role of dynorphin and GABA in the inhibitory regulation of NMDA-induced dopamine release in striosome- and matrix-enriched areas of the rat striatum. *J Neurosci* 14:2435–2443.
- Kreiss DS, Mastropietro CW, Rawji SS, Walters JR (1997) The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 17:6807–6819.
- Kreitzer AC (2009) Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Neuroscience* 32:127–147.
- Kreitzer AC, Malenka RC (2007) Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature* 445:643–647.
- Kreitzer AC, Malenka RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60:543–554.
- Kulkarni SK, Bishnoi M, Chopra K (2009) In vivo microdialysis studies of striatal level of neurotransmitters after haloperidol and chlorpromazine administration. *Indian J Exp Biol* 47:91–97.
- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339:1044–1053.
- Lang AE, Obeso JA (2004) Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. *Lancet Neurol* 3:309–316.
- Langmead CJ, Watson J, Reavill C (2008) Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther* 117:232–243.
- Laplanche F, Zhang Z-W, Huppé-Gourgues F, Dufresne MM, Vaucher E, Sullivan RM (2012) Cholinergic depletion in nucleus accumbens impairs mesocortical dopamine activation and cognitive function in rats. *Neuropharmacology* 63:1075–1084.
- Lapper SR, Bolam JP (1992) Input from the frontal cortex and the parafascicular nucleus to cholinergic interneurons in the dorsal striatum of the rat. *Neuroscience* 51:533–545.
- Lavoie B, Smith Y, Parent A (1989) Dopaminergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey as revealed by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 289:36–52.

Références bibliographiques

- Le DA, Lipton SA (2001) Potential and current use of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists in diseases of aging. *Drugs Aging* 18:717–724.
- Le W, Sayana P, Jankovic J (2014) Animal models of Parkinson's disease: a gateway to therapeutics? *Neurotherapeutics* 11:92–110.
- Leblois A, Boraud T, Meissner W, Bergman H, Hansel D (2006) Competition between feedback loops underlies normal and pathological dynamics in the basal ganglia. *J Neurosci* 26:3567–3583.
- Lees AJ, Smith E (1983) Cognitive deficits in the early stages of Parkinson's disease. *Brain* 106 (Pt 2):257–270.
- Lehmann J, Langer SZ (1982) Muscarinic receptors on dopamine terminals in the cat caudate nucleus: neuromodulation of [3H]dopamine release in vitro by endogenous acetylcholine. *Brain Res* 248:61–69.
- Lehmann J, Langer SZ (1983) The striatal cholinergic interneuron: synaptic target of dopaminergic terminals? *Neuroscience* 10:1105–1120.
- Lenz JD, Lobo MK (2013) Optogenetic insights into striatal function and behavior. *Behav Brain Res* 255:44–54.
- Lester DB, Rogers TD, Blaha CD (2010) Acetylcholine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther* 16:137–162.
- Levy R, Dubois B (2006) Apathy and the functional anatomy of the prefrontal cortex-basal ganglia circuits. *Cereb Cortex* 16:916–928.
- Lévesque M, Bédard A, Cossette M, Parent A (2003) Novel aspects of the chemical anatomy of the striatum and its efferents projections. *J Chem Neuroanat* 26:271–281.
- Lewis SJG, Slabosz A, Robbins TW, Barker RA, Owen AM (2005) Dopaminergic basis for deficits in working memory but not attentional set-shifting in Parkinson's disease. *Neuropsychologia* 43:823–832.
- Li J-L, Kaneko T, Mizuno N (2002) Synaptic association of dopaminergic axon terminals and neurokinin-1 receptor-expressing intrinsic neurons in the striatum of the rat. *Neurosci Lett* 324:9–12.
- Lister RG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92:180–185.
- Lim SAO, Kang UJ, McGehee DS (2014) Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Front Synaptic Neurosci* 6:22.

Références bibliographiques

- 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.
- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E, Perret JE, Benabid AL (1995) Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 345:91–95.
- Lindvall O, Björklund A (1979) Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway. *Brain Res* 172:169–173.
- Liu JH, Li XS, Ye J, Gao LH, Zhang ZP, Wu W, Yao L, Zhang J (2012) Cognitive impairments in Parkinson's disease. *Aging Ment Health* 16:529–536.
- Lobb C (2014) Abnormal Bursting as a Pathophysiological Mechanism in Parkinson's Disease. *Basal Ganglia* 3:187–195.
- Lobo MK, Covington HE, Chaudhury D, Friedman AK, Sun H, Damez-Werno D, Dietz DM, Zaman S, Koo JW, Kennedy PJ, Mouzon E, Mogri M, Neve RL, Deisseroth K, Han M-H, Nestler EJ (2010) Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science* 330:385–390.
- Lopez S, Jouve L, Turle-Lorenzo N, Kerkerian-Legoff L, Salin P, Amalric M (2012) Antiparkinsonian action of a selective group III mGlu receptor agonist is associated with reversal of subthalamonigral overactivity. *Neurobiol Dis* 46:69–77.
- Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G, Amar M (2003) Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflügers Arch* 446:17–29.
- Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA (2002) Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 15:120–132.
- Mahn M, Prigge M, Ron S, Levy R, Yizhar O (2016) Biophysical constraints of optogenetic inhibition at presynaptic terminals. *Nat Neurosci* 19:554–556.
- Majláth Z, Vécsei L (2014) NMDA antagonists as Parkinson's disease therapy: disseminating the evidence. *Neurodegener Dis Manag* 4:23–30.
- Mallet N, Ballion B, Le Moine C, Gonon F (2006) Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *J Neurosci* 26:3875–3884.
- Mann DM, Yates PO, Hawkes J (1983) The pathology of the human locus ceruleus. *Clin Neuropathol* 2:1–7.

