



HAL
open science

Impact de l'intoxication au Paraquat/Maneb et des déplétions sélectives des monoamines sur les systèmes moteur et circadien : Etude comportementale, biochimique et électrophysiologique dans le contexte de la maladie de Parkinson

Anass Tinakoua

► **To cite this version:**

Anass Tinakoua. Impact de l'intoxication au Paraquat/Maneb et des déplétions sélectives des monoamines sur les systèmes moteur et circadien : Etude comportementale, biochimique et électrophysiologique dans le contexte de la maladie de Parkinson. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux; Université Mohammed V (Rabat). Faculté des sciences, 2015. Français. NNT : 2015BORD0447 . tel-01423241

HAL Id: tel-01423241

<https://theses.hal.science/tel-01423241>

Submitted on 29 Dec 2016

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

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

THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
Et DE
L'UNIVERSITÉ MOHAMMED V-RABAT

École Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé de Bordeaux
Centre d'Etudes Doctorales en Sciences et Technologies de Rabat

DISCIPLINE : **Biologie**

SPÉCIALITÉ : **Neurosciences**

Par Anass TINAKOUA

**Impact de l'intoxication au Paraquat/Maneb et des déplétions
sélectives des monoamines sur les systèmes moteur et circadien**

Etude comportementale, biochimique et électrophysiologique dans le contexte
de la maladie de Parkinson

Soutenue le 28 Décembre 2015

Devant les membres du jury :

AMZAZI Saaid
ERRAMI Mohammed
EL ALLALI Khalid
MEUNIER Martine
LAKHDAR-GHAZAL Nouria
BENAZZOUC Abdelhamid

Professeur, Faculté des Sciences, Rabat
Professeur, Faculté des Sciences, Tétouan
Professeur, Institut Agronomique et Vétérinaire, Rabat
Chargée de recherche INSERM, Bron
Professeur, Faculté des Sciences, Rabat
Directeur de Recherche INSERM, Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directrice de thèse
Directeur de thèse

A mes parents

Nadia

Miriam

Mes amis

Remerciements :

Cette thèse de Doctorat a été réalisée dans le cadre d'une convention de cotutelle entre l'université Mohammed V à Rabat et l'université de Bordeaux. Une partie des travaux menés au cours de cette thèse ont été réalisés au sein de l'Equipe Rythmes Biologiques, Neurosciences et Environnement à la faculté des sciences de Rabat. L'autre partie, a été réalisée au sein de l'équipe Monoamines, Stimulation Cérébrale Profonde et Maladie de Parkinson à l'Institut des maladies neurodégénératives de l'université de Bordeaux.

Je tiens à remercier sincèrement et chaleureusement mon directeur de thèse, Dr. **Abdelhamid BENAZZOUZ**. D'abord je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre équipe, pour votre confiance, de m'avoir guidé et encadré avec bienveillance et d'avoir su me donner goût à la recherche scientifique. Ensuite je vous remercie d'avoir su, à travers nos discussions scientifiques et extrascientifiques me donner cette confiance en moi, essentielle lorsqu'on veut accomplir une thèse.

A ma directrice de thèse, Pr. **Nouria LAKHDAR-GHAZAL**, je tiens à dire Mille mercis. Merci d'abord, d'avoir cru en mes capacités. Merci pour votre patience. Merci pour vos encouragements permanents. Pour exprimer toute ma gratitude et tout le plaisir que j'ai éprouvé en travaillant avec vous, il me faudra plusieurs pages. Il me faut autant pour dire tout ce que j'ai appris de vous sur les plans scientifique, professionnel et humain. Au-delà de la scientifique que vous êtes, j'ai apprécié tout ce que j'ai appris de l'intellectuelle que vous êtes aussi.

Je tiens à remercier Pr. **Saaid AMZAZI**, Professeur à la faculté des sciences de Rabat et président de l'université Mohammed V – Rabat, qui m'a fait l'honneur de juger mon travail et d'en présider le jury de soutenance. Lisez ici ma profonde reconnaissance et toute ma gratitude.

Je remercie également, Pr. **Mohammed ERRAMI**, Professeur à la faculté des sciences de Tétouan et Doyen, ainsi que Pr. **Khalid EL ALLALI**, Professeur à l'institut agronomique et vétérinaire Hassan II, pour avoir accepté cette lourde tâche d'être rapporteurs. Trouvez ici, l'expression de ma profonde reconnaissance et gratitude.

Je remercie également Dr. **Martine MEUNIER**, chargée de recherche au Centre de Recherche de Neurosciences de Lyon, pour avoir accepté de faire le long trajet et d'examiner mon travail. Lisez madame, l'expression de mes sentiments les plus respectueux.

Je tiens également à remercier tous les membres passés et présents de l'équipe de l'équipe Monoamines, Stimulation Cérébrale Profonde et Maladie de Parkinson : Merci d'abord pour Philippe pour tes réflexions et conseils. Merci Frédo pour tes bons conseils et tes qualités de pédagogue. Merci Emilie ! Ton aide était précieuse dans des moments clés de mon passage au labo. Merci Omar, Grace à toi je ne me suis jamais senti dépaysé ! Mounia, Merci pour ta sérénité contagieuse☺. Merci à tous les étudiants qui sont passés par là : Naoki, Youssra, Elia...

Je tiens également à remercier tous ceux que j'ai côtoyés dans la rotule: Aurélian, Brice, Camille, Stéphanie, Hugues, Tho Hai...

Mes remerciements vont également aux membres de l'Equipe Rythmes Biologiques, Neurosciences et Environnement de la faculté des sciences de Rabat : Merci Soumya Benomar. Merci à Safa pour m'avoir initié à l'actimétrie et surtout pour nos discussions interminables et l'ambiance. Merci à Abderahman. Merci Hourtane, notre bricoleur préféré. Merci Nezha pour le plaisir que ça fait de discuter avec toi. Merci également aux étudiants qui sont passés par là, avec qui j'ai énormément appris : Nada et Kerianne.

A Bordeaux j'étais très ravi de rencontrer la famille Benazzouz. Je tiens à remercier ici Rabia, pour son soutien moral infaillible. Merci Inès, pour l'amitié, nos discussions et pour tes conseils de médecin. Un grand Merci également pour Lina.

Ce travail a été financé par le Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (Maroc), par le SCAC Ambassade de France au Maroc, par le Groupement de Recherche International en Neurosciences France/Maroc (GDRI-Neuro) et la Société Internationale de Neurochimie (ISN).

This work has been supported by the National Center for Scientific and Technical Research (Morocco) and by the SCAC France embassy in Morocco, by the GDRI-Neurosciences France/Morocco and the International Society of Neurochemistry (ISN).

Liste des publications et communications :

Publications:

Tinakoua A, Bouabid S, Faggiani E, De Deurwaerdere P, Lakhdar-Ghazal N, Benazzouz A (2015) The impact of combined administration of Paraquat and Maneb on motor and non-motor functions in the rat. *Neuroscience*, 311:118-129. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.10.021.

Bouabid S, Tinakoua A, Lakhdar-Ghazal N and Benazzouz A. Manganese Neurotoxicity: behavioral disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission. *J. Neurochem.* 'Accepted Article', doi: 10.1111/jnc.13442

Tinakoua A, Lakhdar-Ghazal N, Benazzouz A. Effects of monoaminergic systems degeneration on the neuronal activity of suprachiasmatic nucleus. -In preparation-

Communications Orales :

Tinakoua A, Bouabid S, Lakhdar-Ghazal N, Benazzouz A (2015). The impact of combined administration of Paraquat and Maneb on motor and non-motor functions in the rat. 12th Conference of The Society of Neuroscientists of Africa (SONA). March 26-30, 2015, Durban – South Africa

Communications affichées:

Tinakoua A, Lakhdar-Ghazal N, Benazzouz A (2015) Effects of monoaminergic systems degeneration on the neuronal activity of suprachiasmatic nucleus. 12ème colloque de la société des neurosciences, 19-22 Mai à Montpellier – France

Tinakoua A, Lakhdar-Ghazal N, Benazzouz A (2015) Effects of monoaminergic systems degeneration on the neuronal activity of suprachiasmatic nucleus. IBRO-ARC-ISN School on Sleep and circadian rhythms, March 19-25, Drakensberg - South Africa.

Tinakoua A, Lakhdar-Ghazal N, Benazzouz A (2015). Effects of monoaminergic systems degeneration on the neuronal activity of suprachiasmatic nucleus. The European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Workshop on Neuropsychopharmacology for Junior Scientists in Europe, March 12-15 Nice - France

Tinakoua A, Bouabid S, Faggiani E, Naudet F, Lakhdar-Ghazal N, Benazzouz A (2013), Combined Paraquat and Maneb intoxication induced-motor and non-motor deficits, are not due

to monoaminergic depletions in the rat.13ème journée scientifique de l'école doctorale sciences de la vie et de la santé, 10 Avril, Arcachon - France

Tinakoua A, Faggiani E, Naudet F, Lakhdar-Ghazal N, Benazzouz A (2013), Combined Paraquat and Maneb intoxication induced-motor and non-motor deficits, are not due to monoaminergic depletions in the rat. 11th Conference of The Society of Neuroscientists of Africa (SONA), June 13-17, Rabat, morocco.

Title: The impact of paraquat/maneb intoxication and the selective depletion of monoamines on the motor and circadian systems: behavioral, biochemical and electrophysiological studies in the context of Parkinson's disease

Abstract: The present study aimed to investigate the effects of monoaminergic system lesions on the motor and non-motor functions, including anxiety, depression and circadian rhythms within the context of Parkinson's disease. First, we developed appropriate animal models using combined paraquat/maneb (PQ/MB) intoxication or using selective lesions of monoaminergic systems; second, we characterized the models using behavioral, biochemical and electrophysiological approaches.

In the first part of the study, we investigated the relevance of the PQ/MB model by studying the effects of combined PQ/MB on: (1) locomotor activity and motor coordination using the open field and the rotarod test respectively, (2) anxiety and “depressive-like” behaviors using the elevated plus maze and the forced swim test respectively, (3) subthalamic nucleus neuronal activity using extracellular single unit recordings and (4) tissue level of dopamine, noradrenaline and serotonin in the striatum and frontal cortex.

Our data provide evidence that male Sprague Dawley rats are not equally sensitive to PQ/MB and that the observed motor deficits in vulnerable animals are not only a result of dopamine neuron degeneration, but may also be a consequence of peripheral disabilities. Nevertheless, the parkinsonian-like non-motor impairments may be a direct consequence of the bilateral dopamine depletion.

Based on the results of the first part, we used the 6-OHDA rat model to investigate the effects of DA cell degeneration, alone or combined with the noradrenaline (NA) and/or serotonin (5-HT) depletions, on the electrical activity of suprachiasmatic nucleus (SCN) neurons using extracellular electrophysiological recordings. SCN is a key structure involved in the control of circadian rhythms. Our data provide the first evidence that monoamine depletions are at the origin of changes in the firing activity of SCN neurons, suggesting new insight into the involvement of these electrical changes in the pathophysiology of circadian rhythms disruption in PD.

Keywords: Parkinson disease's, Paraquat/Maneb, Suprachiasmatic nucleus, circadian rhythms, Electrophysiology.

Titre: L'impact de l'intoxication au Paraquat/Maneb et des déplétions sélectives des monoamines sur les systèmes moteur et circadien: Etudes comportementale, biochimique et électrophysiologique dans le contexte de la maladie de Parkinson.

Résumé : La présente étude a investi les effets des lésions des systèmes monoaminergiques sur les fonctions motrices et non-motrices, y compris l'évaluation des comportements anxieux et dépressifs ainsi que les rythmes circadiens dans le contexte de la maladie de Parkinson (MP). D'abord, nous avons mis en place un modèle animal approprié en utilisant une intoxication au Paraquat/Maneb (PQ/MB) ou avec des lésions sélectives des systèmes monoaminergiques. Ensuite, nous avons caractérisé les modèles en utilisant des approches comportementale, biochimique et électrophysiologique.

Dans la première partie de cette étude, nous avons investi la validité du modèle PQ/MB par évaluer les effets du PQ/MB sur : (1) l'activité locomotrice et la coordination motrice en utilisant les tests de l'Open Field et du Rotarod, (2) les comportements anxieux et dépressif en utilisant les tests du labyrinthe en croix surélevé et de la nage forcée respectivement, (3) l'activité neuronale du noyau sous-thalamique en utilisant des enregistrements extracellulaires unitaires et (4) les concentrations tissulaires en dopamine, noradrénaline et sérotonine dans le striatum et le cortex frontal.

Nos résultats montrent que les rats Sprague Dawley mâles ne sont pas sensibles de la même façon au PQ/MB et que les déficits moteurs observés chez les animaux vulnérables ne sont pas seulement le résultat d'une dégénérescence des neurones dopaminergiques, mais pourraient être aussi une conséquence des problèmes périphériques. Néanmoins, les troubles non-moteurs observés chez les animaux de tous les groupes traités pourraient constituer une conséquence directe de la déplétion dopaminergique bilatérale.

En se basant sur les résultats de la première partie, nous avons utilisé le modèle du rat 6-OHDA pour investir les effets de dégénérescence des cellules dopaminergique seule ou combinée avec les déplétions noradrénergique et sérotoninergique sur l'activité électrique des neurones du noyau suprachiasmatique (SCN) en utilisant des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires. Le SCN est une structure clé impliquée dans le contrôle des rythmes circadiens. Nos résultats montrent pour la première fois que les déplétions monoaminergiques sont à l'origine des changements dans l'activité électrique des neurones du SCN, apportant des résultats nouveaux qui suggèrent que les changements dans la décharge électrique des SCN qui perturbent les rythmes circadiens font partie de la physiopathologie de la MP.

Mots-clés : La maladie de Parkinson, toxiques environnementaux, Paraquat/Maneb, noyau suprachiasmatique, rythmes circadiens, Electrophysiologie, neurochimie.

Sommaire :

Remerciements :	3
Liste des publications et communications :	6
Abstract	8
Résumé :	9
Sommaire :	10
Liste des figures	13
Liste des tableaux	15
Abréviations	16
Avant-propos	19
I. Introduction :	22
1. La maladie de Parkinson (MP) :	22
i. Généralités :	22
ii. Symptômes moteurs et non-moteurs	24
iii. La théorie de Braak pour comprendre la maladie.....	26
iv. Quel modèle animal pour la MP.....	28
a) Le modèle 6-Hydroxydopamine :	29
b) Le modèle Paraquat/Maneb :	31
c) Le modèle MPTP	35
2. Les Ganglions de la base : de la physiologie à la physiopathologie	36
i. L'anatomie fonctionnelle des ganglions de la base.....	36
ii. L'activité électrique dans les ganglions de la base.....	40
3. Les systèmes monoaminergiques et la maladie de Parkinson.....	43
i. Le système dopaminergique	43
a) Rôle dans la maladie de Parkinson.....	45
b) Rôle dans les rythmes circadiens	46
ii. Le système noradrénergique.....	48
a) Rôle dans la maladie de Parkinson.....	49
b) Rôle dans les rythmes circadiens	50
iii. Le système sérotoninergique	51
a) Rôle dans la maladie de Parkinson.....	52
b) Rôle dans les rythmes circadiens	53
4. Les rythmes circadiens et maladie de parkinson	54
i. Définition et propriétés des rythmes circadiens	54
ii. Le noyau suprachiasmatique (SCN) :	55

a)	Anatomie du noyau suprachiasmatique :	57
b)	Distribution neurochimique	58
iii.	SCN : synchronisation physiologique	60
a)	Afférences	60
A.	Le tractus rétino-hypothalamique (RHT) :	61
B.	Le tractus géniculo-hypothalamique (GHT) :	61
C.	La voie sérotoninergique :	62
D.	Autres afférences au SCN	63
b)	Elaboration du message circadien	64
c)	Distribution du message circadien	66
iv.	L'activité électrique du SCN	68
a)	Généralités	68
b)	Le couplage	70
v.	Les rythmes circadiens et la maladie de Parkinson	72
II.	Objectifs global et spécifiques:	77
III.	Matériel et méthodes :	79
1.	Le modèle animal	79
i.	Intoxication combinée au PQ/MB	79
ii.	6-hydroxydopamine (6-OHDA)	79
2.	Etude comportementale	81
i.	Tests moteurs	81
a)	Champ Ouvert ou "Open Field"	81
b)	Rotarod	82
ii.	Tests non-moteurs	83
a)	Labyrinthe en Croix Surélevé (EPM)	84
b)	Dépression ou Consommation Préférentielle du Sucrose	85
c)	Nage forcée	86
3.	Etude électrophysiologique <i>in vivo</i> du NST et du SCN	87
i.	Chirurgie	87
ii.	Electrodes	88
iii.	Enregistrement et acquisition des signaux	88
iv.	Analyse de l'activité électrique enregistrée	89
4.	Etude biochimique :	89
IV.	Résultats :	91
1.	L'effet de l'administration du PQ/MB	91
i.	Réponses au PQ/MB	91

ii.	Effet du PQ/MB sur l'activité locomotrice :	92
iii.	Effet du traitement au PQ/MB sur la coordination motrice :	95
iv.	L'intoxication au PQ/MB induit l'anxiété :	97
v.	L'intoxication au PQ/MB induit un comportement dépressif :	99
vi.	L'intoxication au PQ/MB induit une baisse du contenu tissulaire de la dopamine mais pas celui de la noradréline ou la sérotonine.....	101
vii.	Le traitement au PQ/MB induit des changements de l'activité électrique des neurones du NST chez les animaux de tous les groupes traités.....	103
2.	Effets des lésions sur l'activité électrique du SCN.....	105
i.	Caractérisation	106
ii.	Effet des déplétions monoaminergiques	107
V.	Discussion:.....	112
1.	Discussion de la première partie :	112
2.	Discussion de la deuxième partie	118
i.	La caractérisation de l'activité électrique du SCN	118
ii.	L'effet des déplétions monoaminergiques sur l'activité électrique du SCN	124
VI.	Conclusions générales et perspectives :	133
VII.	Bibliographie.....	139
ANNEXE:	165

Liste des figures

Figure 1: Les symptômes cliniques de la MP et leurs occurrences dans le temps.....	25
Figure 2 : structures moléculaire du Paraquat, MPTP et MPP+.	35
Figure 3 : Représentation schématique anatomo-fonctionnelle du circuit moteur des GB dans l'état normal et dans le cas de la MP.	39
Figure 4 : Les changements rapportés dans l'activité unitaire extracellulaire des cellules dans le GPe, le NST et le GPi chez des singes normaux et des singes MPTP.....	43
Figure 5 : Voie de synthèse de la dopamine et de la noradrénaline.....	45
Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation morpho-fonctionnelle et neurochimique des SCN.	59
Figure 7 : Une représentation schématique des voies afférentes majeures du SCN.	60
Figure 8 : représentation schématique simplifiée du mécanisme de l'horloge dans les cellules du SCN chez les mammifères.....	65
Figure 9: Représentation schématique simplifiée montrant les afférences et les efférences du SCN.	67
Figure 10 : Représentation simplifiée de la relation entre l'activité cellulaire du SCN et l'activité comportementale.	70
Figure 11 : Représentation schématique simplifiée de la régulation de rythmicité des neurones du SCN par les interactions au sein du réseau formé par ces cellules.	72
Figure 12: Open field infrarouge, utilisé pour la mesure de l'activité locomotrice spontanée des rats au moyen des rayons photo-électriques infrarouges (BIOSEB, USA)	82
Figure 13: Photographie d'un appareil de Rorarod, utilisé pour mesurer la coordination motrice.	83
Figure 14 : Photographie du labyrinthe en croix surélevé, utilisé pour mesurer le comportement anxieux.....	85
Figure 15: Photographie du dispositif mis en place pour mesurer l'anhédonie.	86
Figure 16 : Photographie montrant une expérience de la nage forcée	87
Figure 17 : Une représentation schématique du déroulement de l'expérimentation.	91
Figure 18 : L'effet du traitement PQ/MB sur le poids corporel.	92