Références bibliographiques

- Manning-Bog AB, McCormack AL, Purisai MG, Bolin LM, Di Monte DA (2003) Alpha-synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. *J Neurosci* 23:3095–3099.
- Marin C, Aguilar E, Mengod G, Cortés R, Obeso JA (2007) Concomitant short- and long-duration response to levodopa in the 6-OHDA-lesioned rat: a behavioural and molecular study. *Eur J Neurosci* 25:259–269.
- Marino MJ, Valenti O, Conn PJ (2003) Glutamate receptors and Parkinson's disease: opportunities for intervention. *Drugs Aging* 20:377–397.
- Marsden CD (1990) Parkinson's disease. *Lancet* 335:948–952.
- Martone ME, Armstrong DM, Young SJ, Groves PM (1992) Ultrastructural examination of enkephalin and substance P input to cholinergic neurons within the rat neostriatum. *Brain Res* 594:253–262.
- Matsuno-Yagi A, Mukohata Y (1977) Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem Biophys Res Commun* 78:237–243.
- Mattay VS, Tessitore A, Callicott JH, Bertolino A, Goldberg TE, Chase TN, Hyde TM, Weinberger DR (2002) Dopaminergic modulation of cortical function in patients with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 51:156–164.
- Mattis J, Tye KM, Ferenczi EA, Ramakrishnan C, O'Shea DJ, Prakash R, Gunaydin LA, Hyun M, Fenno LE, Gradinaru V, Yizhar O, Deisseroth K (2012) Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nat Methods* 9:159–172.
- Maurice N, Liberge M, Jaouen F, Ztaou S, Hanini M, Camon J, Deisseroth K, Amalric M, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C (2015) Striatal Cholinergic Interneurons Control Motor Behavior and Basal Ganglia Function in Experimental Parkinsonism. *Cell Rep* 13:657–666.
- Maurice N, Mercer J, Chan CS, Hernandez-Lopez S, Held J, Tkatch T, Surmeier DJ (2004) D2 dopamine receptor-mediated modulation of voltage-dependent Na⁺ channels reduces autonomous activity in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 24:10289–10301.
- Mayeux R, Stern Y, Sano M, Williams JB, Cote LJ (1988) The relationship of serotonin to depression in Parkinson's disease. *Mov Disord* 3:237–244.
- McGeorge AJ, Faull RL (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29:503–537.
- Meissner W, Harnack D, Reese R, Paul G, Reum T, Ansorge M, Kusserow H, Winter C, Morgenstern R, Kupsch A (2003) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus enhances striatal dopamine release and metabolism in rats. *J Neurochem* 85:601–609.

- Meissner WG (2012) When does Parkinson's disease begin? From prodromal disease to motor signs. *Rev Neurol (Paris)* 168:809–814.
- Meltzer HY, Chai BL, Thompson PA, Yamamoto BK (1994) Effect of scopolamine on the efflux of dopamine and its metabolites after clozapine, haloperidol or thioridazine. *J Pharmacol Exp Ther* 268:1452–1461.
- Mena-Segovia J, Bolam JP, Magill PJ (2004) Pedunculo pontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends Neurosci* 27:585–588.
- Meredith GE, Totterdell S, Petroske E, Santa Cruz K, Callison RC, Lau Y-S (2002) Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res* 956:156–165.
- Mestikawy El S, Wallén-Mackenzie A, Fortin GM, Descarries L, Trudeau L-É (2011) From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci* 12:204–216.
- Mesulam MM, Mash D, Hersch L, Bothwell M, Geula C (1992) Cholinergic innervation of the human striatum, globus pallidus, subthalamic nucleus, substantia nigra, and red nucleus. *J Comp Neurol* 323:252–268.
- Michel PP, Hirsch EC, Hunot S (2016) Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron* 90:675–691.
- Mink JW (1996) The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol* 50:381–425.
- Mink JW (2003) The Basal Ganglia and involuntary movements: impaired inhibition of competing motor patterns. *Arch Neurol* 60:1365–1368.
- Mitchelson FJ (2012) The pharmacology of McN-A-343. *Pharmacol Ther* 135:216–245.
- Molinuevo JL, Valldeoriola F, Tolosa E, Rumia J, Valls-Sole J, Roldan H, Ferrer E (2000) Levodopa withdrawal after bilateral subthalamic nucleus stimulation in advanced Parkinson disease. *Arch Neurol* 57:983–988.
- Moratalla R, Quinn B, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Graybiel AM (1992) Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3859–3863.
- Moro E, Scerrati M, Romito LM, Roselli R, Tonali P, Albanese A (1999) Chronic subthalamic nucleus stimulation reduces medication requirements in Parkinson's disease. *Neurology* 53:85–90.
- Morris G, Arkadir D, Nevet A, Vaadia E, Bergman H (2004) Coincident but distinct messages of midbrain dopamine and striatal tonically active neurons. *Neuron* 43:133–143.

- Muzerengi S, Contrafatto D, Chaudhuri KR (2007) Non-motor symptoms: identification and management. *Parkinsonism Relat Disord* 13 Suppl 3:S450–S456.
- Müller MLTM, Bohnen NI (2013) Cholinergic dysfunction in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13:377.
- Nafia I, Re DB, Masmejean F, Melon C, Kachidian P, Kerkerian-Le Goff L, Nieoullon A, Had-Aissouni L (2008) Preferential vulnerability of mesencephalic dopamine neurons to glutamate transporter dysfunction. *J Neurochem* 105:484–496.
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296:2395–2398.
- Nambu A (2005) A new approach to understand the pathophysiology of Parkinson's disease. *J Neurol* 252 Suppl 4:IV1–IV4.
- Nambu A, Tokuno H, Hamada I, Kita H, Imanishi M, Akazawa T, Ikeuchi Y, Hasegawa N (2000) Excitatory cortical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. *J Neurophysiol* 84:289–300.
- Nambu A, Tokuno H, Takada M (2002) Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal “hyperdirect” pathway. *Neurosci Res* 43:111–117.
- Navailles S, Bioulac B, Gross C, De Deurwaerdère P (2010) Serotonergic neurons mediate ectopic release of dopamine induced by L-DOPA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 38:136–143.
- Nègre-Pagès L, Grandjean H, Lapeyre-Mestre M, Montastruc JL, Fourrier A, Lépine JP, Rascol O, DoPaMiP Study Group (2010) Anxious and depressive symptoms in Parkinson's disease: the French cross-sectional DoPaMiP study. *Mov Disord* 25:157–166.
- Newman LA, Gold PE (2016) Attenuation in rats of impairments of memory by scopolamine, a muscarinic receptor antagonist, by mecamylamine, a nicotinic receptor antagonist. *Psychopharmacology (Berl)* 233:925–932.
- Neychev VK, Fan X, Mitev VI, Hess EJ, Jinnah HA (2008) The basal ganglia and cerebellum interact in the expression of dystonic movement. *Brain* 131:2499–2509.
- Nicholson SL, Brotchie JM (2002) 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) and Parkinson's disease - opportunities for novel therapeutics to reduce the problems of levodopa therapy. *Eur J Neurol* 9 Suppl 3:1–6.
- Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185–215.

- Oades RD, Halliday GM (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434:117–165.
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M (2008) Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* 23 Suppl 3:S548–S559.
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW (2000) Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23:S8–S19.
- Oesterhelt D, Stoeckenius W (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature New Biol* 233:149–152.
- Okada K, Nishizawa K, Fukabori R, Kai N, Shiota A, Ueda M, Tsutsui Y, Sakata S, Matsushita N, Kobayashi K (2014) Enhanced flexibility of place discrimination learning by targeting striatal cholinergic interneurons. *Nature Communications* 5:1–13.
- Olanow CW, Damier P, Goetz CG, Mueller T, Nutt J, Rascol O, Serbanescu A, Deckers F, Russ H (2004) Multicenter, open-label, trial of sarizotan in Parkinson disease patients with levodopa-induced dyskinesias (the SPLENDID Study). *Clin Neuropharmacol* 27:58–62.
- Olanow CW, Lees A, Obeso J (2008) Levodopa therapy for Parkinson's disease: challenges and future prospects. *Mov Disord* 23 Suppl 3:S495–S496.
- Olanow CW, Obeso JA, Stocchi F (2006) Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson's disease: scientific rationale and clinical implications. *Lancet Neurol* 5:677–687.
- Oldenburg IAI, Ding JBJ (2011) Cholinergic modulation of synaptic integration and dendritic excitability in the striatum. *Curr Opin Neurobiol* 21:425–432.
- Onali P, Olanas MC (2002) Muscarinic M4 receptor inhibition of dopamine D1-like receptor signalling in rat nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 448:105–111.
- Ossowska K, Konieczny J, Wardas J, Pietraszek M, Kuter K, Wolfarth S, Pilc A (2007) An influence of ligands of metabotropic glutamate receptor subtypes on parkinsonian-like symptoms and the striatopallidal pathway in rats. *Amino Acids* 32:179–188.
- Oueslati A, Sgambato-Faure V, Melon C, Kachidian P, Gubellini P, Amri M, Kerkerian-Le Goff L, Salin P (2007) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus potentiates L-DOPA-induced neurochemical changes in the striatum in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 27:2377–2386.
- Owen AM, Iddon JL, Hodges JR, Summers BA, Robbins TW (1997) Spatial and non-spatial working memory at different stages of Parkinson's disease. *Neuropsychologia* 35:519–532.

Références bibliographiques

- Owen AM, Roberts AC, Hodges JR, Summers BA, Polkey CE, Robbins TW (1993) Contrasting mechanisms of impaired attentional set-shifting in patients with frontal lobe damage or Parkinson's disease. *Brain* 116 (Pt 5):1159–1175.
- Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65:65–72.
- Pagonabarraga J, Kulisevsky J, Strafella AP, Krack P (2015) Apathy in Parkinson's disease: clinical features, neural substrates, diagnosis, and treatment. *Lancet Neurol* 14:518–531.
- Pahapill PA, Lozano AM (2000) The pedunculo-pontine nucleus and Parkinson's disease. *Brain* 123 (Pt 9):1767–1783.
- Pancani T, Bolarinwa C, Smith Y, Lindsley CW, Conn PJ, Xiang Z (2014) M4 mAChR-Mediated Modulation of Glutamatergic Transmission at Corticostriatal Synapses. *ACS Chem Neurosci*.
- Parent A, Hazrati LN (1995a) Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 20:91–127.
- Parent A, Hazrati LN (1995b) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20:128–154.
- Parker PRL, Lalive AL, Kreitzer AC (2016) Pathway-Specific Remodeling of Thalamostriatal Synapses in Parkinsonian Mice. *Neuron* 89:734–740.
- Parker WD, Parks JK, Swerdlow RH (2008) Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res* 1189:215–218.
- Pastrana E (2010) Optogenetics: controlling cell function with light. *Nat Methods* 8:24–25.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition. San Diego: Academic Press.
- Percheron G, Filion M (1991) Parallel processing in the basal ganglia: up to a point. *Trends Neurosci* 14:55–59.
- Percheron G, Yelnik J, François C (1984) A Golgi analysis of the primate globus pallidus. III. Spatial organization of the striato-pallidal complex. *J Comp Neurol* 227:214–227.
- Perez-Lloret S, Barrantes FJ (2016) Deficits in cholinergic neurotransmission and their clinical correlates in Parkinson's disease. *Npj Parkinson's Disease* 2:16001.
- Pérez S, Tierney A, Deniau J-M, Kemel M-L (2007) Tachykinin regulation of cholinergic transmission in the limbic/prefrontal territory of the rat dorsal striatum: implication of new neurokinine 1-sensitive receptor binding site and interaction with enkephalin/mu opioid receptor transmission. *J Neurochem* 103:2153–2163.