Figure 19: L'effet du traitement au PQ/MB sur l'activité locomotrice mesurée dans l'Open Field.	94
Figure 20: L'effet du traitement au PQ/MB sur la coordination motrice mesurée dans le retard.	96
Figure 21: L'effet du traitement au PQ/MB sur l'humeur.....	98
Figure 22 : L'effet du traitement au PQ/MB sur l'humeur.....	100
Figure 23 : L'analyse biochimique des contenus tissulaires des monoamines et leurs métabolites dans le striatum et le cortex frontal.	102
Figure 24 : L'effet du traitement au PQ/MB sur l'activité électrique des neurones su NST.	104
Figure 25 : Localisation du site d'enregistrement sur une coupe du cerveau montrant le SCN.	105
Figure 26: Graphique circulaire représentant la distribution des modes de décharge dans les neurones du SCN.....	107
Figure 27 : L'effet des déplétions monoaminergiques sur la fréquence de décharge des neurones du SCN.	108
Figure 28: L'effet des déplétions monoaminergiques sur la coefficient de variation des intervalles entre les potentiels d'action (ISI) des neurones du SCN.....	109
Figure 29 : L'effet des déplétions monoaminergiques sur le pourcentage de potentiels d'action en bouffées des neurones du SCN.	110
Figure 30: L'effet des déplétions monoaminergiques sur la distribution des modes de décharge dans les cellules du SCN.....	111
Figure 31 : Une représentation schématique des connexions du SCN qui pourraient jouer un rôle dans la perturbation des rythmes circadiens dans le contexte de la MP.	137

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les six stades proposés par le modèle de Braak.....	27
Tableau 2 : Table récapitulatif de l'effectif de chaque groupe, et les produits utilisés pour réaliser chacune des déplétions.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 3 : Table récapitulatif de l'effectif de chaque groupe, et les produits utilisés pour réaliser chacune des déplétions.	106

Abréviations

3V troisième ventricule

5-HT, sérotonine

6-OHDA, 6-hydroxydopamine

AAA, aire amygdaloïde antérieure

ACTH, hormone adrénocorticotrophine

AD, noyau thalamique antéro-dorsal

AH, noyau hypothalamique antérieur

ARC, noyau arqué

ARs, récepteurs adrénergiques

AVP, vasopressine

BNST, noyau du lit de la strie terminale

BNSTpm, noyau paraventriculaire de la strie terminale

CL, noyau thalamique centro-latéral

CM, noyau thalamique centro-médiane

DA, dopamine

DBH, dopamine beta hydroxylase

DCAA, decarboxylase d'acides aminés aromatiques

DM, noyau hypothalamique dorso-médiane

DMH, noyau hypothalamique dorsomédian

DRN, noyau Raphé dorsal

DRs, Récepteurs dopaminergiques

FSH, l'hormone folliculo-stimulante

GABA, acide gamma amino butyrique

GnRH, l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires

GPe, globus pallidus externe
GPi, globus pallidus interne
GRP, à peptide libérant la gastrine.
HPLC, chromatographie liquide à haute performance
i.p., intra péritonéale
IGL, Feuilletts intergénéculés latéraux du thalamus
LC, Locus Coeruleus
L-Dopa, L-3,4-dihydroxyphénylalanine
LDT, noyau tégmental dorso-latéral
LH, noyau hypothalamique latéral
LOT, noyau olfactif latéral
LS, septum latéral
LSV, septum latéral (partie ventrale)
MFB, faisceau médian du télencéphale (medial forebrain bundle)
MP, la maladie de Parkinson
MPN, noyau préoptique médian
MPTP, 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine
MRN, Noyau Raphé médian
MSNs, neurones épineux de taille moyenne
NA, noradrénaline
NR, noyau raphé
NST, noyau sous thalamique
PaPA, noyau hypothalamique paraventriculaire
PH, hypothalamus postérieur
PM, noyau pré-mammillaire
POA, aire préoptique
PrC, noyau précommissural
PT, noyau thalamique paraténial
PVA, noyau thalamique paraventriculaire (partie antérieure)

PVN, le noyau paraventriculaire
PVP, noyau thalamique paraventriculaire (partie postérieure)
RCh, aire rétrochiasmatique
RCPG, récepteurs couplés aux protéines G
Re, noyau Reuniens du thalamus
SCN, noyau suprachiasmatique
SHF, Stimulation à Haute Fréquence
SNc, substance noire pars compacta
SNr, substance noire pars reticulata
SON, le noyau supra-optique
sPVz, zone hypothalamique sous-paraventriculaire
SubG, noyau subgéniculaire
SuM, noyau supramammillaire
TH, tyrosine hydroxylase
Tu, tubercle olfactif.
VIP, peptide vasoactif intestinal
VMH, noyau hypothalamique ventro-médiane
VTA, Aire tegmental ventral.
RHT, tractus rétino-hypothalamique
GHT, tractus géniculo-hypothalamique
pRGC, cellules ganglionnaire rétiniennes sensibles à la lumière

Avant-propos

La maladie de Parkinson (MP) est un désordre neurologique caractérisé par des dysfonctionnements moteurs tels que l'akinésie, la rigidité et le tremblement de repos. Ces symptômes moteurs sont considérés comme la conséquence de la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la pars compacta de la substance noire (SNc), à l'origine de la déplétion en dopamine dans le striatum. Néanmoins, la MP est aussi caractérisée par des symptômes non-moteurs comme l'anxiété, la dépression et les troubles du sommeil, qui sont plutôt attribués à la perturbation d'autres systèmes de neurotransmetteurs tels que les neurones noradrénergiques du Locus Coeruleus (LC) et les neurones sérotoninergiques du noyau Raphé. Ces symptômes non-moteurs, dits aussi non-dopaminergiques, se manifestent souvent avant le diagnostic de la maladie et progressent inévitablement avec son évolution. En effet, les symptômes non-moteurs finissent par dominer le profil clinique chez les patients dans les stades avancés de la MP. Ils contribuent ainsi, à une invalidité sévère, une détérioration de la qualité de vie et à un raccourcissement de l'espérance de vie des patients. Contrairement aux symptômes d'origine dopaminergique pour qui, bien que pas toujours efficaces, des traitements sont disponibles, les symptômes non-moteurs sont souvent mal reconnus et de ce fait pas bien pris en charge. Récemment, plus d'attention a été donnée à cet aspect de la maladie pour permettre d'améliorer la reconnaissance et la quantification des symptômes non-moteurs. Les recherches menées actuellement sur cet axe permettront de mieux comprendre leur physiopathologie afin de mettre au point de nouvelles approches thérapeutiques ciblant ces symptômes qui restent très handicapants pour les patients. De plus la compréhension de ces symptômes non-moteurs, surtout ceux qui apparaissent avant le diagnostic de la maladie, permettrait d'améliorer la prise en charge des patients.

Dans la MP, les rythmes circadiens sont affectés constituant ainsi un des aspects non-moteurs de la maladie. Les mécanismes sous-jacents de ce dysfonctionnement sont peu étudiés. Cette thèse, s'inscrit ainsi dans cette démarche d'investir cet aspect relativement inconnu de la MP que sont les dysfonctionnements non-moteurs, en s'intéressant plus particulièrement au système circadien.

L'introduction de cette thèse se veut une présentation de l'état de l'art dans la thématique, pour donner un bref aperçu de toutes les facettes de ce sujet en prenant soin d'exposer à la fois les concepts élémentaires et les avancées récentes qui s'y rapportent. Du fait de la complexité des interactions des différents agents mis en jeu dans ce champ de recherche et qui incluent le système circadien gouverné par le noyau suprachiasmatique (SCN), les ganglions de la base et les neurotransmetteurs qui rendent l'interaction entre ces deux systèmes possible, l'introduction a été arrangée de telle façon à décrire chaque système séparément avant d'aboutir à une synthèse qui décrit leur interaction dans le contexte de la MP.

Mais avant, une description générale de la MP a été faite, en invoquant l'implication pathologique des différents systèmes monoaminergiques et les symptômes moteurs et non-moteurs qui en résultent. Cette partie s'achève par une mise au point sur l'importance des modèles animaux dans le développement des connaissances sur la physiopathologie de la MP. Une brève description des deux modèles utilisés au cours de cette étude a été faite (Les modèles PQ/MB et 6-OHDA) en plus du modèle MPTP auquel nous en avons recours dans la discussion.

La deuxième partie de l'introduction a été consacrée aux ganglions de la base, pour lesquels la déplétion en dopamine induit un dérèglement sévère à l'origine de la manifestation des symptômes de la MP. Nous nous sommes intéressés au cours de cette partie au fonctionnement des ganglions de la base à l'état normal et pathologique. Une attention particulière a été donnée au cours de cette partie à l'activité électrique des différents noyaux des ganglions de la base et les changements qui l'affectent dans la MP.

Dans la troisième partie de l'introduction, les systèmes monoaminergiques impliqués dans la MP (les systèmes dopaminergique, noradrénergique et sérotoninergique) ont été discutés. Au-delà de leurs caractéristiques et leurs fonctionnements, une synthèse de leurs implications dans la physiopathologie de la MP a été faite.

Dans la quatrième partie, le système circadien a été abordé. Nous avons décrit son fonctionnement et le rôle primordial que joue le SCN. La compréhension de ce système ne serait pas possible sans donner au SCN sa place d'horloge principale. Au sein de ce système, le SCN reçoit les informations environnementales photiques et non photiques à travers ses afférences; il les intègre et élabore un message circadien synchronisé qui sera distribué à différentes cibles à travers ses nombreuses efférences, assurant ainsi une adaptation optimale de l'organisme aux changements environnementaux.

Les différentes techniques utilisées au cours de ce travail ont été décrites dans le chapitre "matériel et méthodes". Les résultats et leurs discussions décrivent et interprètent le travail qui a été fait au cours de cette thèse, et qu'on peut diviser en deux parties : la première décrit la démarche qui a accompagné la mise en place d'un modèle animal adéquat pour étudier la problématique de cette thèse. Le choix a été porté sur le modèle utilisant le Paraquat (PQ) et le Maneb (MB), d'abord parce que c'est un modèle qui utilise des substances d'origine environnementale et ensuite parce que c'est un modèle émergent qui suscite beaucoup d'intérêt. C'était l'occasion d'évaluer la validité de ce modèle surtout sur les plans électrophysiologique et non-moteurs qui n'étaient jusque-là jamais exploités dans ce modèle. La deuxième partie a été consacrée à une étude électrophysiologique des neurones du SCN à l'état normal chez des animaux contrôles et chez des groupes d'animaux avec différentes déplétions monoaminergiques.

I. Introduction :

1. La maladie de Parkinson (MP) :

i. Généralités :

La MP est un trouble neurologique dû à un processus neurodégénératif progressif, qui affecte environ 300 individus par 100.000, causant une déclinaison importante des fonctions motrices et cognitives ainsi qu'une démence (Pontone et al., 2013; Williams-Gray et al., 2007). Le neurologue James Parkinson l'a décrit pour la première fois en 1817 comme étant une paralysie agitante (Parkinson, 1817). Presque un siècle après, FH Lewy a décrit les corps d'inclusions nommés les corps de Lewy plus tard (Holdorff et al., 2013) et Trétiakoff (1919) a observé une perte neuronale des cellules pigmentées de la SNc chez des patients parkinsoniens (Lees et al., 2008; Trétiakoff, 1919). Il a fallu attendre la fin des années 50 pour montrer que 80% de la dopamine cérébrale est localisée dans les ganglions de la base (Carlsson, 1959) et puis en déduire et montrer le lien entre la perte des neurones dopaminergiques et la MP (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Il est maintenant bien établi que cette perte neuronale progressive est devenue la signature pathologique de la MP (Bernheimer et al., 1973; Fahn et al., 1971; Hornykiewicz and Kish, 1987; Marsden, 1982; Nandhagopal et al., 2009) donnant lieu à une déplétion en dopamine dans le striatum ainsi que dans d'autres structures extra-striatales des ganglions de la base (Benazzouz et al., 2014) et au niveau cortical (Scatton et al., 1983). Même si depuis les observations de (Ehringer and Hornykiewicz, 1960), on savait que la noradrénaline (NA) et la sérotonine (5-HT) connaissaient une déplétion significative chez les patients, on persistait à croire jusqu'à une date relativement récente, que seule la dégénérescence du système dopaminergique était responsable des symptômes de la maladie. Maintenant, il est clair qu'il s'agit d'un trouble multi-système dans lequel plusieurs structures cérébrales sont affectées tout

au long de la progression de la maladie (Braak et al., 2006; Jain, 2011; Jellinger, 2010), notamment le LC (Chan-Palay, 1991a; Chan-Palay, 1991b; Chan-Palay and Asan, 1989) et le noyau Raphé (Halliday et al., 1990a; Kerényi et al., 2003; Kish et al., 2008). D'après la théorie de Braak, la dégénérescence des neurones de ces régions commencerait bien avant celle des neurones dopaminergiques de la SNc (Braak et al., 2003) et elle serait à l'origine de plusieurs des troubles non-moteurs de la MP. Bien que plusieurs études suggèrent que ces troubles pourraient avoir un impact plus élevé sur la qualité de vie des patients que les troubles moteurs (Aarsland et al., 2005; Karlsen et al., 1999; Shulman et al., 2001) ils ne sont la cible de traitements que récemment (Wulff et al., 2010).

L'étiologie de la MP n'est pas encore bien élucidée. Bien qu'une partie des cas soit attribuée à un facteur génétique, notamment à la mutation des gènes responsable de la production de l'alpha-synucléine (Feng et al., 2015), plus de 90% des cas sont attribués à un facteur environnemental (Cicchetti et al., 2009). En effet, cette notion d'association entre la MP et les facteurs environnementaux est née avec les observations précoces de Davis et ses collègues (Davis et al., 1979) qui ont montré l'apparition d'un parkinsonisme secondaire chronique suite à l'ingestion accidentelle du 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) chez des jeunes étudiants toxicomanes. Le MPTP est un analogue de la mépéridine, qui bien qu'il n'existe pas dans la nature, il présente des similarités structurelles avec des substances naturelles et industrielles (Langston et al., 1983). Dès lors, plusieurs études cliniques, épidémiologiques et expérimentales ont essayé d'investir dans le rôle des facteurs environnementaux et leur possible implication dans le développement de la MP. Aujourd'hui plusieurs éléments tirés de ces études pointent la cause environnementale dans l'incidence de la maladie. D'abord l'exposition élevée au manganèse et/ou au plomb a été proposée comme étant un facteur de risque important pour le développement de la MP chez les patients (Guilarte, 2013) et les modèles animaux (Bouabid et al., 2014; Sabbar et al., 2012). Les métaux lourds

ont été mis en évidence aussi comme présentant un important facteur de risque de développement de la MP (Chin-Chan et al., 2015; Stelmashook et al., 2014). Le plomb par exemple, présente un risque élevé pour le développement de la maladie (Gorell et al., 2006; Weisskopf et al., 2010) en induisant des dysfonctionnements moteurs et non-moteurs en parallèle avec des changements dans l'activité électrique et métabolique du noyau sous-thalamique (NST) (Sabbar et al., 2012). Ces résultats donnent suffisamment de crédibilité à la thèse impliquant les toxines environnementales dans l'induction du parkinsonisme. Parmi ces substances soupçonnées d'être impliquées, les pesticides ont été évoqués par plusieurs études épidémiologiques (Ascherio et al., 2006; Dick et al., 2007; Hatcher et al., 2008; Tanner, 1989).

ii. Symptômes moteurs et non-moteurs

Les symptômes moteurs cardinaux de la MP ont été reconnus comme un composant majeur de la maladie depuis la description initiale de James Parkinson en 1817 (Parkinson, 1817), puis raffinés par Jean Marie Charcot (Goetz, 2011). Ces symptômes parkinsoniens incluent la bradykinésie, la rigidité, le tremblement de repos et l'instabilité posturale avec un déclenchement asymétrique qui a tendance à devenir symétrique avec le temps et la progression de la maladie. D'autres symptômes incluent des changements de posture et de démarche qui se manifestent sous forme de festination, des problèmes d'articulation et de déglutissement sont aussi répandus parmi les patients (Jankovic, 2008). Les fonctions motrices altérées sont classiquement utilisées pour effectuer le diagnostic clinique de la MP. Une réponse positive au traitement dopaminergique confirme le diagnostic. Plus récemment, cette liste classique des symptômes de la MP a été enrichie et la maladie a été reconnue comme étant plus complexe et comprenant en plus des troubles moteurs, des troubles non-moteurs.

En effet, les symptômes non-moteurs de la MP comprennent une large liste de désordres cognitifs, émotionnels et limbiques complexes (Chaudhuri et al., 2006; Chaudhuri and Martinez-Martin, 2008; Fox et al., 2008). L'apparition de ces symptômes non-moteurs est

corrélée avec l'avance dans l'âge et l'aggravation de la maladie, mais quelques-uns de ces symptômes comme la dépression, l'anxiété, les perturbations du sommeil, les déficits olfactifs et la constipation se manifestent dans un stage précoce de la maladie (Khoo et al., 2013) et peuvent même précéder, par plus d'une décennie, l'expression des symptômes moteurs (Chaudhuri and Naidu, 2008; Langston, 2006; Postuma et al., 2012) (Figure 2). Cette phase pré-motrice ou prodromique peut être prolongée ou réduite ; par exemple, la moyenne de la phase de latence entre le début d'apparition des troubles du sommeil paradoxal (REM, rapid eye movement) et l'occurrence des symptômes moteurs est située entre 12 à 14 ans (Postuma et al., 2012). Le processus pathologique qui cause le parkinsonisme est probablement en marche au cours de la phase prodromique, impliquant des régions du système nerveux central et périphérique en plus de la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc. Cette phase pourrait offrir une durée pendant laquelle la maladie pourrait être mieux prise en charge améliorant ainsi la qualité de vie des patients (Siderowf and Lang, 2012).

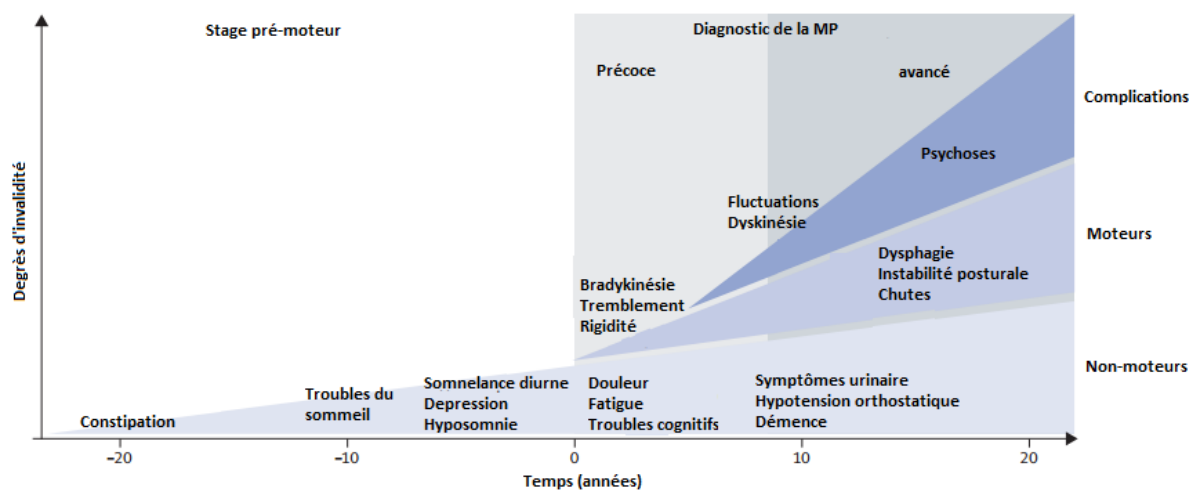


Figure 1: Les symptômes cliniques de la MP et leurs occurrences dans le temps.

Le diagnostic de la MP, survient généralement avec l'émergence des symptômes moteurs (Temps 0), cependant cette étape peut être précédée par une phase pré-motrice qui peut durer 20 ans ou plus. Cette phase pré-motrice est caractérisée par des symptômes non-moteurs spécifiques. D'autres symptômes non-moteurs apparaissent après le diagnostic et avec la progression de la maladie, causant une détérioration clinique importante. Les symptômes moteurs axiaux comme l'instabilité posturale avec les chutes fréquentes surviennent dans les stades avancés de la maladie. Les complications à long-terme du traitement dopaminergique telles que les dyskinésies contribuent aussi aux perturbations cliniques.