Références bibliographiques

- Phelps PE, Brady DR, Vaughn JE (1989) The generation and differentiation of cholinergic neurons in rat caudate-putamen. *Brain Res Dev Brain Res* 46:47–60.
- Phelps PE, Houser CR, Vaughn JE (1985) Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. *J Comp Neurol* 238:286–307.
- Pickel VM, Douglas J, Chan J, Gamp PD, Bunnett NW (2000) Neurokinin 1 receptor distribution in cholinergic neurons and targets of substance P terminals in the rat nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 423:500–511.
- Pillon B, Ertle S, Deweer B, Bonnet AM, Vidailhet M, Dubois B (1997) Memory for spatial location in “de novo” parkinsonian patients. *Neuropsychologia* 35:221–228.
- Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Calabresi P, Bernardi G (2000) Activation of D2-like dopamine receptors reduces synaptic inputs to striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 20:RC69–RC69.
- Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P (2003a) Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: focus on metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 45:45–56.
- Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Martorana A, Fusco F, Sancesario G, De Persis C, Bernardi G, Calabresi P (2003b) Activation of beta1-adrenoceptors excites striatal cholinergic interneurons through a cAMP-dependent, protein kinase-independent pathway. *J Neurosci* 23:5272–5282.
- Pisani AA, Bernardi GG, Ding JJ, Surmeier DJD (2007) Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. *Trends Neurosci* 30:545–553
- Pollak P, Benabid AL, Gross C, Gao DM, Laurent A, Benazzouz A, Hoffmann D, Gentil M, Perret J (1993) Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease. *Rev Neurol (Paris)* 149:175–176.
- Porras G, Li Q, Bezard E (2012) Modeling Parkinson's disease in primates: The MPTP model. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a009308.
- Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM (1995) Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 67:631–647.
- Quik M, Wonnacott S (2011) $\alpha 6\beta 2^*$ and $\alpha 4\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors as drug targets for Parkinson's disease. *Pharmacol Rev* 63:938–966.
- Quik MM, Bordia TT, O'Leary KK (2007) Nicotinic receptors as CNS targets for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 74:1224–1234.

Références bibliographiques

- Rabey JM, Nissipeanu P, Korczyn AD (1992) Efficacy of memantine, an NMDA receptor antagonist, in the treatment of Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 4:277–282.
- Ragozzino ME (2003) Acetylcholine actions in the dorsomedial striatum support the flexible shifting of response patterns. *Neurobiol Learn Mem* 80:257–267.
- Ragozzino ME, Artis S, Singh A, Twose TM, Beck JE, Messer WS (2012) The selective M1 muscarinic cholinergic agonist CDD-0102A enhances working memory and cognitive flexibility. *J Pharmacol Exp Ther* 340:588–594.
- Ragozzino ME, Jih J, Tzavos A (2002) Involvement of the dorsomedial striatum in behavioral flexibility: role of muscarinic cholinergic receptors. *Brain Res* 953:205–214.
- Ragozzino ME, Mohler EG, Prior M, Palencia CA, Rozman S (2009) Acetylcholine activity in selective striatal regions supports behavioral flexibility. *Neurobiol Learn Mem* 91:13–22.
- Raimondo JV, Kay L, Ellender TJ, Akerman CJ (2012) Optogenetic silencing strategies differ in their effects on inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 15:1102–1104.
- Ransmayr G (2015) Cognitive impairment in Parkinson's disease. *Psychiatr Danub* 27:458–461.
- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *N Engl J Med* 342:1484–1491.
- Rascol O, Lozano A, Stern M, Poewe W (2011) Milestones in Parkinson's disease therapeutics. *Mov Disord* 26:1072–1082.
- Rascol O, Perez-Lloret S, Ferreira JJ (2015) New treatments for levodopa-induced motor complications. *Mov Disord* 30:1451–1460.
- Rawls SM, McGinty JF (1998) Muscarinic receptors regulate extracellular glutamate levels in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *J Pharmacol Exp Ther* 286:91–98.
- Remy P, Doder M, Lees A, Turjanski N, Brooks D (2005) Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain* 128:1314–1322.
- Reynolds JNJ, Wickens JR (2004) The corticostriatal input to giant aspiny interneurons in the rat: a candidate pathway for synchronising the response to reward-related cues. *Brain Res* 1011:115–128.
- Rezak M (2007) Current Pharmacotherapeutic Treatment Options in Parkinson's Disease. *Disease-a-Month* 53:214–222.

Références bibliographiques

- Rice ME, Patel JC, Cragg SJ (2011) Dopamine release in the basal ganglia. *Neuroscience* 198:112–137.
- Rivlin-Etzion M, Marmor O, Heimer G, Raz A, Nini A, Bergman H (2006) Basal ganglia oscillations and pathophysiology of movement disorders. *Curr Opin Neurobiol* 16:629–637.
- Rochet J-C, Hay BA, Guo M (2012) Molecular insights into Parkinson's disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 107:125–188.
- Rodríguez-Puertas R, Pazos A, Pascual J (1994) Cholinergic markers in degenerative parkinsonism: autoradiographic demonstration of high-affinity choline uptake carrier hyperactivity. *Brain Res* 636:327–332.
- Roedter A, Winkler C, Samii M, Walter GF, Brandis A, Nikkhah G (2001) Comparison of unilateral and bilateral intrastratial 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways. *J Comp Neurol* 432:217–229.
- Romito LM, Raja M, Daniele A, Contarino MF, Bentivoglio AR, Barbier A, Scerrati M, Albanese A (2002) Transient mania with hypersexuality after surgery for high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Mov Disord* 17:1371–1374.
- Rommelfanger KS, Weinshenker D (2007) Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 74:177–190.
- Salamone JD, Correa M, Carlson BB, Wisniecki A, Mayorga AJ, Nisenbaum E, Nisenbaum L, Felder C (2001) Neostriatal muscarinic receptor subtypes involved in the generation of tremulous jaw movements in rodents implications for cholinergic involvement in parkinsonism. *Life Sci* 68:2579–2584.
- Salin P, López IP, Kachidian P, Barroso-Chinea P, Rico AJ, Gómez-Bautista V, Coulon P, Goff LK-L, Lanciego JL (2009) Neurobiology of Disease. *Neurobiol Dis* 34:545–552.
- Sanberg PR (1980) Haloperidol-induced catalepsy is mediated by postsynaptic dopamine receptors. *Nature* 284:472–473.
- Santiago MP, Potter LT (2001) Biotinylated m4-toxin demonstrates more M4 muscarinic receptor protein on direct than indirect striatal projection neurons. *Brain Res* 894:12–20.
- Sarter M, Parikh V (2005) Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci* 6:48–56.
- Sauer H, Oertel WH (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastratial terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59:401–415.

Références bibliographiques

- Sawamoto N, Piccini P, Hotton G, Pavese N, Thielemans K, Brooks DJ (2008) Cognitive deficits and striato-frontal dopamine release in Parkinson's disease. *Brain* 131:1294–1302.
- Scarr E (2013) Cholinergic connectivity: it's implications for psychiatric disorders. :1–26.
- Scatton B, Dennis T, L'Heureux R, Monfort JC, Duyckaerts C, Javoy-Agid F (1986) Degeneration of noradrenergic and serotonergic but not dopaminergic neurones in the lumbar spinal cord of parkinsonian patients. *Brain Res* 380:181–185.
- Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y (1983) Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res* 275:321–328.
- Schapira AH, Jenner P (2011) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26:1049–1055.
- Scherman D, Desnos C, Darchen F, Pollak P, Javoy-Agid F, Agid Y (1989) Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Ann Neurol* 26:551–557.
- Schiffer RB, Kurlan R, Rubin A, Boer S (1988) Evidence for atypical depression in Parkinson's disease. *Am J Psychiatry* 145:1020–1022.
- Scholtissen B, Verhey FRJ, Steinbusch HWM, Leentjens AFG (2006) Serotonergic mechanisms in Parkinson's disease: opposing results from preclinical and clinical data. *J Neural Transm (Vienna)* 113:59–73.
- Schrag A, Jahanshahi M, Quinn N (2000) What contributes to quality of life in patients with Parkinson's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 69:308–312.
- Schrempf W, Brandt MD, Storch A, Reichmann H (2014) Sleep disorders in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 4:211–221.
- Schröder KF, Hopf A, Lange H, Thörner G (1975) [Morphometrical-statistical structure analysis of human striatum, pallidum and subthalamic nucleus]. *J Hirnforsch* 16:333–350.
- Schwartz RK, Huston JP (1996) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 50:275–331.
- Sellal F, Hirsch E, Lisovsky F, Mutschler V, Collard M, Marescaux C (1992) Contralateral disappearance of parkinsonian signs after subthalamic hematoma. *Neurology* 42:255–256.
- Shapovalova KB (1999) Activation of the cholinergic system of the striatum improves attention to conditioned reflex stimuli. *Neurosci Behav Physiol* 29:493–503.

- Shen WW, Tian XX, Day MM, Ulrich SS, Tkatch TT, Nathanson NMN, Surmeier DJD (2007) Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat Neurosci* 10:1458–1466.
- Sidibé M, Smith Y (1999) Thalamic inputs to striatal interneurons in monkeys: synaptic organization and co-localization of calcium binding proteins. *Neuroscience* 89:1189–1208.
- Smeyne RJ, Jackson-Lewis V (2005) The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 134:57–66.
- Smith AD, Bolam JP (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* 13:259–265.
- Smith GA, Heuer A, Dunnett SB, Lane EL (2012a) Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice II: predicting l-DOPA-induced dyskinesia. *Behav Brain Res* 226:281–292.
- Smith Y, Galvan A, Ellender TJ, Doig N, Villalba RM, Huerta-Ocampo I, Wichmann T, Bolam JP (2014) The thalamostriatal system in normal and diseased states. *Front Syst Neurosci* 8:5.
- Smith Y, Raju DV, Pare J-F, Sidibe M (2004) The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends Neurosci* 27:520–527.
- Smith Y, Villalba R (2008) Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: an overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Mov Disord* 23 Suppl 3:S534–S547.
- Smith Y, Wichmann T, Factor SA, DeLong MR (2012b) Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology* 37:213–246.
- Smith YY, Bevan MDM, Shink EE, Bolam JPJ (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353–387.
- Smolders I, Bogaert L, Ebinger G, Michotte Y (1997) Muscarinic modulation of striatal dopamine, glutamate, and GABA release, as measured with in vivo microdialysis. *J Neurochem* 68:1942–1948.
- Somogyi P, Bolam JP, Smith AD (1981) Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscopic study using the Golgi-peroxidase transport-degeneration procedure. *J Comp Neurol* 195:567–584.
- Stam CJ, Visser SL, Op de Coul AA, De Sonnevile LM, Schellens RL, Brunia CH, de Smet JS, Gielen G (1993) Disturbed frontal regulation of attention in Parkinson's disease. *Brain* 116 (Pt 5):1139–1158.
- Stanley-Jones D (1956) The anatomy of rigidity and tremor. *J Nerv Ment Dis* 124:163–166.

Références bibliographiques

- Steinberg R, Souilhac J, Rodier D, Alonso R, Emonds-Alt X, Le Fur G, Soubrié P (1998) Facilitation of striatal acetylcholine release by dopamine D1 receptor stimulation: involvement of enhanced nitric oxide production via neurokinin-2 receptor activation. *Neuroscience* 84:511–518.
- Stoof JC, Drukarch B, de Boer P, Westerink BH, Groenewegen HJ (1992) Regulation of the activity of striatal cholinergic neurons by dopamine. *Neuroscience* 47:755–770.
- Stott SRW, Barker RA (2014) Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 39:1042–1056.
- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30:228–235.
- Surmeier DJ, Graves SM, Shen W (2014) Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* 29:109–117.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996) Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16:6579–6591.
- Suzuki T, Miura M, Nishimura K, Aosaki T (2001) Dopamine-dependent synaptic plasticity in the striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 21:6492–6501.
- Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, Da Cunha C, Takahashi RN (2008) Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 156:830–840.
- Tai L-H, Lee AM, Benavidez N, Bonci A, Wilbrecht L (2012) Transient stimulation of distinct subpopulations of striatal neurons mimics changes in action value. *Nat Neurosci* 15:1281–1289.
- Tashiro Y, Sugimoto T, Hattori T, Uemura Y, Nagatsu I, Kikuchi H, Mizuno N (1989) Tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the striatum of the rat. *Neurosci Lett* 97:6–10.
- Tayebati SK, Di Tullio MA, Amenta F (2004) Age-related changes of muscarinic cholinergic receptor subtypes in the striatum of Fisher 344 rats. *Exp Gerontol* 39:217–223.
- Tepper JMJ, Bolam JPJ (2004) Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 14:685–692.
- Thobois S, Mertens P, Guenot M, Hermier M, Mollion H, Bouvard M, Chazot G, Broussolle E, Sindou M (2002) Subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease: clinical evaluation of 18 patients. *J Neurol* 249:529–534.
- Threlfell S, Cragg SJ (2011) Dopamine signaling in dorsal versus ventral striatum: the dynamic role of cholinergic interneurons. *Front Syst Neurosci* 5:11.