D'après (Kalia and Lang, 2015)

La progression de la MP est caractérisée par une détérioration des facultés motrices, qui initialement pouvait être gérée avec des traitements symptomatiques. A cela s'ajoute le fait que ces traitements administrés pendant une longue durée entraînent des complications incluant des fluctuations motrices et non-motrices, des dyskinésies et des psychoses (Hely et al., 2005). Ces complications liées à ces traitements constituent un fardeau supplémentaire pour prendre en charge les patients pendant les stades avancés de la maladie. Ces stades avancés sont caractérisés par des symptômes moteurs et non-moteurs résistants aux traitements comme l'instabilité posturale, la festination, les chutes répétées et des problèmes d'articulation. En effet, 17 ans après le début de la maladie plus de 80% des patients sont victimes de chutes régulières et de festination et plus de 50% souffrent d'étouffement (Hely et al., 2005). Des dysfonctionnements du système autonome comme l'incontinence urinaire et la constipation avec un besoin quotidien d'utilisation de laxatifs en plus de l'hypotension sont largement répandus chez les patients à ce stade avancé de la maladie (Hely et al., 2005; Hely et al., 2008). La démence est particulièrement fréquente aussi, touchant plus de 83% des patients (Hely et al., 2008).

iii. La théorie de Braak pour comprendre la maladie

L'impact sur la qualité de vie des patients atteints de la MP, du fait de la complexité des symptômes non-moteurs a été discuté dans plusieurs études (Di Rocco et al., 1996; Klawans, 1986; Kuopio et al., 2000; Schrag et al., 2000). Par exemple, une de ces études avec un suivi des patients parkinsoniens pendant 15 à 18 ans avec des symptômes non-moteurs qui ne répondent pas à la L-DOPA, a montré que ces symptômes sont les plus invalidants et les plus dominants dès 15 années après le diagnostic de la maladie (Hely et al., 2005). Ce constat, a contribué à faire évoluer l'intérêt pour comprendre l'enchaînement et la distribution des changements pathologiques observés dans la MP et à montrer que d'autres groupes cellulaires

non-dopaminergiques, jouent un rôle majeur dans le développement des symptômes de la maladie.

L'occurrence des symptômes non-moteurs qui précèdent l'apparition des signes moteurs, est corrélée à l'apparition des corps de Lewy et leur progression au cours de la MP (Braak et al., 2003; Wolters and Braak, 2006). La physiopathologie des corps de Lewy qui constitue un autre signe indicateur de la MP, consiste en l'accumulation de protéines α -synucléine anormalement pliée pour former des inclusions intracellulaires qu'on appelle les corps de Lewy (Goedert et al., 2013). A partir de ce constat, Braak et ses collègues (Braak et al., 2003) ont proposé un modèle qui explique la progression de cette pathologie temporellement et spatialement dans la MP, à travers six stades, avec un début dans le système nerveux périphérique et puis une altération progressive du système nerveux central dans une direction caudale-rostrale dans le cerveau (Tableau 2). Les stades 1 et 2 correspondent au début de la phase pré-motrice de la maladie, le stade 3 survient quand les symptômes moteurs émergent à cause de la déficience en dopamine nigro-striatale, alors que les stades de 4 à 6 ont lieu avec des symptômes non-moteurs supplémentaires qui surviennent dans les stades avancés de la maladie (Halliday et al., 2008; Kempster et al., 2010; Parkkinen et al., 2008)(Figure 2).

Stade 1	Système nerveux central, système olfactif (Bulbe olfactif, noyau olfactif antérieur), medulla oblongata
Stade 2	Pont (Locus Coeruleus, formation réticulée, noyau Raphé), moelle épinière (matière grise).
Stade 3	Pont (noyau pédonculopontique), mésencéphale (SNc), prosencéphale basal, système limbique (Amygdales)
Stade 4	D'autres parties du système limbique.
Stade 5 et 6	Plusieurs régions corticales.

Tableau 1 : Les six stades proposés par le modèle de Braak.

Le modèle de Braak propose que la pathologie des corps de Lewy progresse temporellement et spatialement dans la MP suivant six stades.
D'après (Kalia and Lang, 2015)

iv. Quel modèle animal pour la MP

Les modèles animaux de la MP ont eu et ont encore un rôle clé dans l'élaboration et le développement de nouvelles approches thérapeutiques, ainsi que dans la compréhension de la nature du processus neurodégénératif, permettant la réalisation d'études impossibles à entreprendre sur l'humain (Duty and Jenner, 2011). La découverte que l'administration de la réserpine ou de l'halopéridole aux rongeurs ou aux lapins provoque un parkinsonisme aigu chez ces animaux a été rapidement suivie par la découverte de la suppression de ces symptômes par la L-DOPA (Carlsson et al., 1957). Ceci a ouvert la porte à d'autres succès qui se sont suivis. Cependant, les modèles animaux de la MP présentent aussi des limites par leur incapacité à mimer parfaitement la maladie. Cette limite est en grande partie due, au fait que pendant longtemps, les critères pour considérer un modèle animal comme étant bon étaient limités au fait qu'il y'a des troubles moteurs qui répondent bien aux traitements dopaminergiques, résultat d'une dégénérescence significative des cellules dopaminergiques nigro-striatales, ainsi qu'une présence d'inclusions de corps de Lewy dans les cellules résistant à la dégénérescence (Cicchetti et al., 2009). Aujourd'hui, ces critères ont évolué et un modèle animal idéal de la MP devrait présenter les caractéristiques physiopathologiques et cliniques de la maladie, impliquant le système dopaminergique ainsi que d'autres systèmes non-dopaminergiques, et présentant les symptômes moteurs et non-moteurs. L'âge et la nature progressive de la maladie doivent également être pris en considération dans le choix du modèle. Dans ce cadre, le modèle doit présenter des dysfonctionnements moteurs, des troubles cognitifs et comportementaux, reflétant ceux qui apparaissent lors d'une neurodégénérescence des neurones noradrénergiques et sérotoninergiques en plus de ceux inhérents à une dégénérescence des cellules

dopaminergiques, avec la présence des corps de Lewy dans les neurones survivants. Finalement, la reproductibilité est un élément important dans le développement des modèles animaux. Aucun des modèles actuels ne satisfait toutes ces caractéristiques (Tieu, 2011) et donc un seul modèle ne peut pas être adapté à tous les aspects de la maladie et il n'a de valeur que s'il simule précisément les caractéristiques pathologiques, histologiques, biochimiques ou cliniques recherchés par l'expérimentateur. Alors que les modèles utilisant des neurotoxines de nature synthétique restent les plus utilisés, ceux utilisant des produits de nature environnementale sont toujours en voie de développement. Parmi ces derniers, les modèles des pesticides ou des produits utilisés en agriculture ont été largement étudiés, mais les résultats restent controversés. Dans cette introduction nous allons seulement aborder trois modèles: Le modèle PQ/MB qui utilise les deux pesticides PQ et MB et le modèle 6-OHDA avec différentes déplétions monoaminergiques. Ces deux modèles ont été utilisés au cours de cette thèse, alors que le troisième qui est le modèle MPTP est cité à titre comparatif.

a) Le modèle 6-Hydroxydopamine :

Contrairement au modèle PQ/MB, ce modèle n'est pas à son stade de mise au point. La 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) est l'analogue hydroxylé de la dopamine et de la noradrénaline qui a été identifiée cela fait plus de 50 ans (Senoh et al., 1959; Senoh and Witkop, 1959). Initialement, la 6-OHDA a été décrite comme étant une toxine spécifique de la noradrénaline cardiaque chez la souris (Porter et al., 1965; Porter et al., 1963). La découverte ultérieure que la 6-OHDA pouvait induire une dégénérescence des neurones dopaminergiques et noradrénergiques (Ungerstedt, 1968) a ouvert la voie à ce concept nouveau de dénervation chimique qui consiste à utiliser une molécule neurotoxique par injection intracérébrale pour induire une dégénérescence des populations de cellules spécifiques (Jonsson, 1980). Les neurones dopaminergiques et noradrénergiques sont particulièrement vulnérables à la 6-OHDA, à cause des transporteurs membranaires de la dopamine et de la noradrénaline qui ont

une affinité élevée pour cette molécule (Luthman et al., 1989). Une fois à l'intérieur du neurone, la 6-OHDA s'accumule dans le cytosol, où elle est rapidement oxydée donnant lieu à la génération de radicaux libres et aboutissant finalement à une cytotoxicité liée au stress oxydatif qui cause la mort des cellules de ces populations neuronales spécifiques (Blum et al., 2001; Graham, 1978; Saner and Thoenen, 1971). En conséquence, le LC et la région nigro-striatale sont hautement sensibles à cette neurotoxine (Jonsson, 1980). Pour cibler des neurones spécifiques et pour contourner la barrière hématoencéphalique, la 6-OHDA est typiquement injectée de façon stéréotaxique dans la région cérébrale d'intérêt. La difficulté qu'engendre le fait de cibler des petites structures telle que la SNc ou le MFB, la 6-OHDA est plus communément utilisée chez le rat que chez la souris pour modéliser la MP. La 6-OHDA a aussi été utilisée chez le chat, le chien, le cobaye et le singe (Bezard et al., 1998; Bezard and Przedborski, 2011).

L'ampleur de la lésion et les caractéristiques de la neurodégénérescence induite par la 6-OHDA sont significativement affectées par le site d'injection (Agid et al., 1973; Przedborski et al., 1995). En général, la 6-OHDA est injectée unilatéralement dans la SNc, le MFB ou le striatum. Les terminaisons nerveuses sont plus sensibles à la toxicité de la 6-OHDA que les axons et les corps cellulaires (Malmfors and Sachs, 1968). Quand elle est injectée dans la substance noire ou le MFB, la 6-OHDA produit une lésion rapide et complète dans la voie nigro-striatale. Quand elle est injectée dans la substance noire, la dégénérescence des neurones dopaminergiques a lieu dans les 12 heures, donnant lieu 2 à 3 jours après à une perte significative dans les terminaisons striatales (Faull and Laverty, 1969; Jeon et al., 1995) alors que quand elle est injectée dans le MFB, la 6-OHDA induit une dégénérescence dans les terminaisons striatales avant l'occurrence de la mort des cellules dopaminergiques qui survient dans les 24 h (Jeon et al., 1995; Sarre et al., 2004). Par contre, quand la 6-OHDA est injectée dans le striatum, elle induit une lente et progressive altération de la SNc, d'une façon rétrograde durant trois semaines

ou plus (Przedborski et al., 1995; Sauer and Oertel, 1994). Ces injections, quand elles sont unilatérales, produisent un comportement moteur rotatif asymétrique dont l'ampleur reflète le degré de la lésion nigro-striatale (Hefti et al., 1980; Herrera-Marschitz et al., 2010; Ungerstedt and Arbuthnott, 1970).

Comme il a été noté auparavant dans ce manuscrit, il existe différents modèles 6-OHDA, qui peuvent être utilisés pour modéliser certains aspects de la MP. Ces modèles miment la dégénérescence dopaminergique relevée chez les patients parkinsoniens, mais la validité de ce modèle pose certaines questions depuis que les données cliniques montrent que le système dopaminergique n'est pas le seul à être affecté dans la maladie, mais aussi d'autres systèmes de neurotransmetteurs notamment les systèmes noradrénergiques (Cf. voir chapitre MP et système noradrénergique) et sérotoninergiques (Cf. voir chapitre MP et système sérotoninergique). A noter que même si la 6-OHDA détruit aussi les neurones noradrénergiques, son utilisation a été systématiquement accompagnée par une injection de la désipramine pour protéger ces neurones. Prenant en considération ces données, d'autres modèles animaux ont été développés récemment et qui proposent de reproduire en plus des symptômes moteurs, les symptômes non-moteurs en lésant aussi les neurones sérotoninergiques et noradrénergiques (Delaville et al., 2012). A noter qu'aucun modèle utilisant la 6-OHDA ne permet de répliquer la formation des corps de Lewy (Dauer and Przedborski, 2003).

b) Le modèle Paraquat/Maneb :

L'intérêt d'utiliser des pesticides pour développer des modèles animaux de la MP est né suite à l'établissement d'un lien entre ces pesticides et la MP par plusieurs études épidémiologiques (Ascherio et al., 2006; Dick et al., 2007; Hatcher et al., 2008; Tanner, 1989) dans l'objectif de prendre en considération l'origine environnementale potentielle de la maladie. Parmi ces pesticides, le PQ est un des herbicides les plus utilisés dans le monde sans restriction dans la plupart des pays sauf en Union Européenne où son utilisation est interdite ou aux Etats unis où

son utilisation est réglementée, Au Maroc, cet herbicide se vend librement sans aucune restriction. De son côté, le MB est un polymère du Manganèse qui est utilisé comme fongicide en agriculture. Plusieurs laboratoires ont commencé à s'intéresser au PQ comme un possible facteur de risque pour la MP, après l'observation de sa similarité structurale avec le MPP+, le métabolite actif et toxique du MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine) (Snyder and D'Amato, 1985) (Figure 3). Par la suite, plusieurs études épidémiologiques (Hertzman et al., 1990; Kamel et al., 2007; Liou et al., 1997; Ritz et al., 2009; Tanner et al., 2011) et expérimentales (Baltazar et al., 2014; Liou et al., 1996; Ossowska et al., 2005) ont mis en évidence la possible implication du PQ dans l'incidence de la MP. En effet, il a été rapporté que le PQ peut pénétrer la barrière hématoencéphalique (BHE) par le système de transport des acides aminés neutres qui est la seule voie pour certains acides aminés de traverser la BHE (Shimizu et al., 2001), causant la mort des cellules dopaminergiques nigro-striatales et l'induction de troubles moteurs (McCormack et al., 2002; Thiruchelvam et al., 2003), ainsi qu'une dérégulation et une accumulation d' α -synucléine mal pliée dans les cellules de la SNc survivantes (Manning-Bog et al., 2002) et l'activation de microglies dans la SNc (Cicchetti et al., 2005). Tous les dérèglements liés à la neurotoxicité causée par le PQ ne sont pas totalement connus, mais plusieurs études ont rapporté sa capacité à induire un stress oxydatif et des dysfonctionnements mitochondriaux (Cocheme and Murphy, 2008; Franco et al., 2010; Somayajulu-Nitu et al., 2009). D'autre part, le fongicide MB semble aussi pouvoir traverser la BHE (Zhang et al., 2003) et réduire l'activité locomotrice (Morato et al., 1989). Ce produit a aussi été expérimenté comme un amplificateur des effets liés à la neurotoxicité du MPTP (Takahashi et al., 1989). Il a été rapporté que l'exposition au MB induit un parkinsonisme assimilé à une intoxication au manganèse du fait de sa composition en manganèse (Ferraz et al., 1988; Meco et al., 1994). Le mécanisme des effets liés à la neurotoxicité de cette molécule reste très peu connu, mais il semble qu'elle agit préférentiellement sur le complexe III

mitochondrial des cellules dopaminergiques de la SNc (Zhang et al., 2003). Le fait que le PQ et le MB possèdent la propriété d'altérer le système dopaminergique, suggère que leur combinaison (PQ/MB) pourrait contribuer à l'incidence de la MP, et par conséquent aider à mettre en place un modèle animal de la MP. En effet, l'exposition de souris adultes au PQ/MB a montré une perte significative des fibres dopaminergiques nigro-striatales et une augmentation de l'activité métabolique de la dopamine et la 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), un métabolite dopaminergique (Thiruchelvam et al., 2000b; Thiruchelvam et al., 2000a). Ces études ont montré que les conséquences de l'association des deux produits sont beaucoup plus significatives que lors de l'exposition à chaque composé tout seul. Le même constat est rapporté pour l'activité locomotrice. D'autres études ultérieures ont montré une altération du système dopaminergique avec une réduction du niveau de la tyrosine hydroxylase (TH) et une réduction significative de l'activité locomotrice après un protocole consistant à une administration du PQ/MB deux fois par semaine pendant 6 semaines (Li et al., 2005; Thiruchelvam et al., 2003). Une autre étude chez la souris a aussi montré que l'exposition au PQ/MB pendant la période post-natale provoque une lésion dans 38% des cellules dopaminergiques à l'âge adulte, alors qu'une exposition post-natale suivie par une réexposition à l'âge adulte provoque une réduction dans le nombre de cellules qui est de l'ordre de 70% (Thiruchelvam et al., 2002). Une autre variante de ce protocole a consisté à utiliser une exposition prénatale au MB suivi d'une exposition au PQ à l'âge adulte, ce qui a aussi, donné une réduction de l'activité locomotrice et une réduction de TH dans la SNc (Barlow et al., 2003). D'autres études ont montré qu'il y a une interaction entre l'âge et l'effet des neurotoxines environnementales. Les souris les plus âgées sont plus susceptibles de développer le parkinsonisme après un traitement systémique au PQ/MB (McCormack et al., 2002; Thiruchelvam et al., 2003; Thiruchelvam et al., 2002). Cette susceptibilité est due probablement

au changement de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique avec le vieillissement (Corasaniti et al., 1991; McCormack et al., 2002).

Ce modèle a été utile pour avoir démontré l'effet synergique potentiel de deux composants environnementaux dans le développement des symptômes de la MP. Les études qui ont utilisé ce modèle ont essayé davantage de mimer les scénarios d'intoxication par ces molécules chez l'humain, sans prendre en considération les voies d'administration (injection intranigrale ou intrapéritonéale par exemple) dont l'occurrence reste improbable dans l'environnement naturel, sachant que ces deux molécules ne s'utilisent pas de la même façon (Hatcher et al., 2008).

Les résultats des différentes études expérimentales restent confus. Si globalement, ce modèle répond à plusieurs des critères classiques pour évaluer un modèle animal de la MP, y compris les troubles comportementaux moteurs et la dégénérescence significative des cellules dopaminergiques, comme le montre plusieurs études (Cicchetti et al., 2005, Saint-Pierre et al., 2006), d'autres travaux, ont montré qu'il n'y a que des dysfonctionnements moteurs avec une augmentation de la dopamine striatale (Thiruchelvam et al., 2000a). Une autre étude où l'intoxication au PQ a été faite par inhalation a montré qu'aucun paramètre n'a été affecté (Rojo et al., 2007; Thiruchelvam et al., 2000b). Par contre, les symptômes non-moteurs n'ont jamais été évalués. Notre étude est donc la première à aborder cet aspect de la maladie dans ce modèle (Tinakoua et al., 2015). Les points faibles de ce modèle sont les effets périphériques indésirables non-spécifiques qu'il produit, en particulier des problèmes au niveau des poumons dont une grande partie des animaux souffrent et en meurent, ce qui rend ce modèle aussi peu ou pas reproductible (Cicchetti et al., 2005; De Gori et al., 1988; Rojo et al., 2007; Saint-Pierre et al., 2006; Satomi et al., 2004).

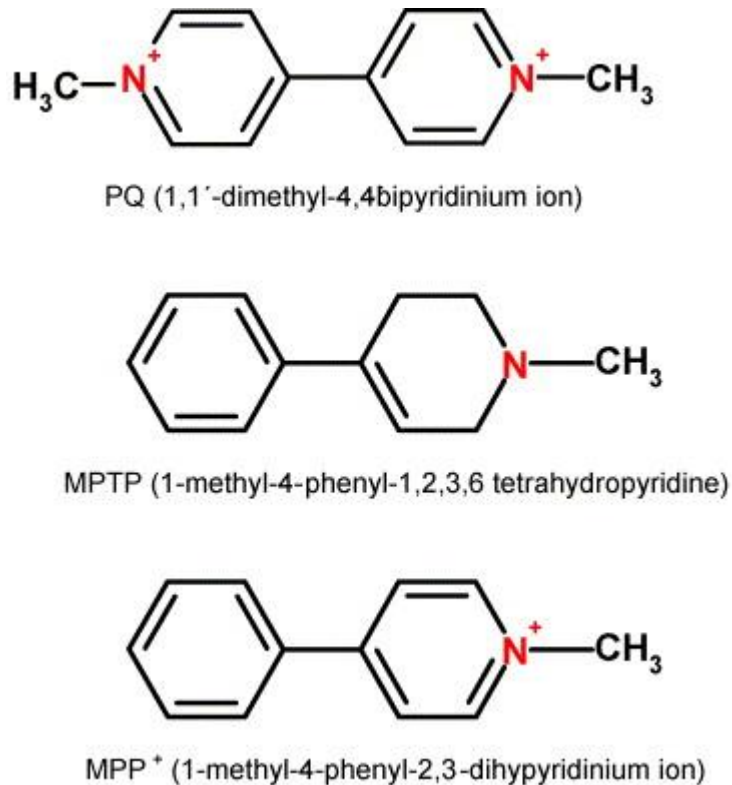


Figure 2 : structures moléculaire du PQ, MPTP et MPP+.