- Threlfell S, Lalic T, Platt NJ, Jennings KA, Deisseroth K, Cragg SJ (2012) Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron* 75:58–64.
- Tozzi A et al. (2016) Alpha-Synuclein Produces Early Behavioral Alterations via Striatal Cholinergic Synaptic Dysfunction by Interacting With GluN2D N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit. *Biol Psychiatry* 79:402–414.
- Tremblay L, Kemel ML, Desban M, Gauchy C, Glowinski J (1992) Distinct presynaptic control of dopamine release in striosomal- and matrix-enriched areas of the rat striatum by selective agonists of NK1, NK2, and NK3 tachykinin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11214–11218.
- Tritsch NX, Carter AG (2016) Parkinson's Disease: A Thalamostriatal Rebalancing Act? *Neuron* 89:675–677.
- Tröster AI (2008) Neuropsychological characteristics of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia: differentiation, early detection, and implications for 'mild cognitive impairment' and biomarkers. *Neuropsychol Rev* 18:103–119.
- Tubert C, Taravini IRE, Flores-Barrera E, Sánchez GM, Prost MA, Avale ME, Tseng KY, Relat L, Murer MG (2016) Decrease of a Current Mediated by Kv1.3 Channels Causes Striatal Cholinergic Interneuron Hyperexcitability in Experimental Parkinsonism. *Cell Rep* 16:2749–2762.
- Tye KM, Prakash R, Kim S-Y, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, Thompson KR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K (2011) Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature* 471:358–362.
- Tzavos A, Jih J, Ragozzino ME (2004) Differential effects of M1 muscarinic receptor blockade and nicotinic receptor blockade in the dorsomedial striatum on response reversal learning. *Behav Brain Res* 154:245–253.
- Uhl GR, Hedreen JC, Price DL (1985) Parkinson's disease: loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions. *Neurology* 35:1215–1218.
- Ungerstedt U (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5:107–110.
- Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24:485–493.
- van Vulpén EH, van der Kooy D (1998) Striatal cholinergic interneurons: birthdates predict compartmental localization. *Brain Res Dev Brain Res* 109:51–58.
- Ventura R, Cabib S, Alcaro A, Orsini C, Puglisi-Allegra S (2003) Norepinephrine in the prefrontal cortex is critical for amphetamine-induced reward and mesoaccumbens dopamine release. *J Neurosci* 23:1879–1885.

Références bibliographiques

- Verhagen Metman L, Del Dotto P, Blanchet PJ, van den Munckhof P, Chase TN (1998) Blockade of glutamatergic transmission as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Amino Acids* 14:75–82.
- Vijayakumar D, Jankovic J (2016) Drug-Induced Dyskinesia, Part 1: Treatment of Levodopa-Induced Dyskinesia. *Drugs*:1–19.
- Villalba RM, Wichmann T, Smith Y (2014) Neuronal loss in the caudal intralaminar thalamic nuclei in a primate model of Parkinson's disease. *Brain Struct Funct* 219:381–394.
- Vingerhoets FJG, Villemure J-G, Temperli P, Pollo C, Pralong E, Ghika J (2002) Subthalamic DBS replaces levodopa in Parkinson's disease: two-year follow-up. *Neurology* 58:396–401.
- Volkman J, Daniels C, Witt K (2010) Neuropsychiatric effects of subthalamic neurostimulation in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 6:487–498.
- Volpicelli LA, Levey AI (2004) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog Brain Res* 145:59–66.
- Voorn P, Vanderschuren LJMJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CMA (2004) Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci* 27:468–474.
- Vuillet J, Dimova R, Nieoullon A, Kerkerian-Le Goff L (1992) Ultrastructural relationships between choline acetyltransferase- and neuropeptide γ -containing neurons in the rat striatum. *Neuroscience* 46:351–360.
- Waelbroeck M, Tastenoy M, Camus J, Christophe J (1990) Binding of selective antagonists to four muscarinic receptors (M1 to M4) in rat forebrain. *Mol Pharmacol* 38:267–273.
- Wall PM, Flinn J, Messier C (2001) Infralimbic muscarinic M1 receptors modulate anxiety-like behaviour and spontaneous working memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 155:58–68.
- Walter BL, Vitek JL (2004) Surgical treatment for Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 3:719–728.
- Wang H, Peca J, Matsuzaki M, Matsuzaki K, Noguchi J, Qiu L, Wang D, Zhang F, Boyden E, Deisseroth K, Kasai H, Hall WC, Feng G, Augustine GJ (2007) High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8143–8148.
- Wang L, Shang S, Kang X, Teng S, Zhu F, Liu B, Wu Q, Li M, Liu W, Xu H, Zhou L, Jiao R, Dou H, Zuo P, Zhang X, Zheng L, Wang S, Wang C, Zhou Z (2014) Modulation of dopamine release in the striatum by physiologically relevant levels of nicotine. *Nature Communications* 5:3925.
- Weiner DM, Levey AI, Brann MR (1990) Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7050–7054.