Le MPTP, une fois dans le cerveau, est converti en MPP⁺ qui constitue sa forme active. Le MPP⁺ ressemble au PQ qui est doublement chargé.

c) Le modèle MPTP

Le MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine) est une neurotoxine communément utilisée pour développer des modèles de la MP chez les primates non-humains et la souris. L'intérêt porté à cette neurotoxine vient du fait de sa capacité à induire un parkinsonisme persistant chez l'humain (Davis et al., 1979; Langston et al., 1983). Des travaux ultérieurs chez les primates non-humains ont montré que la destruction des neurones dopaminergiques nigro-striés causée par le MPTP est à l'origine des dysfonctionnements moteurs observés (Burns et al., 1983; Jenner et al., 1984; Langston and Ballard, 1984). De ces observations viennent les modèles MPTP qui ne se sont pas restés limités aux primates non-humains, mais qui ont aussi été utilisés chez les souris. A noter, que plusieurs espèces de rongeurs, y compris les rats sont

insensibles à l'action toxique du MPTP (Johannessen et al., 1985), contrairement à plusieurs souches de souris qui le sont (Sonsalla and Heikkila, 1988).

Le mécanisme à l'origine de l'action neurotoxique du MPTP a été le sujet de plusieurs travaux et est relativement bien connu. Le MPTP est une protoxine lipophile qui, suivant l'injection (généralement une injection intrapéritonéale ou sous-cutanée), traverse rapidement la barrière hémato-encéphalique (Riachi et al., 1989). Une fois à l'intérieur du cerveau, le MPTP est converti par une monoamine oxydase B (MAO-B) en 1-méthyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium (MPDP+), un produit intermédiaire qui s'oxyde rapidement et spontanément pour donner le 1-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP+) qui est la substance active toxique (Chiba et al., 1984). Une fois dans l'espace extracellulaire, le MPP+ est introduit via les transporteurs de la dopamine (DAT) à l'intérieur des cellules dopaminergiques où il induit la libération des radicaux libres toxiques dans ces cellules (Javitch et al., 1985; Nicklas et al., 1987).

Si chez le singe ce modèle a été décrit comme étant le plus proche des conditions de la MP, chez la souris, quelques limites le place au-dessous du modèle 6-OHDA, particulièrement en terme de reproductibilité et de troubles moteurs qui peuvent être obtenus. Les souris sont moins sensibles au MPTP que les primates et la dose élevée requise pourrait être létale pour l'animal, en conséquence à la neuro- ou cardio-toxicité périphériques induites (Jackson-Lewis and Przedborski, 2007).

2. Les Ganglions de la base : de la physiologie à la physiopathologie

i. L'anatomie fonctionnelle des ganglions de la base

La MP et le parkinsonisme en général sont considérés comme la conséquence d'un dysfonctionnement des ganglions de la base (GB). Ces derniers sont constitués par un réseau de noyaux pairs sous-corticaux interconnectés, qui sont constitués par le striatum (noyau caudé

et putamen), les Globus Pallidus interne (GPi) et externe (GPe), le noyau sous-thalamique (NST) et la substance noire avec sa partie réticulée (SNr) et compacte (SNc). Ces noyaux sont impliqués dans le fonctionnement de boucles séparées anatomiquement et fonctionnellement qui impliquent des zones spécifiques du cortex et du thalamus. Ces circuits parallèles sont divisés en boucles motrice, limbique ou associative, cela dépend de la zone corticale impliquée (Alexander and Crutcher, 1990; Alexander et al., 1990; Alexander et al., 1986; Kelly and Strick, 2004; Middleton and Strick, 2000). Le rôle des ganglions de la base est crucial dans le contrôle moteur et les fonctions cognitives (Graybiel et al., 1994; Grillner et al., 2005; Yin and Knowlton, 2006). Le striatum constitue la structure d'entrée des ganglions de la base, en recevant et intégrant les projections glutaminergiques en provenance du cortex. Le striatum exerce à son tour un robuste contrôle sur les noyaux des GB en aval et par conséquent sur le comportement moteur (Doig et al., 2010; Huerta-Ocampo et al., 2014). Il est formé à 95% de neurones épineux de taille moyenne (MSNs, Medium spiny neurons) GABAergiques qui colocalisent souvent avec des neuropeptides. Ces neurones comprennent au moins deux classes : une classe exprimant des récepteurs D1 (DR1) de la dopamine et l'autre, les récepteurs D2 (DR2), ces neurones constituent l'origine des projections striatales et donnent naissance à ce qu'on appelle les voies directes et indirectes (Gerfen et al., 1990; Smith et al., 1998). Les 5% des neurones striataux restants sont composés d'interneurones GABAergiques et cholinergiques qui participent au contrôle local de l'activité des MSNs (Kawaguchi et al., 1995; Mallet et al., 2005).

Ainsi, le striatum reçoit en plus des projections glutaminergiques corticales, une importante innervation dopaminergique en provenance de la SNc, dont les cibles sont des MSNs innervés également par les afférences corticales. Cet arrangement anatomique place la voie dopaminergique afférente dans une position lui permettant de moduler l'activité corticale

afférente au striatum via la transmission cortico-striatale et par conséquent, les activités des voies directes et indirectes (Gerfen et al., 1990).

La voie directe projette directement sur les structures de sortie des GB qui sont le GPi et la SNr, deux structures qui contiennent des neurones GABAergiques actifs de façon tonique et qui projettent principalement sur les neurones glutamatergiques du thalamus moteur. L'activité des MSNs GABAergiques striataux exprimant les DR1 inhibe l'activité des neurones du GPi et de la SNr, qui par conséquent lèvent l'inhibition sur le thalamus moteur, dont les neurones se trouvent ainsi activés facilitant en conséquence le mouvement. C'est pour cette raison que cette voie est considérée comme étant facilitatrice. Par contre, la voie indirecte qui implique les neurones MSNs exprimant les DR2 est considérée comme étant inhibitrice. En effet, les MSNs striataux exprimant les DR2, innervent avec leurs projections GABAergiques le GPe dont l'activité tonique de ses neurones GABAergiques se trouve inhibée, permettant ainsi de renforcer l'activité des neurones de la SNr et du GPi, par une voie directe et une autre indirecte passant par le NST qui envoie des projections excitatrices en direction de ces structures de sortie. Cette levée d'inhibition sur la SNr et le GPi, renforce l'inhibition exercée par ces structures sur les neurones du thalamus moteur inhibant ainsi le mouvement (Figure 4, côté gauche). C'est l'équilibre entre ces deux voies qui rend possible le contrôle du comportement moteur (Bolam and Ellender, 2015; Gerfen and Surmeier, 2011; Kravitz et al., 2010). Ce modèle anatomo-fonctionnel classiquement admis (Albin et al., 1989) a été très utile pour étudier l'anatomie et les fonctions relatives aux GB, mais il est clair qu'il représente une description simplifiée, car des connections importantes entre ces noyaux d'un côté et le tronc cérébral et le thalamus n'y sont pas incluses. En plus, la séparation des voies de transmission au sein des GB en une directe et une autre indirecte n'est pas absolue, puisque la présence de MSNs striataux projetant à la fois vers les deux segments du GP, a été constatée (Levesque and

Parent, 2005; Parent et al., 1995). De plus l'attribution des DR1 et DR2 aux voies directe et indirecte, respectivement, est encore un sujet de débat (Aizman et al., 2000; Day et al., 2006).

Dans la MP, la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc et leurs projections en direction du striatum, est un processus qui évolue lentement et peut prendre des décennies pour se développer et s'achever. Les projections vers le putamen sont les premières touchées, contribuant à des changements morphologiques dans les MSNs, qui affectent préférentiellement les neurones exprimant des DR2 (Day et al., 2006; Galvan and Wichmann, 2008).

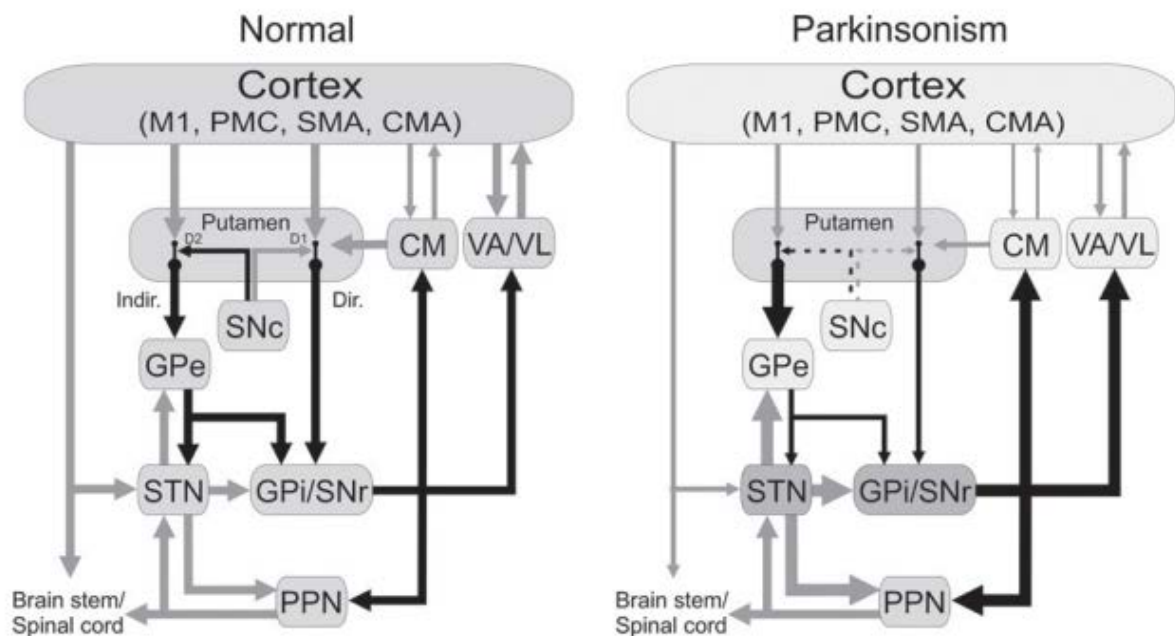


Figure 3 : Représentation schématique anato-fonctionnelle du circuit moteur des GB dans l'état normal et dans le cas de la MP.

A gauche, une représentation schématique de l'état normal du circuit moteur des GB qui implique aussi le cortex et le thalamus. A droite, le même circuit montrant les changements relatifs au parkinsonisme dans l'activité générale de la boucle cortex-GB-thalamus. Les flèches noires représentent les connexions inhibitrices et les grises représentent celles excitatrices. L'épaisseur des flèches correspond à leurs activités relatives. Abréviations : CM, Noyau Centro-médian du thalamus ; CMA, Cortex cingulaire moteur ; Dir., voie directe ; indir., voie indirecte ; D1 et D2, récepteurs dopaminergiques ; GPe, globus pallidus externe ; GPi, Globus Pallidus interne ; M1, cortex moteur primaire ; Pf, noyau parafasciculaire du thalamus ; PMC, Cortex prémoteur ; PPN, noyau pédonculopontin ; SMA, aire spoteur supplémentaire ; SNc, substance noire pars compacta ; SNr, substance noire pars réticulée ; STN, noyau sous-thalamique ; VA, noyau ventral antérieur du thalamis ; VL, noyau ventrolatéral du thalamus.

D'après (Galvan and Wichmann, 2008)

Le modèle classique anatomo-fonctionnel du circuit moteur (Albin et al., 1989) cité auparavant, permet aussi de décrire les changements dans la transmission nerveuse dans les GB, survenus suite à un dérèglement de l'équilibre entre la voie directe et la voie indirecte comme dans le cas de la MP (figure 4, côté droit). Selon ce modèle, dans la MP, la dégénérescence des neurones dopaminergiques provoque un déséquilibre entre les deux voies. Le manque d'activation des DR2 augmente l'inhibition qu'exerce le striatum sur le GPe, et donc augmente la levée de l'inhibition sur le NST, dont l'activité excessive des voies glutamatergiques excitatrices efférentes qui projettent sur le SNr/GPi renforce l'inhibition des structures de sorties des GB sur le thalamus. En même temps, la déplétion dopaminergique réduit l'activation des DR1 ce qui réduit l'inhibition exercée par le striatum sur la SNr/GPi. Le résultat de l'augmentation de l'activité des SNr/GPi, est une inhibition exagérée des neurones du thalamus moteur qui à son tour lève l'excitation sur le cortex moteur, ce qui est à l'origine de la bradykinésie (Albin et al., 1989; DeLong, 1990). Comme l'avait prédit ce modèle, l'inhibition du NST ou du GPi par lésion irréversible (Alvarez et al., 2005; Aziz et al., 1991; Bergman et al., 1990) ou par stimulation à haute fréquence (SHF) réversible (Benazzouz et al., 1993 ; Benazzouz et al., 1996) améliore de façon spectaculaire les signes moteurs de la MP chez le primate non-humain. Ces travaux étant à l'origine du transfert de la stimulation chronique aux patients parkinsoniens avec le grand succès connu actuellement (Limousin et al., 1995 ; 1998 ; Krack et al., 2003)

ii. L'activité électrique dans les ganglions de la base

Si des avancées ont été faites pour l'élaboration ainsi que la mise à jour du modèle expliquant le circuit des GB dans le cas normal et pathologique, c'est en partie grâce aux résultats des études électrophysiologiques qui ont permis de confirmer le modèle établi (Albin et al., 1989). Ces études, ont montré que la perte chronique des neurones dopaminergiques induit un changement significatif dans la fréquence de décharge des ganglions de la base spécialement dans les noyaux extra-striataux. En effet, les changements dans la fréquence de décharge du

striatum étaient difficilement identifiables, probablement à cause de l'hétérogénéité des populations des neurones striataux et aussi parce que la perte dopaminergique altère plutôt la transmission cortico-striatale que l'activité des neurones MSNs (Galvan and Wichmann, 2008). Les études examinant, la fréquence de décharge dans les ganglions de la base montrent que chez le singe MPTP, l'activité électrique augmente significativement dans le NST et le GPi et baisse dans le GPe (Bergman et al., 1994; Hassani et al., 1996; Raz et al., 1996; Soares et al., 2004). Ces résultats sont confirmés par des enregistrements électrophysiologiques chez des patients parkinsoniens, qui montrent le même type d'activité électrophysiologique (Benazzouz et al., 2002; Hutchison et al., 1998).

Si le modèle établi par Albin et al., (1989) a permis d'expliquer et de comprendre plusieurs interactions dans les GB, plusieurs études plus récentes ont montré que la situation est plus complexe que ce qu'il suggère. Par exemple, l'effet antiparkinsonien remarquable obtenu par la SHF du NST (Benazzouz et al., 1993), a été supposé empirer les symptômes moteurs, alors que dans la réalité, cette stimulation améliore spectaculairement les symptômes (Benazzouz and Hallett, 2000). Ces études montrent que ce modèle basé sur la fréquence de décharge, tout seul n'est pas suffisant pour comprendre l'apparition de la MP et que d'autres changements dans l'activité des GB y contribuent. Ces changements pourraient concerner le mode de décharge des neurones des différentes structures des ganglions de la base.

L'analyse du mode de décharge, consiste à déterminer l'occurrence des potentiels d'actions dans une durée déterminée. Cette analyse donne lieu généralement à une classification des neurones en fonction des modes régulier, irrégulier et en bouffées selon la répartition des potentiels d'action sur l'ensemble de l'activité électrophysiologique enregistrée. Que cela soit chez le singe MPTP (Bergman et al., 1994; Fillion, 1979; Soares et al., 2004; Wichmann and Soares, 2006) ou chez le rat 6-OHDA (Hassani et al., 1996; Ni et al., 2001a; Vila et al., 2000), plusieurs paramètres du mode de décharge en bouffée ont été significativement affectés dans

les GP et le NST. La proportion de neurones qui déchargent en bouffée, le pourcentage de temps passé en bouffées et la longueur des bouffées, sont tous des paramètres qui ont augmenté chez les modèles animaux de la MP, en comparaison avec les animaux contrôles chez qui la majorité des neurones sont caractérisés par un mode de décharge régulier comme le montre la figure 4. Le même constat a été fait chez les patients parkinsoniens, chez qui l'incidence du mode de décharge en bouffées est élevée (Benazzouz and Hallett, 2000; Magnin et al., 2000). Le mécanisme par lequel l'activité en bouffées se développe a été bien étudié. S'il est probable, que cette activité anormale est liée à la perte de la dopamine dans le striatum, elle est aussi très liée à sa perte dans d'autres noyaux extra-striataux comme le NST (Ni et al., 2001a). Alors que la dopamine agit localement en modulant les efférences striatales inhibitrices qui innervent le NST en les réduisant (Shen and Johnson, 2000; Tofighy et al., 2003), son absence impacte le synchronisme de ces efférences, et donne naissance à ce phénomène de mode de décharge en bouffées par les neurones du NST (Bevan et al., 2007; Shen and Johnson, 2005). Sachant que l'activation des DR2 normalise l'incidence de l'activité en bouffée des neurones du NST sur des tranches de NST obtenues à partir de cerveaux d'animaux avec des déplétions dopaminergiques (Zhu et al., 2002), il est clair que la dopamine module l'excitabilité des GB par une projection nigro-striatale dense, mais aussi par des projections vers les GPe et le NST. Les interactions entre le GPe et le NST pourraient aussi contribuer à l'apparition du mode de décharge en bouffées (Ni et al., 2000; Plenz and Kital, 1999). D'autres paramètres électrophysiologiques sont affectés dans l'activité électrique des neurones des GB chez les modèles animaux et les patients parkinsoniens, qui sont liés cette fois avec une activité oscillatoire anormale dans la gamme des fréquences alpha et beta, spécialement du NST (Galvan and Wichmann, 2008; Levy et al., 2002; Weinberger et al., 2006) qui avec les changements dans le mode de décharge constituent désormais un marqueur ou une caractéristique physiopathologique de la maladie. .

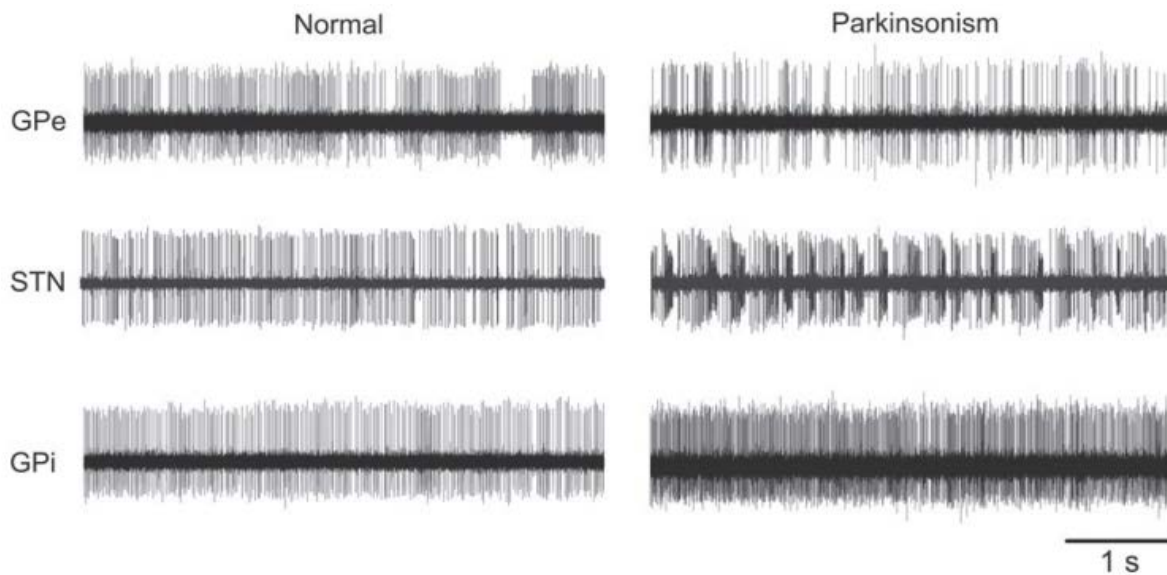


Figure 4 : Les changements rapportés dans l'activité unitaire extracellulaire des cellules dans le GPe, le NST et le GPi chez des singes normaux et des singes MPTP.

Les données représentent des exemples de neurones enregistrés séparément avec des méthodes d'enregistrement électrophysiologiques extracellulaires standards chez des singes normaux et parkinsoniens. Chaque segment est un enregistrement d'une durée de 5s.

D'après (Galvan and Wichmann, 2008)

3. Les systèmes monoaminergiques et la maladie de Parkinson

Comme il a été discuté auparavant, la MP est le résultat de déficience d'autres systèmes de neurotransmission monoaminergique en plus du système dopaminergique. Le développement des techniques de fluorescence histochimique (FALCK et al., 1962) et d'immunohistochimie (Fuxe et al., 1970) a permis de cartographier les voies monoaminergiques du tronc cérébrale au restant du système nerveux centrale (Fuxe et al., 2007).

i. Le système dopaminergique

La dopamine est une catécholamine qui agit en neuromodulateur dans le striatum et joue un rôle important et essentiel dans les fonctions motrices et cognitives ainsi que dans le processus de récompense. En effet, des sous-populations spécifiques ont été associées avec ces différentes fonctions : Les voies nigro-striée, méso-corticale et méso-limbique respectivement (Goldman-

Rakic, 1998; Sawaguchi, 1995; Wise, 2004; Wullner et al., 1994). La connaissance accumulée sur la transmission dopaminergique, viennent surtout des études qui ont été faites sur le système dopaminergique de la SNc et de l'aire tegmentale ventrale (VTA). Le premier est à l'origine de la voie nigro-striée où les neurones dopaminergiques de la SNc projettent vers le striatum dorsal jouant un rôle central dans le contrôle des fonctions motrices, alors que les neurones dopaminergiques de la VTA forment la voie méso-striatale et projettent plutôt vers le striatum ventral (noyau accumbens), jouant un rôle essentiel dans le mécanisme de récompense (Paille et al., 2010; Tritsch and Sabatini, 2012). La dopamine est dérivée de la L-tyrosine d'origine circulante. Afin de synthétiser la dopamine, la tyrosine est d'abord convertie en L-DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine) par la tyrosine hydroxylase, qui sera décarboxylée par la DOPA décarboxylase pour synthétiser la dopamine dans les neurones dopaminergiques (Kopin, 1968) (Figure 5). L'acide homovanillique (HVA) et l'acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC) constituent les produits des voies de dégradation de la dopamine constituant d'excellents indicateurs de l'activité métabolique des neurones dopaminergiques.

La substance noire a été initialement identifiée dans le dix-huitième siècle (Vicq D'Azyr F 1786). Le lien avec le système moteur a été établi beaucoup plus tard (Bremer, 1920; Brissaud, 1895; Hassler, 1939). Des études ultérieures ont montré que cette structure est composée de populations de cellules dopaminergiques et qu'elle est à l'origine de la voie nigro-striée (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Dans cette voie, la dopamine exerce son action dans le striatum en agissant sur les récepteurs dopaminergiques (DR) DR1 et DR2, modulant ainsi différemment les voies directe et indirecte du circuit des GB (Cf. voir chapitre ganglions de la base). Les DRs sont des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G (RCPG) composées d'une chaîne à sept domaines transmembranaires, dont l'activation aboutit à la formation d'un message secondaire et l'activation ou l'inhibition d'une cascade de signalisation intracellulaire. Cinq différents DRs existent, classés dans deux familles distinctes suivant la

nature et les propriétés pharmacologiques de la protéine G à laquelle ils sont couplés. Les DR1 (DR1 et DR5) qui sont couplés à la protéine Gs dont l'activation stimule la production d'Adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et les DR2 (DR2, DR3 et DR4) qui sont couplés à la protéine Gi dont l'activation inhibe la production d'AMPc (Gardoni and Bellone, 2015; Missale et al., 1998). La capacité des DR1 et DR2 à moduler dans les deux sens le niveau d'AMPc intracellulaire permet à la dopamine de jouer ce rôle central et essentiel de neuromodulateur qui permet de garder l'équilibre entre la voie directe et la voie indirecte du circuit des ganglions de la base, et en conséquence assurer le bon fonctionnement des fonctions motrices. L'expression et les voies de transduction du signal intracellulaire changent durant le processus neurodégénératif, aggravant ainsi les symptômes engendrés (Rangel-Barajas et al., 2015).

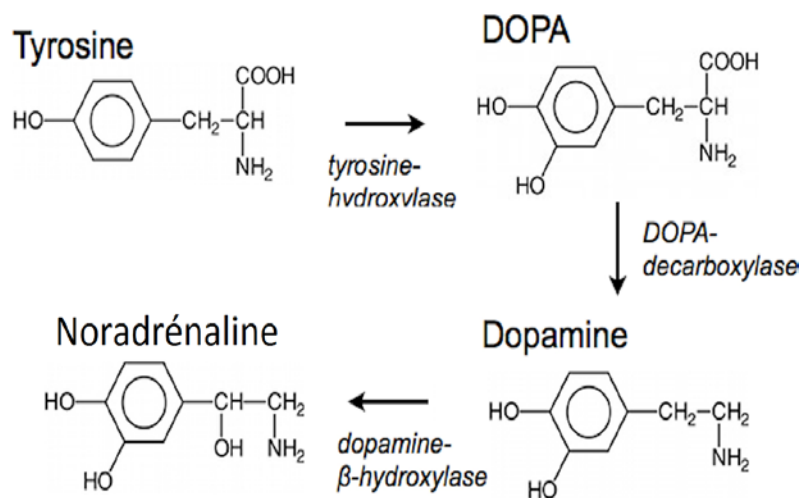


Figure 5 : Voie de synthèse de la dopamine et de la noradrénaline.

a) Rôle dans la maladie de Parkinson

Dans la MP, la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc et de leurs projections striatales est un processus lent et progressif qui peut prendre des décennies. En plus du déséquilibre des voies directe et indirecte du circuit des GB et les changements dans l'activité électrique neuronale (Cf. voir chapitre des ganglions de la base), cette dégénérescence cause

d'autres changements morphologiques secondaires importants. Un de ces changements est la réduction des épines dendritiques des MSNs, en particulier dans le putamen, ce qui affecte sévèrement la transmission cortico-striatale (Ingham et al., 1989; Villalba et al., 2009; Zaja-Milatovic et al., 2005). Les MSNs avec des récepteurs DR2 impliqués dans la voie indirecte sont préférentiellement affectés (Day et al., 2006).

La déplétion dopaminergique provoque aussi des changements dans la densité et la sensibilité des récepteurs dopaminergiques. L'expression des ARNm des récepteurs D2 dans le striatum est augmentée chez les patients parkinsoniens et les modèles animaux de la MP (Aubert et al., 2005; Bokobza et al., 1984; Creese et al., 1977; Lee et al., 2001; Lee et al., 1978; Marshall et al., 1989). Des changements avec une augmentation ou une réduction dans les récepteurs DR1 striataux ont été aussi reportés dans quelques études (Buonamici et al., 1986; Marshall et al., 1989) mais qui n'ont pas été relevés dans d'autres (Aubert et al., 2005; Bezard et al., 2001; Guigoni et al., 2005).

b) Rôle dans les rythmes circadiens

L'implication de la neurotransmission dopaminergique dans le système circadien a été montrée à plusieurs niveaux de ce processus. D'abord, dans la voie d'entrée photique vers le SCN, où dans la rétine, la dopamine joue un rôle important dans l'adaptation à la lumière (Witkovsky, 2004). Son rôle est essentiel dans la régulation de l'expression rythmique de la mélanopsine, un photopigment clé qui permet la sensibilité à la lumière des cellules ganglionnaires de la rétine et qui sont impliquées dans l'entraînement circadien (Sakamoto et al., 2005). Dans la rétine, les cellules amacrines dopaminergiques montrent un rythme circadien dans l'expression des gènes composant l'horloge moléculaire tels que *Per*, *Cry*, *Clock* et *Bmal1*. Cette expression rythmique qui semble être essentielle dans l'anticipation à des changements possibles dans la lumière environnementale et l'adaptation de la rétine pour une réponse optimale (Dorenbos et al., 2007). A ce niveau, il est vraisemblable que la dopamine agisse par le biais des récepteurs

DR4 (Jackson et al., 2011). Il a été aussi rapporté que la dopamine peut moduler la phase et l'amplitude de ces gènes par le biais des récepteurs DR1 dans la rétine (Ruan et al., 2008). En plus, une étude chez la drosophile a montré que la dopamine est aussi impliquée dans la détermination de la phase de sensibilité circadienne à la lumière faible, modulant ainsi la voie d'entrée photique vers le SCN (Hirsh et al., 2010). Dans le SCN, Les récepteurs dopaminergiques DR1 sont aussi présents chez le fœtus que chez l'adulte (Ishida et al., 2002; Weaver et al., 1992), quoique l'effet de la dopamine n'ait été constaté que chez le fœtus (Viswanathan et al., 1994). Chez l'adulte, aucune participation des récepteurs D1 dans la modulation de l'activité des neurones du SCN n'a été prouvée (Duffield et al., 1998).

Plusieurs éléments indiquent que les gènes horloges jouent un rôle dans le métabolisme dopaminergique. Par exemple, le gène *Clock*, un élément clé dans l'horloge circadienne moléculaire, régule l'activité dopaminergique dans la VTA et par conséquent le comportement locomoteur et le cycle veille/sommeil (Roybal et al., 2007; Tsujino and Sakurai, 2009). Des fluctuations circadiennes dans le niveau de dopamine extracellulaire ont été aussi rapportées dans le striatum et le noyau accumbens (Castaneda et al., 2004). Aussi, les régions "promoteurs" des gènes du transporteur DAT, des récepteurs DR1A et de la TH disposent d'un élément E-box qui est la cible des facteurs de transcription issus de l'horloge circadienne. En revanche, la dopamine, réagissant sur ses récepteurs DR1 et DR2 régule les gènes horloge dans le striatum dorsal (Hood et al., 2010; Imbesi et al., 2009). Des indices additionnels sur le rôle de la dopamine dans le système circadien viennent d'autres études qui ont montré la perturbation du rythme circadien du comportement locomoteur et de l'expression de *Per2* dans le striatum, suite à la lésion neurochimique des cellules dopaminergiques par la 6-OHDA (Gravotta et al., 2011). Ces altérations peuvent être partiellement renversées par l'administration de la L-DOPA (Boulamery et al., 2010). De ce fait, L'activité et le métabolisme dopaminergiques peuvent aussi être considérés comme un output de l'horloge circadienne. En effet, les fluctuations

rythmiques de la dopamine et de ses métabolites ont été décrites dans plusieurs régions du cerveau (Kafka et al., 1986). Particulièrement intéressant dans le contexte de la MP, le métabolisme de la dopamine montre un rythme circadien diurne dans les régions striatales ; ce rythme soutenu a été attribué aux variations cycliques de l'expression des transporteurs DATs, des récepteurs de la dopamine et du TH (McClung, 2007). La lésion du SCN a démontré que cette structure est au moins partiellement responsable des variations nyctémérales dans l'expression des protéines DAT et TH dans le noyau accumbens, le noyau caudé et du cortex médian préfrontal (Sleipness et al., 2007a). Le SCN est aussi responsable des variations nyctémérales du comportement de consommation de la cocaïne chez le rat (Sleipness et al., 2007b). A noter que les variations saisonnières de la dopamine chez l'humain ont été rapportées bien que leur importance et leurs implications ne sont pas bien élucidés (Eisenberg et al., 2010).

ii. Le système noradrénergique

On peut distinguer deux différents systèmes noradrénergiques, le premier est composé des neurones des noyaux A1/C1 de la medulla oblongata, alors que le deuxième est plus rostral, composé des noyaux A2/C2 localisés dans le Pons. Ce groupe de cellules correspond au LC (Dahlstrom and Fuxe, 1964; Smeets and Gonzalez, 2000) (Voir Castelino and Schmidt, (2010) pour revue). Cette structure, présente chez tous les mammifères représente la source principale de la noradrénaline dans le système nerveux central (Mann and Yates, 1983). Le système noradrénergique du LC a un rôle central dans l'éveil, l'attention et les réactions au stress. Dans le cerveau, la noradrénaline peut aussi contribuer entre autres à la plasticité synaptique à long-terme, la modulation de la douleur et le contrôle moteur. Ce système est sévèrement affecté dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et la MP, alors que sa dérégulation induit parmi d'autres dysfonctionnements des troubles du cycle veille/sommeil (Aston-Jones and Cohen, 2005; Benarroch, 2009a). Tout comme la dopamine dans la SNc, la

noradrénaline est dérivée de la tyrosine et suit la même voie de biosynthèse dans les neurones du LC et est convertie à partir de la dopamine par la dopamine β -hydroxylase.

La noradrénaline exerce son action via deux types de récepteurs adrénergique couplés à la protéine G : Alpha ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) et Beta ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$). Ces récepteurs sont largement répandus dans le cerveau, permettant ainsi à la noradrénaline de moduler les processus tels que: la transmission synaptique, le changement du potentiel de la membrane, l'excitabilité des neurones et la plasticité synaptique (Castelino and Schmidt, 2010).

Le LC est la cible de plusieurs projections synaptiques qui influencent son activité et il est lui-même la source de plusieurs projections qui modulent différents circuits corticaux, sous-corticaux et du tronc cérébral. Les études par traçage rétrograde et antérograde ont permis d'identifier les nombreuses connections afférentes et efférentes du LC (Benarroch, 2009a; Delaville et al., 2011; Singewald and Philippu, 1998).

a) Rôle dans la maladie de Parkinson

Le LC est souvent sévèrement affecté dans les maladies neurodégénératives (Saper et al., 1991) et plusieurs études anatomiques et biochimiques ont souligné ce constat dans la MP. En effet, une déplétion significative de plus de 80% en noradrénaline a été décrite dans le cerveau des patients parkinsoniens (Gaspar et al., 1991; Jenner et al., 1983; Taquet et al., 1982) en conséquence d'une lésion sévère des corps cellulaires noradrénergiques (Charara and Parent, 1994). A noter que cette diminution induit plusieurs changements d'ordre morphologiques qui affectent différents acteurs de la neurotransmission noradrénergique ainsi que sa voie métabolique (Baloyannis et al., 2006; Chan-Palay and Asan, 1989; Dailly et al., 2006; Marie et al., 1995; Remy et al., 2005).

Dans la plupart des modèles animaux qui ont été développés pour étudier la MP, l'attention a été portée surtout sur le système dopaminergique, alors que l'altération du système

noradrénergique, aussi typique dans la maladie, a été négligée pendant longtemps. Par exemple, même dans le modèle 6-OHDA qui lèse aussi les neurones noradrénergiques, la désipramine est souvent utilisée pour les protéger. Les données disponibles des quelques études expérimentales qui ont exploité ce sujet montrent que l'altération du système noradrénergique du LC serait impliquée dans les symptômes moteurs et non-moteurs de la MP et que sa lésion pourrait intensifier l'action de la lésion dopaminergique seule. Finalement, ces études montrent que le système noradrénergique du LC pourrait être aussi une cible thérapeutique de la maladie (Chaudhuri and Odin, 2010; Delaville et al., 2011; Hill and Brotchie, 1999; Narabayashi et al., 1991). Parmi ces symptômes la noradrénaline est particulièrement impliquée dans l'anxiété et la dépression (Delaville et al., 2012 ;Tadaiesky et al., 2008).

b) Rôle dans les rythmes circadiens

L'augmentation du délai d'endormissement, la diminution du maintien du sommeil, le sommeil fragmenté et la somnolence diurne excessive, sont tous des symptômes non-moteurs de la MP, qui pèsent lourd dans la qualité de vie des patients (Bruin et al., 2012). A travers sa fonction d'horloge biologique, le SCN assure l'organisation temporelle du cycle veille/sommeil, parmi d'autres cycles physiologiques (Aston-Jones et al., 2001; Zeitzer, 2013). Des travaux récents indiquent que le système noradrénergique du LC, est fortement impliqué dans la régulation rythmique de ce cycle (Aston-Jones et al., 2001). L'activité électrique des neurones de cette structure varie avec les stades de l'éveil et du sommeil. Ils sont plus actifs durant l'éveil et moins actifs pendant le sommeil lent et quasiment silencieux durant le sommeil paradoxal (REM) (Aston-Jones and Bloom, 1981; Hobson et al., 1975). Ce schéma suggère qu'il y a une modulation de l'activité du LC par le SCN, pour produire des fluctuations circadiennes dans le sommeil, l'éveil et les performances cognitives. Même si des projections directes depuis le SCN n'ont jamais été rapportées, une innervation indirecte par le biais du noyau hypothalamique dorsomédian (DMH) a été proposée par des techniques de traçage rétrograde chez des modèles

de rats et de primates non humains (Aston-Jones et al., 2001; Deurveilher and Semba, 2005). La rythmicité circadienne du LC dépend largement du DMH comme le montre la lésion de ce dernier (Aston-Jones et al., 2001).

Les systèmes physiologiques qui reçoivent une régulation circadienne du SCN ont souvent des afférences qui modifient l'activité du SCN par feed-back (Morin, 2013; Willison et al., 2013). Par exemple, il a été montré que l'état du cycle veille/sommeil influence l'activité du SCN (Deboer et al., 2007; Deboer et al., 2003; Houben et al., 2009). Ce feed-back a été aussi constaté pour le comportement moteur (Schaap and Meijer, 2001; Yamazaki et al., 1998). Bien que quelques projections en provenance du LC ont été identifiées dans le SCN, l'innervation par ce dernier par les neurones noradrénergiques du LC reste négligeable (Moga and Moore, 1997). Dans le cas du cycle veille/sommeil, il est plus probable que ce feed-back emprunte une voie indirecte, passant par le biais de l'IGL connu pour son rôle dans l'entraînement non photique de l'horloge circadienne (Cf. voir chapitre IGL). Des travaux qui ont identifié des projections du LC vers le IGL ont donné plus de crédibilité à cette hypothèse (Morin and Blanchard, 2005).

iii. Le système sérotoninergique

La sérotonine a été initialement identifiée dans les années trente (Erspamer V, 1937; Whitaker-Azmitia, 1999), deux décennies avant la découverte de sa présence dans le cerveau (Twarog and Page, 1953). Depuis, la connaissance relative à la sérotonine a considérablement avancé et il est maintenant bien établi qu'elle est impliquée dans plusieurs fonctions dans le cerveau telles que la cognition, l'émotion, la thermorégulation, les comportements alimentaires et sexuels, le cycle veille/sommeil, la nociception, l'anxiété, le comportement moteur et la régulation des rythmes circadiens (Benarroch, 2009b; Berger et al., 2009; Gerson and Baldessarini, 1980; Morin, 1999). Dans le cerveau, les corps cellulaires sérotoninergiques sont localisés dans les noyaux du Raphé du tronc cérébral (Dahlstroem and Fuxe, 1964; Hillarp et al., 1966; Parent et al., 1981; Saavedra, 1977). En dépit de leur relative petite taille, les noyaux du Raphé ont des

projections très vastes et innervent l'ensemble du système nerveux central, y compris l'innervation par le Raphé dorsal des neurones de la substance noire (Dray et al., 1976; Imai et al., 1986; Lavoie and Parent, 1990), du striatum (Miller et al., 1975; Pasik and Pasik, 1982; Steinbusch et al., 1980; van der Kooy and Hattori, 1980), du GP (Charara and Parent, 1994; Lavoie and Parent, 1990), du NST (Lavoie and Parent, 1990; Mori et al., 1985), du thalamus (Moore et al., 1978) et du cortex (Bobillier et al., 1976; Seguela et al., 1989) qui sont les composants majeurs de la boucle cortex-ganglions de la base-thalamus-cortex (Parent and Hazrati, 1995a; Parent and Hazrati, 1995b) dont la physiologie est perturbée lors de la MP (DeLong and Wichmann, 2007) (Cf. voir chapitres GB et MP).

a) Rôle dans la maladie de Parkinson

Le système sérotoninergique est affecté dans la MP et plusieurs études ont montré qu'il y a une perte neuronale dans les noyaux du Raphé (Halliday et al., 1990a; Halliday et al., 1990b; Paulus and Jellinger, 1991) ainsi qu'une accumulation des corps de Lewy (Mann and Yates, 1983; Ohama and Ikuta, 1976) dans ces neurones. D'après les stades de Braak, la MP commence à affecter les noyaux du Raphé dans le stade 2, qui deviennent complètement impliqués dans le stade 3 (Braak et al., 2003; Braak et al., 2004). Ainsi la perte neuronale sérotoninergique précède celle des neurones dopaminergiques et pourrait contribuer à certains symptômes pré-moteurs tels que la dépression (Huot and Fox, 2013). En effet, la perte neuronale dans le noyau raphé dorsal (DRN) semble plus sévère chez les patients parkinsoniens dépressifs que chez les non dépressifs, mais aucune différence n'a été rapportée dans les comparaisons pareilles concernant la démence, la psychose, la rigidité ou le tremblement (Frisina et al., 2009; Paulus and Jellinger, 1991).