- Wess J (1996) Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* 10:69–99.
- Wess J, Eglen RM, Gautam D (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 6:721–733.
- Westerink BH, de Boer P, Damsma G (1990) Dopamine-acetylcholine interaction in the striatum studied by microdialysis in the awake rat: some methodological aspects. *J Neurosci Methods* 34:117–124.
- Whitehead KJ, Rose S, Jenner P (2001) Involvement of intrinsic cholinergic and GABAergic innervation in the effect of NMDA on striatal dopamine efflux and metabolism as assessed by microdialysis studies in freely moving rats. *Eur J Neurosci* 14:851–860.
- Wichmann T, Bergman H, Starr PA, Subramanian T, Watts RL, DeLong MR (1999) Comparison of MPTP-induced changes in spontaneous neuronal discharge in the internal pallidal segment and in the substantia nigra pars reticulata in primates. *Exp Brain Res* 125:397–409.
- Wichmann T, DeLong MR (1996) Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 6:751–758.
- Wiegert JS, Oertner TG (2016) How (not) to silence long-range projections with light. *Nat Neurosci* 19:527–528.
- Wilson CJ (1994) Understanding the neostriatal microcircuitry: high-voltage electron microscopy. *Microsc Res Tech* 29:368–380.
- Wilson CJ, Chang HT, Kitai ST (1990) Firing patterns and synaptic potentials of identified giant aspiny interneurons in the rat neostriatum. *J Neurosci* 10:508–519.
- Wilson CJ, Goldberg JA (2006) Origin of the slow afterhyperpolarization and slow rhythmic bursting in striatal cholinergic interneurons. *J Neurophysiol* 95:196–204.
- Wilson CJ, Groves PM (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194:599–615.
- Wilson CJ, Groves PM (1981) Spontaneous firing patterns of identified spiny neurons in the rat neostriatum. *Brain Res* 220:67–80.
- Winkler J, Ehret R, Büttner T, Dillmann U, Fogel W, Sabolek M, Winkelmann J, Kassubek J (2011) Parkinson's disease risk score: moving to a premotor diagnosis. *J Neurol* 258:S311–S315.
- Witten IB, Lin S-C, Brodsky M, Prakash R, Diester I, Anikeeva P, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K (2010) Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science* 330:1677–1681.

- Won L, Ding Y, Singh P, Kang UJ (2014) Striatal cholinergic cell ablation attenuates L-DOPA induced dyskinesia in Parkinsonian mice. *J Neurosci* 34:3090–3094.
- Woolf NJ, Butcher LL (1981) Cholinergic neurons in the caudate-putamen complex proper are intrinsically organized: a combined Evans blue and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res Bull* 7:487–507.
- Woolf NJ, Butcher LL (1986) Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain. *Brain Res Bull* 16:603–637.
- Wu Y, Richard S, Parent A (2000) The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neurosci Res* 38:49–62.
- Xiang Z, Thompson AD, Jones CK, Lindsley CW, Conn PJ (2012) Roles of the m1 muscarinic acetylcholine receptor subtype in the regulation of Basal Ganglia function and implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 340:595–603.
- Xu M, Mizobe F, Yamamoto T, Kato T (1989) Differential effects of M1- and M2-muscarinic drugs on striatal dopamine release and metabolism in freely moving rats. *Brain Res* 495:232–242.
- Yan Z, Flores-Hernandez J, Surmeier DJ (2001) Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 103:1017–1024.
- Yan Z, Song WJ, Surmeier J (1997) D2 dopamine receptors reduce N-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J Neurophysiol* 77:1003–1015.
- Yan Z, Surmeier DJ (1996) Muscarinic (m2/m4) receptors reduce N- and P-type Ca²⁺ currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a fast, membrane-delimited, G-protein pathway. *J Neurosci* 16:2592–2604.
- Yarnall A, Rochester L, Burn DJ (2011) The interplay of cholinergic function, attention, and falls in Parkinson's disease. *Mov Disord* 26:2496–2503.
- Yasuda RP, Ciesla W, Flores LR, Wall SJ, Li M, Satkus SA, Weisstein JS, Spagnola BV, Wolfe BB (1993) Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol* 43:149–157.
- Yelnik J (2002) Functional anatomy of the basal ganglia. *Mov Disord* 17 Suppl 3:S15–S21.
- Yelnik J, François C, Percheron G, Heyner S (1987) Golgi study of the primate substantia nigra. I. Quantitative morphology and typology of nigral neurons. *J Comp Neurol* 265:455–472.
- Yelnik J, Percheron G, François C (1984) A Golgi analysis of the primate globus pallidus. II. Quantitative morphology and orientation of dendritic arborizations. *J Comp Neurol* 227:200–213.

Références bibliographiques

- Yin HH, Mulcare SP, Hilário MRF, Clouse E, Holloway T, Davis MI, Hansson AC, Lovinger DM, Costa RM (2009) Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat Neurosci* 12:333–341.
- Yuan H, Sarre S, Ebinger G, 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 SA, Mortimer JA, Chui HC (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.
- Zemelman BV, Lee GA, Ng M, Miesenböck G (2002) Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron* 33:15–22.
- Zhang F, Aravanis AM, Adamantidis A, de Lecea L, Deisseroth K (2007) Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems. *Nat Rev Neurosci* 8:577–581.
- Zhang F, Gradinaru V, Adamantidis AR, Durand R, Airan RD, de Lecea L, Deisseroth K (2010) Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nat Protoc* 5:439–456.
- Zhang F, Wang L-P, Boyden ES, Deisseroth K (2006) Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nat Methods* 3:785–792.
- Zhang WW, Basile ASA, Gomeza JJ, Volpicelli LAL, Levey AIA, Wess JJ (2002) Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22:1709–1717.
- Zhou F-M, Wilson C, Dani JA (2003) Muscarinic and nicotinic cholinergic mechanisms in the mesostriatal dopamine systems. *Neuroscientist* 9:23–36.
- Zhou F-M, Wilson CJ, Dani JA (2002) Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J Neurobiol* 53:590–605.
- Zhou FM, Liang Y, Dani JA (2001) Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat Neurosci* 4:1224–1229.
- Ztaou S, Maurice N, Camon J, Guiraudie-Capraz G, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C, Liberge M, Amalric M (2016) Involvement of Striatal Cholinergic Interneurons and M1 and M4 Muscarinic Receptors in Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *J Neurosci* 36:9161–9172.