En conséquence de la dégénérescence des neurones des noyaux du Raphé, le niveau de la sérotonine est réduit, parfois, par plus de 85% dans le striatum, le GP et la SN (Fahn et al., 1971; Kish et al., 2008; Raisman et al., 1986; Scatton et al., 1983; Wilson et al., 1996). Le

noyau caudé semble plus dénervé que le putamen (Kish et al., 2008; Wilson et al., 1996), contrairement à la dénervation dopaminergique du striatum qui apparaît affecter plus sévèrement le putamen que le noyau caudé (Fahn et al., 1971).

La voie de transmission sérotoninergique met à contribution différents sous-types de récepteurs pre- ou post-synaptiques, distribués partout dans le cerveau et le système nerveux périphérique. Parmi ces récepteurs, les plus impliqués dans la MP et le processus moteur sont les récepteurs 5-HT_{2a}, 5-HT_{1b} et 5-HT_{2a/c} (Nicholson and Brotchie, 2002).

b) Rôle dans les rythmes circadiens

Les réseaux neuronaux qui impliquent les systèmes circadien et sérotoninergique constituent deux des principaux réseaux de signalisation régulateurs du système nerveux central. Les deux influencent considérablement de multiples centres neuronaux pour exercer leurs actions et montrent des connections anatomiques réciproques. Les cellules du SCN expriment plusieurs sous-types de récepteurs sérotoninergiques (Morin and Allen, 2006; Pickard and Rea, 1997 pour revue). Initialement, on pensait que le raphé dorsal est la source de cette innervation par les fibres sérotoninergiques (Azmitia and Segal, 1978; Smale et al., 1990). Les études anatomiques ultérieures qui ont utilisé trois méthodes différentes (les traçages antéro et rétrograde des projections du Raphé et les travaux de lésions de ces projections), ont établi sans équivoque, que c'est le raphé médian qui constitue la source principale de la sérotonine qui innerve le SCN. Le raphé médian projette des fibres sérotoninergiques en direction du SCN, alors que le raphé dorsal projette surtout vers l'IGL, qui par son biais la sérotonine exerce une innervation indirecte sur le SCN en contrôlant la NPY de l'IGL (Hay-Schmidt et al., 2003; Meyer-Bernstein and Morin, 1996; Moga and Moore, 1997). A travers cette innervation directe et indirecte, la sérotonine module la réponse du système circadien à la lumière (Smith et al., 2001), elle intervient aussi comme intermédiaire dans la modification, par les centres d'éveil et le feedback du comportement locomoteur, de la phase et de la période de l'horloge centrale

(Edgar et al., 1991; Edgar et al., 1993; Mistlberger et al., 1998; Prosser et al., 1993; Smith et al., 2001). En effet, la sérotonine, agit aussi bien au niveau pré-synaptique sur les terminaisons des afférences rétiniennes, qu'au niveau post-synaptique sur les neurones du SCN pour inhiber l'innervation qu'exerce la rétine sur l'horloge centrale (Pickard et al., 1999; Quintero and McMahon, 1999; Smith et al., 2001). L'action de la sérotonine se fait essentiellement à travers six sous-types de récepteurs sérotoninergiques dont l'expression a été rapportée dans le SCN : 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A, 5-HT2C, 5-HT5A et 5-HT7 (Morin and Allen, 2006 pour revue).

4. Les rythmes circadiens et maladie de parkinson

En addition de la substance noire, d'autres structures cérébrales sont affectées dans la MP, notamment, le LC et le RN. Le début de la dégénérescence des neurones de ces structures est probablement antérieur à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc (Braak et al., 2003), et sont à l'origine de plusieurs symptômes non-moteurs observés dans la maladie. C'est que récemment que les caractéristiques non-moteurs de la maladie commencent à bénéficier de plus d'importance et être la cible d'interventions thérapeutiques (Wulff et al., 2010), bien que plusieurs études suggèrent que ces symptômes non-moteurs ont un impact plus sévère sur la qualité de vie des patients que les symptômes moteurs (Aarsland et al., 2005; Karlsen et al., 1999; Shulman et al., 2001). Les troubles de sommeil, initialement rapportés par James Parkinson (Parkinson, 1817) constituent un des symptômes non-moteurs les plus saisissants. C'est que récemment que ces dysfonctionnements du sommeil ont reçu plus d'attention de la communauté médicale et scientifique.

i. Définition et propriétés des rythmes circadiens

Les processus biologiques manifestent un rythme journalier qui permet aux organismes d'exploiter les niches temporelles dans leurs environnements et coordonner les processus physiologiques pour optimiser l'efficacité du métabolisme. Cette fonction est conservée chez

la grande majorité des organismes vivants de la cyanobactérie aux Mammifères (Pittendrigh, 1993). Ces organismes possèdent des dispositifs mesurant le temps qui leur permettent d'anticiper le jour et par conséquent organiser leurs physiologies et leurs comportements de façon dynamique. Ces dispositifs sont les horloges circadiennes, qui comme leur nom l'indique sont ajustées à 24h par différents facteurs dont le facteur le plus fort est l'alternance lumière/obscurité. Chez un organisme isolé sans aucun repère temporel, l'expression de ces rythmes perdure et continue de présenter une période proche de 24h, ce qui constitue une propriété fondamentale des rythmes circadiens, qui montrent qu'ils sont de nature endogène (Aschoff, 1984). Le fait que ces rythmes sont ajustés sur 24h par l'alternance du jour/nuit et/ou par d'autres facteurs non photiques comme la température ou la prise alimentaire, constitue une autre caractéristique fondamentale des rythmes qu'est le phénomène d'entraînement (Morin, 1994).

Pour pouvoir considérer une structure donnée comme une horloge circadienne, elle doit générer un rythme intrinsèque (Endogène), être capable de recevoir les afférences photiques et les intégrer afin qu'elle puisse être remise à l'heure et générer un message circadien. Elle doit aussi être capable de distribuer ce message circadien dans tout le corps. Finalement, la lésion de cette structure doit abolir les rythmes physiologiques. Chez les mammifères l'horloge principale est située dans les noyaux SCN de l'hypothalamus.

ii. Le noyau suprachiasmatique (SCN) :

Initialement, les rythmes circadiens étaient considérés comme une propriété diffusible de l'organisme dans son ensemble pour mesurer le temps, jusqu'à ce que Pittendrigh (Pittendrigh, 1960) développe l'idée qu'il y a un oscillateur sensible à la lumière qui sert de pacemaker à l'organisme. Les expérimentations de lésions dans le cerveau ont permis d'identifier une structure de l'hypothalamus qui semblait jouer un rôle important dans la rythmicité de la sécrétion de la corticostérone et de l'activité locomotrice (Moore and Eichler, 1972; Stephan

and Zucker, 1972), il s'agit du SCN. La transplantation du SCN prélevé sur tissu foetal, dans le troisième ventricule d'hamsters ayant subis précédemment une lésion du SCN restaure la rythmicité circadienne de l'activité locomotrice chez ces animaux (Lehman et al., 1987). En plus, cette rythmicité restaurée garde les propriétés du donneur (Ralph et al., 1990). C'est la même conclusion tirée lorsque la transplantation de tissu du SCN restaure les rythmes circadiens chez des souris génétiquement arithmétiques (Sujino et al., 2003). Ces expérimentations montrent que le SCN joue un rôle prééminent dans la rythmicité circadienne. Quand l'activité électrique des neurones d'un îlot hypothalamique contenant le SCN (Inouye and Kawamura, 1979) ou à partir de culture de ses neurones *in vitro*, a été mesurée, sa fréquence suivait un rythme circadien (Green and Gillette, 1982; Shibata et al., 1982) qui peut être maintenu même après trois semaines de culture (Bos and Mirmiran, 1990). De plus, même des neurones individuels du SCN montrent une fréquence de décharge rythmique (Welsh et al., 1995). A cela s'ajoute, l'observation de la rythmicité dans l'activité métabolique et de consommation du glucose dans le SCN (Schwartz and Gainer, 1977) ainsi que dans l'expression des gènes horloges (Sun et al., 1997; Tei et al., 1997) et des protéines (Hastings et al., 1999). Ces travaux illustrent l'activité de cette horloge qu'est le SCN au niveau moléculaire et physiologique.

En se basant sur ces observations, il est légitime d'affirmer que le SCN est l'horloge principale du système circadien (Green and Gillette, 1982; Inouye and Kawamura, 1979; Ralph et al., 1990; Stephan and Zucker, 1972), ses neurones constituent un relais pour transmettre l'information externe de l'environnement aux différentes structures de l'organisme qui intègrent cette information et renvoient le signal adéquat aux tissus appropriés. Ceci permet à la physiologie de l'organisme de s'adapter aux changements de l'environnement.

Il est rapporté dans la littérature que la morphologie des SCN est différente d'une espèce à l'autre (Morin et al., 2006), et que la compréhension de cette morphologie est essentielle pour

comprendre l'anatomie fonctionnelle de ces noyaux chez une espèce donnée (Morin, 2013). Dans cette introduction, nous allons nous concentrer sur les études réalisées chez le rat, dans un premier temps avec une description brève de l'organisation anatomique des SCN, puis avec une présentation de la distribution neurochimique au sein de ces noyaux.

a) Anatomie du noyau suprachiasmatique :

Les SCN sont une paire de noyaux hypothalamiques, formés de neurones de petits diamètres (7-10 μm) densément compactés au nombre de 8000 à 10000 qui sont localisés latéralement de part et d'autre du troisième ventricule, juste au-dessus du chiasma optique. Rostro-caudalement, le SCN a une forme ovale avec un diamètre moyen de 300-400 μm et de longueur moyenne de 700-900 μm (Van den Pol, 1980). Généralement, les études anatomiques divisent le SCN en deux subdivisions : Une région ventro-latérale (*Le core*) et une région dorso-médiane (*Le shell*) (Voir figure 6) (Golombek and Rosenstein, 2010; Moore and Silver, 1998). Les neurones de la région ventro-latérale agissent comme intégrateur de l'information externe reçue des trois voies majeures : Le tractus retino-hypothalamique (RHT, Retino-hypothalamic tract), le tractus géniculo-hypothalamique (GHT, Geniculo-hypothalamic tract) du thalamus et plus précisément l'IGL (Integeniculate leaflet) et les projections du noyau Raphé (Morin and Allen, 2006). Ces neurones du *core* propagent cette information au reste du SCN. Par contre, les neurones du *shell*, en se basant sur les informations, principalement reçues de la zone *core*, génèrent un signal circadien robuste qui sera transmis au reste du SCN et de l'organisme et notamment les horloges périphériques (Hamada et al., 2004; Yan and Okamura, 2002). Ce constat est approuvé par le fait qu'il y a beaucoup de projections de la zone *core* qui ont des terminaisons dans la zone *shell* (Antle and Silver, 2005). En effet, le message circadien élaboré du SCN est transmis majoritairement dans les régions hypothalamiques voisines (Abrahamson and Moore, 2001). Ces noyaux hypothalamiques voisins constituent un relais qui projette sur les systèmes nerveux et endocrine, fournissant plusieurs voies par lesquelles le SCN peut distribuer l'information

temporelle au reste du cerveau et du corps (Deurveilher and Semba, 2005; Kalsbeek et al., 2006).

b) Distribution neurochimique

Si les premières études qui ont adopté la division morphologique du SCN en *core* ventro-latérale et *shell* dorso-médiane, se sont basées sur la distinction entre les zones qui reçoivent plus ou moins d'innervations rétinales, il s'est avéré plus tard, que ces deux zones correspondent aussi à deux régions avec des phénotypes de populations cellulaires différents (Moore, 1996). Cette subdivision a été démontrée chez le rat (Moore et al., 2002) comme chez l'humain (Mai et al., 1991) mais aussi chez d'autres espèces (Abrahamson and Moore, 2001; Card and Moore, 1984). Donc, les différences morphologiques et neurochimiques qui existent entre les régions *core* et *shell* suggèrent que ces deux régions jouent des rôles différents dans la génération et la régulation de la rythmicité circadienne.

En effet, la majorité des neurones de la région *shell* synthétisent la Vasopressine (VP) (Swaab et al., 1975; van den Pol and Tsujimoto, 1985) dont l'expression est circadienne (Dardente et al., 2004; Uhl and Reppert, 1986), alors que ceux de la région *core*, apparaissent plutôt positifs pour le polypeptide vasoactif intestinal (VIP, Vasoactive intestinal polypeptide) (Card et al., 1981; Card et al., 1988; Sims et al., 1980) qui s'exprime selon un rythme jour/nuit sans que cette rythmicité soit circadienne (Isobe and Nishino, 1996; Shinohara et al., 1993) et le peptide de sécrétion de la gastrine (GRP, Gastrin Releasing Peptide) (Voir figure 6) (Mikkelsen et al., 1991). Plusieurs autres classes de neurones ont été également identifiées pour être positif pour un ou plusieurs neuropeptides, notamment la substance P (SP) (Mikkelsen and Larsen, 1993), l'enképhaline (ENK) (Sakanaka et al., 1990), la somatostatine (SS) (Card et al., 1988) et d'autres moins abondants, détaillés dans (Morin and Allen, 2006).

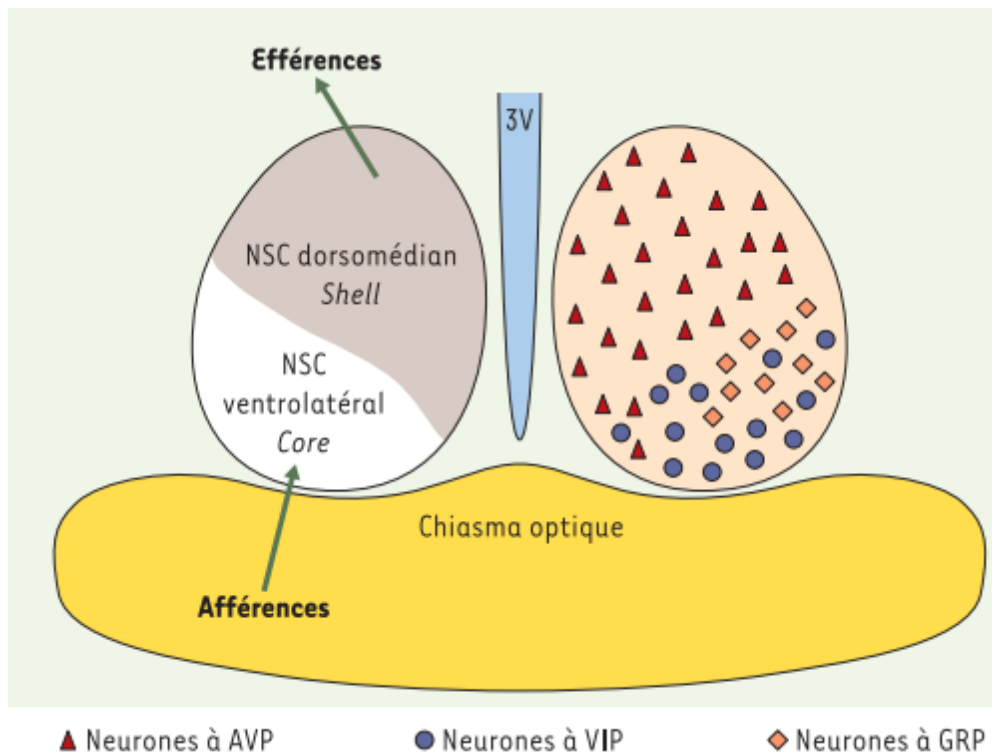


Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation morpho-fonctionnelle et neurochimique des SCN.

Les SCN sont une structure paire située dans l'hypothalamus, au-dessus du chiasma optique et de part et d'autre du 3V. On distingue, d'après leur phénotype neuropeptidique, différents types de neurones (à droite): à AVP, à VIP et à GRP. Ces types cellulaires sont distribués de façon dissymétrique dans les SCN et permettent de définir une partie dorsomédiane (shell) et une partie ventrolatérale (core) (à gauche). Cette distinction est retrouvée sur le plan de l'organisation fonctionnelle des SCN: le core reçoit les afférences (photiques et non photiques), alors que du shell est à l'origine de la majorité des projections. Abréviations : 3V, troisième ventricule ; AVP, vasopressine ; VIP, peptide vasoactif intestinal ; GRP, à peptide libérant la gastrine.

D'après (Dardente and Cermakian, 2005)

Il est à noter que plusieurs neuropeptides colocalisent dans les neurones du SCN : le VP colocalise avec l'ENK (Sakanaka et al., 1990), le VIP avec le GRP (van Esseveldt et al., 2000) et plusieurs études suggèrent que l'ensemble des neurones contiennent du GABA qui de ce fait colocalise avec tous les neuropeptides cités auparavant (Abrahamson and Moore, 2001; Moore and Speh, 1993; Morin and Blanchard, 2001). Une étude immunohistochimique propose cependant que seulement 40 à 70% des neurones du SCN contiennent du GABA (Castel and Morris, 2000). D'autres études montrent que les cellules du SCN synthétisent du glutamate (Hermes et al., 1996; Isobe and Nishihara, 2002; Perreau-Lenz et al., 2003). L'abondance du

GABA et de ses récepteurs au niveau du SCN, montre qu'il joue un rôle essentiel dans le fonctionnement du système circadien.

iii. SCN : synchronisation physiologique

Dans la situation normale, l'exposition à une alternance de lumière et d'obscurité sur une période de 24h, aligne ou entraîne les rythmes biologiques à l'heure environnementale. Cet entrainement se fait au niveau du SCN qui reçoit l'information photique et non photique, élabore et distribue le message circadien

a) Afférences

Comme il a été mentionné précédemment dans ce manuscrit, le SCN peut être influencé par trois voies d'entrée majeures : Le RHT depuis la rétine, le GHT depuis l'IGL et les projections sérotoninergiques en provenance directement du noyau raphé médian (MRN) et indirectement du DRN (Voir Figure 7). Parmi ces trois voies, le RHT est responsable de la transmission de l'information photique, alors que le GHT et le noyau Raphé transmettent l'information photique et non photique au SCN.

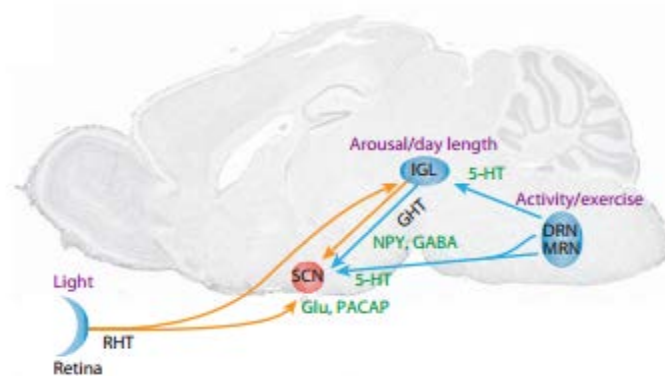


Figure 7 : Une représentation schématique des voies afférentes majeures du SCN.

Les flèches oranges représentent les afférences photiques, alors que les flèches bleues représentent les afférences non photiques du SCN. Le SCN reçoit des afférences photiques de la rétine, des afférences non photiques du noyau raphé et des afférences photiques et non photiques de l'IGL. Abréviations : DRN, Noyau raphé dorsal ; MRN, noyau raphé médiane ; IGL, Feuillet intergénéral latéral du thalamus ; GABA, Acide γ -aminobutyrique ; GHT, tractus géniculohypothalamique ; Glu, glutamate ; NPY, neuropeptide Y ; PACAP, polypeptide activant l'adénylate cyclase pituitaire ; RHT, le tractus rétinothalamique ; SCN, le noyau suprachiasmatique.

D'après (Dibner et al., 2010)

A. Le tractus rétino-hypothalamique (RHT) :

Les mammifères perçoivent l'information photique essentiellement à partir de la rétine, grâce à des photorécepteurs non visuels appelés les cellules ganglionnaire rétinienne sensibles à la lumière (pRGC, photosensitive retinal ganglion cells) (Berson et al., 2002; Moore et al., 1995; Provencio et al., 1998). Ces cellules synthétisant un photopigment appelé la mélanopsine (Panda et al., 2002), envoient l'information photique directement au SCN par le biais du RHT (Moore and Lenn, 1972). Les fibres monosynaptiques du RHT, ont leurs terminaisons directement dans la partie ventro-latérale du SCN (Ibata et al., 1989; Tanaka et al., 1993), cette partie ou le *core* abrite particulièrement les neurones sensibles à la lumière, (Cui and Dyball, 1996; Jiang et al., 1997; Kim and Dudek, 1993; Meijer et al., 1986) et où l'expression des récepteurs de molécules impliquées dans cette innervation a été montrée (Colwell et al., 1990; Hannibal et al., 2002; Mintz et al., 1999). Il s'agit du neurotransmetteur excitateur glutamate (Castel et al., 1993) et du polypeptide activant l'adénylate cyclase pituitaire (PACAP, Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Protein) (Hannibal et al., 1998), qui sont libérés à la suite d'une stimulation lumineuse (Fukuhara et al., 1997; Liou et al., 1986a).

A noter que le RHT projette aussi sur des structures hypothalamique assez proche du SCN, ces structures sont recensées dans (Morin, 2013), et certaines à leurs tours envoient des afférences en direction du SCN ou de l'IGL, ce qui montre que l'organisation et le fonctionnement du RHT est beaucoup plus complexe que ce qu'avaient imaginé les auteurs des études initiales sur le tractus, qui le voyait comme une simple projection de la rétine au SCN (Hendrickson et al., 1972; Moore and Lenn, 1972).

B. Le tractus géniculo-hypothalamique (GHT) :

Les fibres du RHT, projettent également sur d'autres structures du thalamus (Johnson et al., 1988). Parmi ces structures, il y a une qui est particulièrement impliquée dans le système circadien, les feuillets intergénéculés latéraux du thalamus (IGL, intergeniculate leaflet) (Pickard, 1985). Cette structure est la source des projections qui constituent la deuxième voie afférente majeure au SCN (Moore and Speh, 1993), reçoit aussi des afférences provenant d'autres structures notamment, la rétine (Hickey and Spear, 1976; Lima et al., 2012), le DRN (Meyer-Bernstein and Morin, 1996), le LC (Morin, 2013), les centres visuels comme le pretectum (Morin and Blanchard, 1998), plusieurs structures hypothalamique comme par exemple l'aire retro-chiasmatique (Card and Moore, 1989) ainsi que les structures limbiques comme par exemple le cortex préfrontal (Morin and Blanchard, 1999).

L'afférence majeure de l'IGL est le GHT. Les fibres qui composent ce tractus utilisent principalement le GABA, le neuropeptide Y (NPY) (Moore and Card, 1994). Ces fibres contactent synaptiquement les neurones du *core* du SCN qui contiennent le VIP (Francois-Bellan and Bosler, 1992; Hisano et al., 1988) et leurs terminaisons sont rares dans la région du *shell* (Card and Moore, 1989; Morin and Allen, 2006). L'IGL constitue une structure fortement impliquée dans l'entraînement non photique de l'horloge (Biello, 1995; van Esseveldt et al., 2000).

C. La voie sérotoninergique :

La troisième voie afférente au SCN, est en provenance du MRN chez le rat (Azmitia and Segal, 1978; Hay-Schmidt et al., 2003), et le hamster (Leander et al., 1998). Des études ont montré qu'il y a des projections de faible densité en direction du SCN, issues principalement des populations cellulaires latérales du DRN (Kawano et al., 1996; Moga and Moore, 1997), qui à leur tour reçoivent des projections de la rétine (Fite et al., 1999; Shen and Semba, 1994) formant ainsi une voie de transmission de l'information photique au SCN par le biais du DRN.

Les fibres sérotoninergiques en provenance du DRN ou du MRN ont leurs terminaisons dans l'ensemble du SCN, mais elles sont plus denses dans le *core* où on trouve juste des cellules contenant le VIP (Bosler and Beaudet, 1985; Kiss et al., 1984; Meyer-Bernstein and Morin, 1996), région qui reçoit aussi les projections provenant des cellules ganglionnaires de la rétine (van den Pol and Tsujimoto, 1985) et de l'IGL (Francois-Bellan and Bosler, 1992; Hisano et al., 1988). Ceci montre encore que cette région rétinorecipient constitue le siège de la régulation de l'activité circadienne et de son entrainement. Il est largement admis, que le tractus sérotoninergique participe à la régulation photique et non photique du SCN et à l'entrainement de l'horloge circadienne (Morin, 1999).

D. Autres afférences au SCN

Le SCN reçoit d'autres afférences additionnelles qui sont moins denses, mais probablement susceptibles de jouer un rôle dans l'entrainement des rythmes circadiens. Les exemples étant multiples, seuls quelques-uns seront évoqués dans ce manuscrit.

Des projections en provenance du noyau paraventriculaire du thalamus (PVT), innervent les deux subdivisions du SCN, la région ventro-latérale aussi bien que la région dorso-médiane. Le PVT est activé par différentes stimulation comme le stress (Chastrette et al., 1991) et la douleur (Senba et al., 1993). En outre, le SCN reçoit plusieurs projections de différentes zones de l'hypothalamus notamment, la zone subparaventriculaire, le noyau dorsomedian, l'aire hypothalamique latérale, le noyau paraventriculaire, le noyau paraventriculaire postérieure, le noyau ventro-médial et le noyau arqué (Arcuate nucleus) (Moga and Moore, 1997). Ces projections de faible densité innervent essentiellement la partie dorso-médiane du SCN et leurs rôles restent mal élucidés.

L'acétylcholine influence à son tour les neurones du SCN, puisque l'existence de récepteurs cholinergiques a été décrite (van der Zee et al., 1991) et des contacts directs entre le SCN et les

afférences cholinergiques ont été montrés (Kiss and Halasz, 1996). Cette voie d'afférence semble agir sur l'entraînement photique du SCN (Erhardt et al., 2004).

b) Elaboration du message circadien

La rapide évolution de la biologie moléculaire et les outils qu'elle offre, a donné lieu à de nouvelles approches pour étudier le mécanisme sous-jacent de l'horloge circadienne. La persistance du rythme circadien de l'activité électrophysiologique dans des cellules du SCN isolées (Welsh et al., 1995), ajoutée au fait que le message circadien n'est pas aboli après traitement à la tetrodotoxine (Earnest et al., 1991; Schwartz et al., 1987) et que des cellules du SCN immortalisées gardent leurs propriétés à générer une activité métabolique circadienne (Earnest et al., 1999), indiquent que l'horloge circadienne est d'origine moléculaire. L'identification des gènes responsables de la rythmicité circadienne (gènes clock) a été d'abord faite chez la drosophile (Bargiello and Young, 1984) avant l'identification de leurs homologues chez les Mammifères (Sangoram et al., 1998; Sun et al., 1997; Tei et al., 1997). En fait, le fonctionnement de l'horloge repose sur des boucles rétroactives autorégulées au niveau de la transcription et de la translation des gènes, impliquant les facteurs de transcriptions CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) et BMAL1 (Brain and Muscle Arnt Like protein 1) qui grâce à leur domaine bHLH-PAS (Basic Helix Loop Helix-Period Arnt Single Minded) s'hétéro-dimérisent et forment un complexe qui favorise la transcription par sa fixation sur la séquence consensus E-box localisée sur les promoteurs de plusieurs gènes cibles. Parmi ces gènes, on trouve celui responsable de la sécrétion des gènes homologues Period (Per 1, Per 2, Per 3), Cryptochrome (Cry 1, Cry 2), Rev-erb (Alpha et Beta) et le neuropeptide VP. Les protéines PER et CRY produits s'hétéro-dimérisent, puis transloquent dans le noyau et inhibent le complexe BMAL1-CLOCK ce qui forme une première boucle négative. Cette rétroaction, inhibe la transcription des gènes Per et Cry et par conséquent, la dégradation progressive du complexe PER-CRY permettant à ce circuit de recommencer. Les modifications post-

transationnelles des différentes protéines du circuit occupent la majeure partie de ce temps de réaction (Crane and Young, 2014). En conséquence, le complexe BMAL1-CLOCK se fixe sur l'ADN de façon rythmique, amenant à une expression rythmiques des gènes cibles (Koike et al., 2012). Des boucles rétroactives supplémentaires sont mises en jeu notamment, Les Rev-erbs exercent un contrôle positif sur les BMAL1 et les RORs un contrôle négatif (Guillaumond et al., 2005; Sato et al., 2004). Ces deux boucles supplémentaires avec d'autres (Liu et al., 2007a; Yang et al., 2012), même si elles ne sont pas essentielles à la génération des rythmes, elles fournissent une robustesse au circuit (Paschos, 2015).

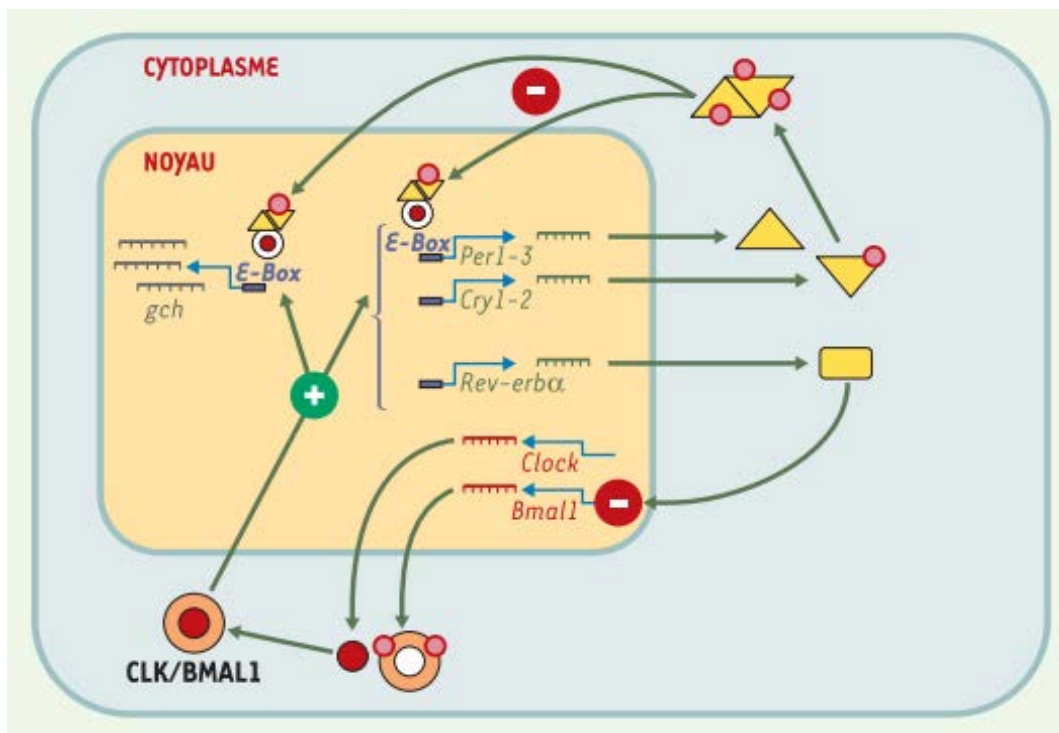


Figure 8 : représentation schématique simplifiée du mécanisme de l'horloge dans les cellules du SCN chez les mammifères.

Un hétérodimère CLK/BMAL1 est transloqué dans le noyau où il agit comme stimulateur de la transcription de gènes possédant des E-box. Les gènes Period (Per1-3), Cryptochromes (Cry1-2) et Rev-erba possèdent des E-box dans leur promoteur. Les protéines PER et CRY s'hétérodimérisent, et sont à leur tour transloquées dans le noyau et viennent réprimer l'activité transcriptionnelle du dimère CLK/BMAL1. La protéine REV-ERBA agit comme inhibiteur de la transcription de Bmal1. Les translocations nucléaires ainsi que la stabilité des dimères sont dépendantes de modifications post-traductionnelles, en particulier de phosphorylations par diverses kinases. Le dimère CLK/BMAL1 stimule également la transcription de nombreux autres gènes possédant des E-box; ces gènes sont dits contrôlés par l'horloge et assurent les sorties physiologiques de celle-ci.

Modifiée d'après (Dardente and Cermakian, 2005)

c) Distribution du message circadien

Le rythme circadien généré au niveau du SCN est imposé à plusieurs fonctions physiologiques, notamment, la température corporelle, l'activité locomotrice, le cycle veille/sommeil, le cycle d'ovulation, l'utilisation d'oxygène, la prise alimentaire, la production de corticostérone surrénale, la synthèse de la mélatonine et plusieurs autres fonctions. Pour assurer la synchronisation des horloges secondaires centrales et périphérique, à la base de la rythmicité de ces fonctions, le SCN doit transmettre le message circadien qu'il a élaboré.

Les connections efférentes du SCN avec les autres régions cérébrales, ont été élucidées avec des techniques de traçage par injections retro- et antérogrades, l'immunocytochimie de la VP et VIP combinée avec des lésions spécifiques (Hoorneman and Buijs, 1982; Watts and Swanson, 1987). Ces études montrent que les efférences du SCN terminent dans une multitude de sites dans le cerveau. Dans l'hypothalamus, les projections les plus denses du SCN se trouvent dans la zone sub-paraventriculaire (sPVZ) dans l'hypothalamus dorso-médian et ventro-médian (DMH et VMH) et dans le noyau arqué (ARC). Des projections moins denses ont été identifiées rostralement dans le noyau préoptique médian (MPN) et dans le septum latéral (LS). Caudalement, le SCN projette vers le noyau Raphé. Dans le thalamus, les axones en provenance du SCN innervent le noyau paraventriculaire, le noyau du lit de la strie terminale (BNST, the bed nucleus of the stria terminalis), l'IGL et le LGN (Buijs et al., 1994; Kalsbeek et al., 2006; Morin et al., 1994). Ainsi, le SCN par ses projections sur des structures dont il reçoit les afférences, dont le noyau Raphé et l'IGL, dispose de projections formant des boucles rétroactives, lui permettant de moduler ses propres voies efférentes. Plusieurs de ces boucles ont été élucidées chez le rat comme chez l'humain grâce à des études d'immunocytochimie et de traçage (Dai et al., 1997; Dai et al., 1998). La figure 9 représente les régions cérébrales recevant des projections en provenance du SCN et de l'IGL.

En outre, plusieurs caractéristiques des neurones à VP, comme leur localisation dans la partie *shell* du SCN, leurs projections vers différentes cibles dans l'hypothalamus et le thalamus, sa sécrétion rythmique dans le SCN et les structures avoisinantes (Kalsbeek et al., 1995) ou dans le liquide cérébro-spinal (LCS) (Jolkkonen et al., 1988; Kruisbrink et al., 1987; Reppert et al., 1981) les positionnent comme un acteur majeur dans la signalisation des voies d'efférente en provenance du SCN. Un rôle similaire des neurones à VIP n'a pas été décrit.

En se basant sur les différences entre les deux subdivisions du SCN, que cela soit pour les voies afférentes et efférentes, (Leak et al., 1999) ont proposé une hypothèse pour comprendre leurs fonctions respectives dans l'horloge biologique. Selon cette hypothèse, le signal circadien est généré dans les neurones du *shell* et est synchronisé par de multiples connections locales et commissurales. Les projections de la zone *core* dont l'activité est nyctémérale, vers la zone *shell* assure la synchronisation de tous les neurones du SCN.

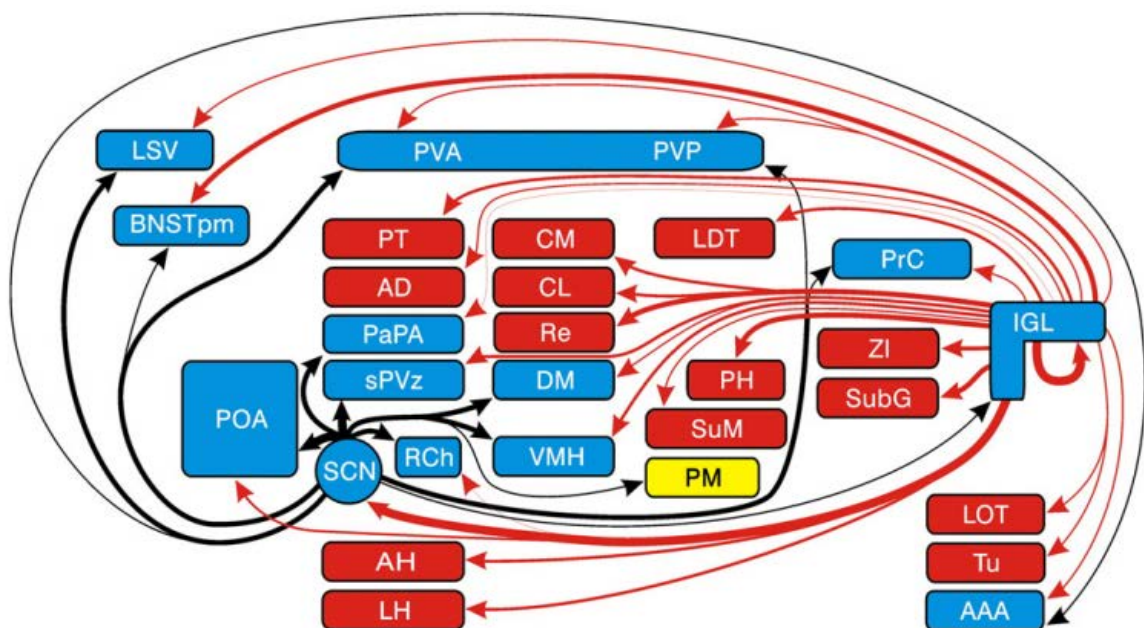


Figure 9: Représentation schématique simplifiée montrant les afférences et les efférences du SCN.

les régions cérébrales recevant des projections du SCN (les flèches noires) et de l'IGL (flèches rouges). Les structures en bleu reçoivent des projections du SCN et de l'IGL, celles en rouge reçoivent des projections seulement de l'IGL. En jaune, la seule structure qui reçoit des projections, seulement

en provenance du SCN. L'épaisseur des flèches indique la densité relative des projections. Abréviations : AD, noyau thalamique antéro-dorsal ; CM, noyau thalamique centro-médiane ; CL, noyau thalamique centro-latéral ; BNSTpm, le noyau paraventriculaire de la strie terminale ; DM, noyau hypothalamique dorso-médiane ; AH, noyau hypothalamique antérieur ; AAA, Aire amygdaloïde antérieure ; IGL, Feuilletts intergénéculés latéraux du thalamus ; LSV, septum latéral (partie ventrale); LH, noyau hypothalamique latéral ; LDT, noyau tégmental dorso-latéral ; LOT, noyau olfactif latéral; PVA, noyau thalamique paraventriculaire (partie antérieure); PVP, noyau thalamique paraventriculaire (partie postérieure); PT, noyau thalamique paraténial; PrC, noyau précommissural; PaPA, noyau hypothalamique paraventriculaire ; PH, hypothalamus postérieur ; PM, noyau pré-mammillaire; POA, aire préoptique; Re, noyau Reuniens du thalamus; sPVz, zone hypothalamique sous-paraventriculaire ; SCN, noyau suprachiasmatique; RCh, aire rétrochiasmatique ; VMH, noyau hypothalamique ventro-médiane ; SuM, noyau supramammillaire; ZI, zona incerta ; SubG, noyau subgeniculaire ; Tu, tubercle olfactif. D'après (Morin, 2013).

iv. L'activité électrique du SCN

a) Généralités

L'étude de l'horloge circadienne chez les Mammifères avec des techniques électrophysiologiques avait commencé avec la publication d'une série d'études indépendantes les unes des autres (Groos and Mason, 1978; Nishino et al., 1976; Sawaki, 1977). Ces études pionnières utilisant des électrodes d'enregistrement extracellulaire chez des rongeurs anesthésiés à l'uréthane ont démontré que les neurones du SCN ont une activité électrique spontanée et que l'effet d'une stimulation photique de la rétine ou une stimulation électrique du nerf optique, est d'augmenter la fréquence de décharge de ces neurones. Cette réponse à la lumière était en concordance avec la mise en évidence du RHT qui transporte le signal photique rétinien vers les cellules du SCN (Guldner and Wolff, 1978; Meijer and Rietveld, 1989). Les enregistrements électrophysiologiques faits sur des rats non anesthésiés en mouvement libre, et sur des îlots isolés contenant le SCN (Brown and Piggins, 2007; Inouye and Kawamura, 1982; Inouye and Kawamura, 1979; Meijer et al., 1996) montrent un mode diurne de l'activité électrique, avec une fréquence de décharge spontanée élevée pendant la phase éclairée que pendant la phase obscure. Ce mode de décharge persiste chez les animaux maintenus dans des conditions d'éclairage constantes, ce qui démontre que les rythmes circadiens sont les

produits actifs de l'horloge endogène et pas une réponse passive au cycle externe de la lumière et de l'obscurité. Les enregistrements faits de la même manière chez d'autres espèces montrent le même mode de décharge de l'activité électrique du SCN, y compris chez les espèces diurnes (Sato and Kawamura, 1984; Yamazaki et al., 1998). Ces données ont permis de proposer un modèle de la relation existante entre l'activité cellulaire du SCN et le comportement (Figure 10). Ce modèle suggère que, chez les animaux nocturnes, la lumière active les neurones du SCN, qui sont par conséquent, plus actifs pendant le jour, alors que les régions cérébrales en dehors du SCN, qui contrôlent l'activité comportementale, montrent un rythme de l'activité cellulaire en antiphase avec le SCN, probablement dû à un signal efférent inhibiteur en provenance du SCN. Ces régions voient leurs signaux envoyés aux centres cérébraux responsables de l'activité comportementale. Par contre, chez les animaux diurnes, même si l'activité électrique reste plus élevée pendant le jour, c'est un signal excitateur qui part du SCN vers les régions responsables de l'activité comportementale, qui à leurs tours déclenchent l'activité comportementale (Brown and Piggins, 2007). D'autres parts, le développement des techniques d'électrophysiologie sur tranches a permis d'établir le caractère endogène et intrinsèque ainsi que l'origine moléculaire de l'horloge circadienne, puisque l'activité électrique des neurones du SCN se maintient dans les préparations en tranches, et ce pendant plusieurs jours, à la différence de neurones issus d'autres régions cérébrales (Green and Gillette, 1982; Groos and Hendriks, 1979; Liu et al., 1997).