VALORISATION DE LA THÈSE

Valorisation de la thèse

Prix et récompenses

Prix du poster

Ztaou S, Liberge M., Amalric M. Optogenetic and pharmacological modulation of striatal cholinergic interneurons regulate motor, cognitive and emotional symptoms in Parkinson's disease. XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms (ISCM). October 2016, Marseille (France).

Ztaou S, Liberge M, Maurice N, Camon J, Jaouen F, Kerkerian-Le Goff L, Amalric M, Beurrier C. Role of striatal cholinergic interneurons in pathophysiological mechanisms of Basal Ganglia: Optogenetic and Pharmacological approaches. 15th biennial meeting of European Behavioural Pharmacology Society (EBPS). September 2013, La Rochelle (France).

Publications scientifiques

Ztaou S, Maurice N, Camon J, Guiraudie-Capraz G, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C, Liberge M, Amalric M (2016) Involvement of Striatal Cholinergic Interneurons and M1 and M4 Muscarinic Receptors in Motor Symptoms of Parkinson's Disease. *J Neurosci* 36:9161–9172.

Maurice N, Liberge M, Jaouen F, **Ztaou S**, Hanini M, Camon J, Deisseroth K, Amalric M, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C (2015) Striatal Cholinergic Interneurons Control Motor Behavior and Basal Ganglia Function in Experimental Parkinsonism. *Cell Rep* 13:657–666.

Ztaou S, Watabe I, Liberge M, Amalric M. Early cognitive and affective dysfunctions in a mouse model of Parkinson's disease are modulated by striatal cholinergic interneurons. *In preparation*.

Communications orales

Ztaou S, Liberge M., Amalric M. Optogenetic and pharmacological modulation of striatal cholinergic interneurons regulate motor, cognitive and emotional symptoms in Parkinson's disease. XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms (ISCM). October 2016, Marseille (France).

Ztaou S, Liberge M, Amalric M. Involvement of striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease using optogenetics and pharmacological tools. PhD Program in Integrative and Clinical Neurosciences. September 2014. Institut de Neurosciences de la Timone, Marseille (France).

Ztaou S, Liberge M, Amalric M. Implication of M1 and M4 muscarinic receptors in pathophysiological mechanisms of Parkinson's disease. PhD and Post-Doc Meeting. October 2013, Laboratory of Cognitive Neuroscience, Marseille (France).

Ztaou S, Liberge M, Maurice N, Camon J, Jaouen F, Kerkerian-Le Goff L, Amalric M, Beurrier C. Role of striatal cholinergic interneurons in pathophysiological mechanisms of Basal Ganglia: Optogenetic and Pharmacological approaches. 15th biennial meeting of European Behavioural Pharmacology Society (EBPS). September 2013, La Rochelle (France).

Ztaou S, Liberge M, Maurice N, Camon J, Jaouen F, Kerkerian-Le Goff L, Amalric M, Beurrier C. Rôle des interneurones cholinergiques striataux dans le fonctionnement physiopathologique des ganglions de la base: approches optogénétiques et pharmacologiques. Réunion conjointe Club des Ganglions de la Base (CGB)/Club des Mouvements Anormaux (CMA). Mai 2013, Lyon (France).

Communications affichées

Ztaou S, Liberge M., Amalric M. Optogenetic and pharmacological modulation of striatal cholinergic interneurons regulate motor, cognitive and emotional symptoms in Parkinson's disease. XVth International Symposium on Cholinergic Mechanisms (ISCM). October 2016, Marseille (France).

Amalric M, **Ztaou S**, Liberge M. Optogenetic and pharmacological modulation of striatal cholinergic interneurons modulate motor, cognitive and emotional symptoms in Parkinson's disease. 10th FENS Forum of Neuroscience. July 2016, Copenhagen (Denmark).

Ztaou S, Liberge M, Maurice N, Jaouen F, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C, Amalric, M. Motor and cognitive functions of striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: pharmacological and optogenetic approaches. 45th annual meeting of SfN. October 2015, Chicago (USA).

Ztaou S, Liberge M, Amalric M. Regulation of motor symptoms of Parkinson's disease by targeting selective striatal muscarinic cholinergic receptors: pharmacological and optogenetic approaches. 2nd EBBP-EBPS joint meeting. September 2015, Verona (Italy).

Amalric M, **Ztaou S**, Liberge M. Involvement of selective muscarinic cholinergic receptors in the striatum to regulate motor symptoms of Parkinson's disease. 12th Conference of French Society for Neuroscience. May 2015, Montpellier (France).

Beurrier C, Maurice N, Liberge M, Jaouen F, **Ztaou S**, Hanini M, Camon J, Deisseroth K, Amalric M, Kerkerian-Le Goff L. Striatal cholinergic interneurons control motor function and basal ganglia outflow in experimental parkinsonism. OptoDBS 2015 Meeting. May 2015, Geneva (Switzerland).

Amalric M, Liberge M, **Ztaou S**, Maurice N, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C. Striatal cholinergic interneurons and motor symptoms of Parkinson's disease. 44th annual meeting of SfN. November 2014, Washington (USA).

Maurice N, Liberge M, Jaouen F, **Ztaou S**, Hanini M, Camon J, Desseiroth K, Amalric M, Kerkerian-Le Goff L, Beurrier C. Optogenetic control of cholinergic interneurons: implication for Parkinson's disease. 9th FENS Forum of Neuroscience. July 2014, Milan (Italy).

Ztaou S, Liberge M, Maurice N., Camon J, Jaouen F, Kerkerian-Le Goff L, Amalric M. & Beurrier C. Role of striatal cholinergic interneurons in pathophysiological mechanisms of Basal Ganglia: Optogenetic and Pharmacological approaches. 22th annual meeting of the Doctoral School. June 2014, Marseille (France). 15th biennial meeting of EBPS. September 2013, La Rochelle (France).

Beurrier C, Liberge M, Maurice N, Jaouen F, Camon J, **Ztaou S**, Amalric M. & Kerkerian-Le Goff L. Optogenetic control of cholinergic: Implications for Parkinson's disease. 11th Conference of French Society for Neuroscience. May 2013, Lyon (France). 43rd annual meeting of SfN. November 2013, New Orleans (USA).