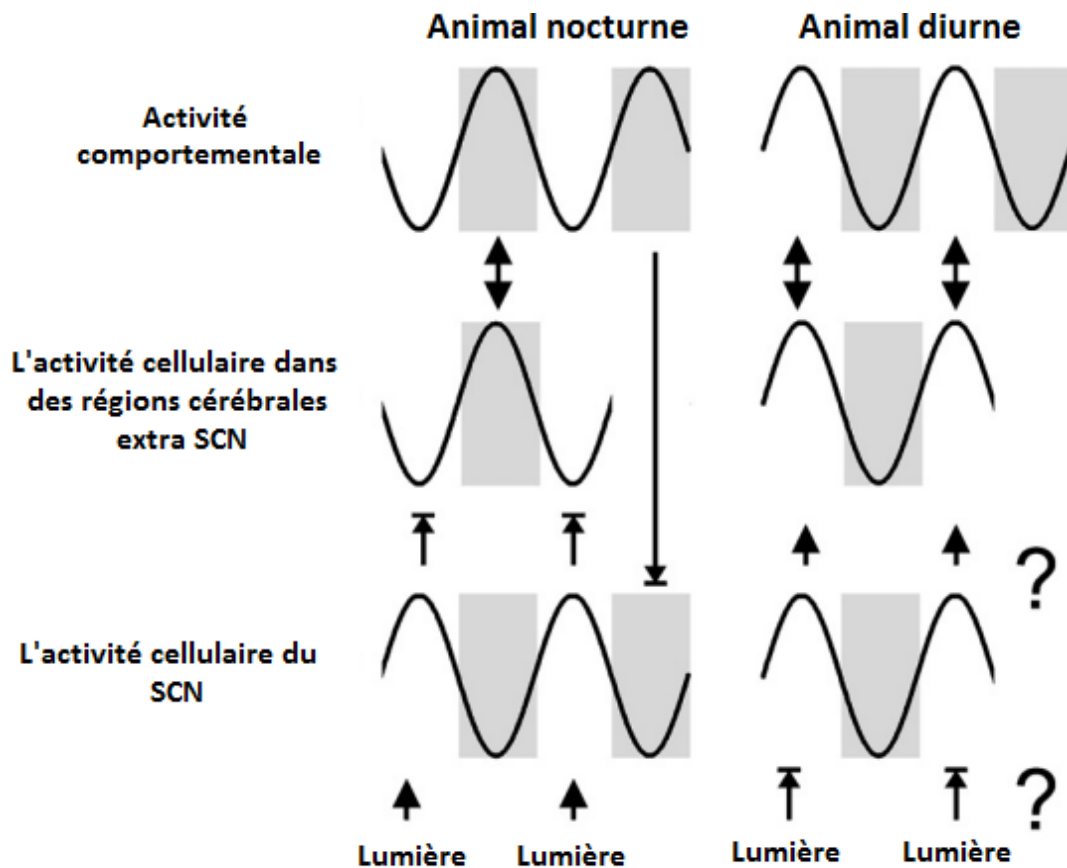


Figure 10 : Représentation simplifiée de la relation entre l'activité cellulaire du SCN et l'activité comportementale.

L'activité cellulaire est plus élevée pendant le jour chez les animaux diurnes et nocturnes. (A gauche) Chez les rongeurs nocturnes, la lumière active les neurones du SCN, qui sont en conséquence plus actifs pendant le jour. Les régions cérébrales en dehors du SCN, qui contrôlent l'activité comportementale présentent un rythme de l'activité cellulaire en antiphase avec le SCN, probablement via des projections inhibitrices du SCN. L'activité comportementale renforcée exerce un feed-back en retour pour supprimer l'activité cellulaire du SCN. (A droite) Par contre, chez les rongeurs diurnes, l'activité cellulaire du SCN est en phase avec l'activité comportementales, et peu de choses sont connues sur comment se fait la suppression de l'activité du SCN.

D'après (Brown and Piggins, 2007)

b) Le couplage

Plusieurs études citées auparavant, avec d'autres indiquent qu'une grande partie des neurones du SCN dissociés en culture réagissent comme des oscillateurs autonome avec chacun une horloge inexacte et présentant des phases différentes. Il existe une autre partie de ces neurones qui semblent arythmiques dans ces conditions (Bos and Mirmiran, 1990; Nakamura et al., 2001). Ces études mettent en évidence une population neuronale hétérogène avec des profils

d'activité différents, alors qu'*in vivo* ces neurones sont couplés, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme permettant le couplage de ces neurones, dont l'important rôle serait d'assurer la communication entre ces oscillateurs cellulaires autonomes pour produire un signal circadien coordonné. Les études électrophysiologiques *in vitro* ont montré que l'application du GABA, qui est abondamment présent dans le SCN dans les conditions normales, peut synchroniser l'activité électrique des cellules horloges individuelles (Liu and Reppert, 2000). Un autre neuropeptide qui joue un rôle important dans la synchronisation des cellules du SCN est le VIP, dont l'absence empêche le maintien et la synchronisation des cellules (Brown et al., 2007; Colwell et al., 2003; Maywood et al., 2006), mais dont le rôle peut être compensé totalement ou partiellement par d'autres neuropeptides présents aussi dans le SCN comme le GRP ou le PACAP (Brown et al., 2005; Maywood et al., 2006). L'innervation glutamatergique semble aussi jouer un rôle important dans le couplage des cellules du SCN (Lundkvist et al., 2002). Outre la transmission synaptique classique, le SCN dispose d'autres formes de communication cellulaire qui jouent un important rôle dans la synchronisation de ses cellules, comme la communication via les jonctions gap qui sont présentes sur beaucoup de cellules du SCN (Colwell, 2000; Long et al., 2005). Une autre forme de communication qui peut jouer un rôle non négligeable dans la communication intercellulaire, est une interaction de type neurone-cellule gliale (Tamada et al., 1998).

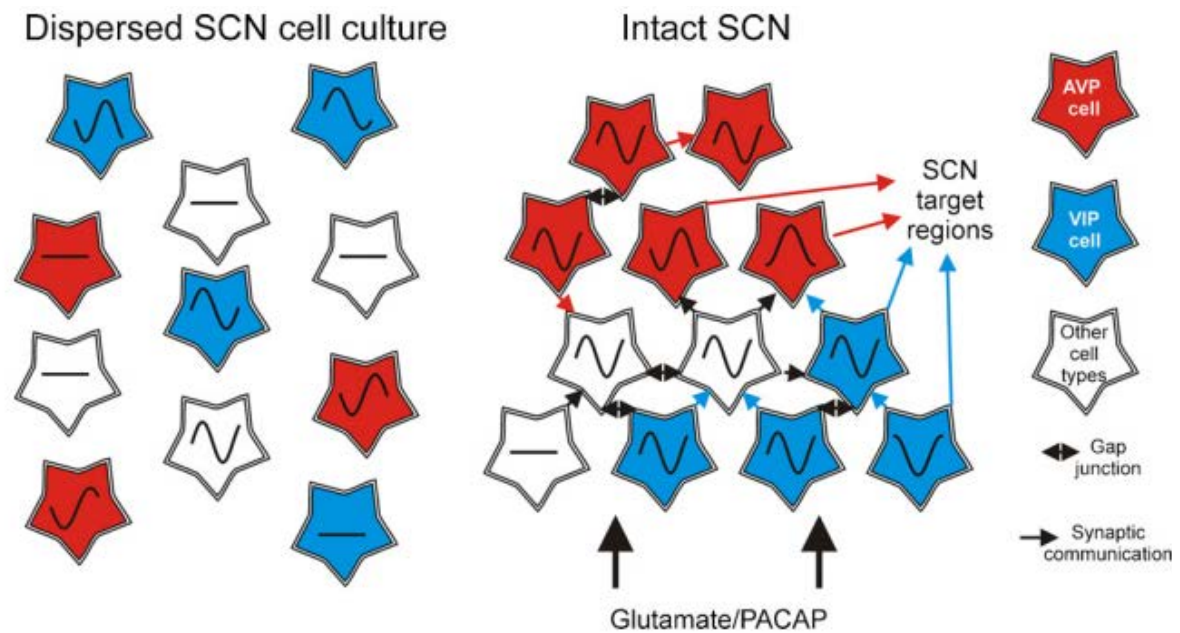


Figure 11 : Représentation schématique simplifiée de la régulation de rythmicité des neurones du SCN par les interactions au sein du réseau formé par ces cellules.

Dans une culture de cellules du SCN dispersées, les neurones ne sont pas couplés les uns aux autres. Dans ces conditions, certaines cellules deviennent arythmiques, alors que d'autres expriment un rythme en libre cours. Par contre, dans une culture de cellules du SCN intactes, les neurones sont couplés les uns aux autres par des communications synaptiques et des jonctions gap.

D'après (Brown and Piggins, 2007)

v. Les rythmes circadiens et la maladie de Parkinson

Plusieurs des symptômes non-moteurs majeurs de la MP, ont une composante temporelle diurne qui suggère l'existence d'un dysfonctionnement du système circadien sous-jacent. Les plus marquants de ces symptômes sont les différents types de troubles du sommeil qui affectent à la fois les caractéristiques quantitatives et qualitatives du cycle veille/sommeil (De Cock et al., 2008). L'incidence d'occurrence de ces troubles du sommeil est située entre 74 et 81% chez les patients de la maladie (Nausieda et al., 1982; van Hilten et al., 1993). Ces troubles du sommeil consistent globalement en une augmentation du délai d'endormissement, une diminution du maintien du sommeil, un sommeil fragmenté et une somnolence diurne excessive (Arnulf and Leu-Semenescu, 2009; Bruin et al., 2012; Iranzo, 2011; Wulff et al., 2010). Tous ces

symptômes pourraient refléter des dysfonctionnements au niveau de la structuration temporelle du sommeil qui est souvent le résultat d'un trouble du système circadien (Abbott et al., 2005; Dhawan et al., 2006; Mayer et al., 2011; Reid and Zee, 2009; Schulte and Winkelmann, 2011). Par conséquent, l'altération du système circadien pourrait être considérée comme un facteur parmi d'autres qui sont responsables de l'insomnie et de l'hypersomnie décrites chez les patients. A noter, que d'autres troubles du sommeil, souvent décrits chez les parkinsoniens ne sont probablement pas liés à un dysfonctionnement quelconque du système circadien, notamment les troubles qui affectent le sommeil paradoxal (Arnulf, 2012; Kunz and Mahlberg, 2010; Willison et al., 2013).

En outre, les patients atteints de la MP, montrent des perturbations dans d'autres processus physiologiques, qui sont connus pour être influencés par le système circadien. Par exemple, le système nerveux autonome est sujet de régulation circadien. L'équilibre entre les tonus sympathique et parasympathique varie en fonction du cycle circadien journalier (Jain and Goldstein, 2012). Chez les individus sains, le tonus parasympathique prédomine durant la nuit/sommeil et agit pour réduire la fréquence cardiaque et la pression artérielle. Cette action est possible par la projection des neurones du SCN sur les neurones pré-autonomique du noyau paraventriculaire (PVN) pour permettre cette prédominance (Buijs et al., 2003). Plusieurs études ont rapporté une altération de cette régulation circadienne du système nerveux autonome chez les patients atteints de la MP (Kallio et al., 2000) et cette altération engendre des changements au niveau de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Brevetti et al., 1990; Ejaz et al., 2006; Pursiainen et al., 2002; Schmidt et al., 2009). Approximativement 30 à 40% des patients atteints de la maladie souffrent d'une hypotension orthostatique qui a été attribuée à une dénervation cardiaque sympathique ainsi qu'à un dysfonctionnement sympathique/parasympathique du baroréflexe artériel (Jain, 2011). Ces symptômes cardiaques sont vraisemblablement indépendants de la faiblesse associée à la perte neuronale de la SNc, et

il est admis qu'ils apparaissent très tôt dans la progression de la maladie (Willison et al., 2013). Un autre exemple de cette perturbation circadienne, est donné par les symptômes qui affectent le tractus urinaire, qui constituent une autre manifestation de la dérégulation du système nerveux autonome chez les patients atteints de la MP. Les symptômes qui affectent ce tractus comme la nycturie, la hausse de la fréquence d'uriner et l'incontinence sont largement répandus chez les patients (Yeo et al., 2012). Dans une étude, Ragab et Mohammed (2011) montrent que plus que 75% des patients parkinsoniens souffrent de la nycturie et 30 à 35% des patients souffrent d'une fréquence d'urination élevée. Elle montre aussi, qu'il n'y a pas de différences significatives entre les patients recevant des médicaments dopaminergiques et les patients qui sont restés sans médicaments, ce qui montre que l'origine de ces symptômes se trouve loin de la perte des neurones dopaminergiques. En effet, le SCN régule les cellules baroréflexe de la pression osmotique, qui sont responsables de l'augmentation nocturne de la sécrétion d'arginine vasopressine, connu aussi par l'hormone antidiurétique qui réduit le volume urinaire produit pendant la nuit/sommeil (Colwell, 2010; Trudel and Bourque, 2010). D'autres paramètres physiologiques contrôlés par le SCN sont altérés dans la MP, ce qui prouve l'évidence que le système circadien est affecté dans la maladie.. Le profil circadien de la sécrétion de la mélatonine, une autre hormone contrôlée par le SCN, est aussi affecté chez les parkinsoniens, et cela au niveau de l'amplitude et de l'entraînement de phase (Bordet et al., 2003).

En plus des altérations qui accompagnent la MP, les traitements dopaminergiques utilisés pour traiter les symptômes moteurs de la MP, pourraient contribuer à l'altération du cycle veille/sommeil. En effet, d'une part, la dopamine est généralement associée avec les centres d'éveil et plusieurs constats suggèrent que cette monoamine est impliquée dans la régulation du cycle veille/sommeil grâce à de multiples circuits. Globalement, le niveau de la dopamine semble avoir un rythme circadien avec un pic pendant le jour chez l'humain (Poceta et al., 2009) et la souris (Hampp et al., 2008). Cette modulation est possible via les enzymes monoamines

oxydases A et B (MAO-A et MAO-B), qui sont impliquées dans la régulation du catabolisme de plusieurs neurotransmetteurs monoaminergiques (Shih and Chen, 2004). Ces enzymes sont contrôlées par l'horloge circadienne. Une mutation du gène horloge *Per2*, réduit l'expression et l'activité de ces enzymes (Hampp et al., 2008) ce qui montre qu'une altération de l'horloge circadienne peut endommager le niveau de la dopamine par le biais de l'activité des MAOs. D'autre part, comme la perte des neurones dopaminergiques de la SNc est à l'origine des symptômes moteurs observés dans la MP, la stratégie de traitement utilisée se base généralement sur l'emploi d'un précurseur métabolique capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, dans la voie de biosynthèse de la dopamine dans l'objectif d'augmenter ses concentrations synaptiques dans la SNc et le striatum (Blandini and Armentero, 2014 pour revue). Les médicaments dopaminergiques y compris la L-DOPA sont connus pour être impliqués dans la modulation de l'expression des gènes horloge (Hood et al., 2010; Imbesi et al., 2009). En plus, il y a plusieurs études sur les rongeurs, fournissant une documentation extensive sur l'effet circadien-dépendant puissant des drogues comme la cocaïne ou la méthamphétamine qui influencent le système dopaminergique (Glass et al., 2012; Honma and Honma, 2009; Ironside et al., 2010). Prenant en considération ces données, il est clair que la majorité des médicaments qui sont prescrits pour calmer les symptômes moteurs de la MP sont eux même impliqués dans les troubles des rythmes circadiens surtout celui du cycle veille/sommeil (Perez-Lloret et al., 2010; Rye, 2004). Plus spécifiquement, ces données montrent qu'une petite dose d'agents pharmacologiques qui augmente le niveau de la dopamine, améliore le sommeil alors qu'une dose élevée retarde le début du sommeil et diminue la durée totale du sommeil (Diederich and McIntyre, 2012; Schafer and Greulich, 2000; Yong et al., 2011). Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si le contrôle du timing de l'administration de la L-DOPA et les composants relatifs, pourrait améliorer les troubles du sommeil indésirables causés par ces médicaments (Wailke et al., 2011).

A cela, s'ajoute le fait que les symptômes moteurs et certains symptômes non-moteurs contribuent aussi à la perturbation du profil circadien du cycle veille/sommeil. La réapparition du tremblement durant les réveils de courte durée, les mouvements du corps ou changement de stade du sommeil, contribuent à la fragmentation du sommeil (Stern et al., 1968). Aussi, le syndrome des jambes sans repos (Restless legs syndrome) est un autre trouble moteur qui se manifeste durant le sommeil chez 30% des patients parkinsoniens, qui peut perturber le sommeil (Chaudhuri et al., 2006).

II. Objectifs global et spécifiques:

Plusieurs éléments de la littérature indiquent que plusieurs sorties du système circadien sont altérées dans la MP. Ceci a été montré clairement dans plusieurs études cliniques, comme il a été déjà souligné dans cette introduction. Cependant, les mécanismes sous-jacents de cette perturbation ne sont pas encore bien élucidés, ni leur nature, ni leur emplacement dans le système circadien : l'entrée de l'horloge circadienne, l'horloge elle-même ou ses sorties ? Les études expérimentales qui ont tenté de répondre à cette question ont investi surtout des modèles animaux où seulement l'implication du système dopaminergique a été évaluée, sans pour autant investir les changements qui touchent le SCN au niveau cellulaire. Cette thèse s'inscrit dans cette démarche et a pour objectif global l'évaluation du dysfonctionnement du système circadien dans le contexte de la MP en utilisant un modèle approprié de la maladie, où serait évalué non seulement le système dopaminergique, mais aussi les autres systèmes monoaminergiques fortement impliqués dans la MP, et pas seulement au niveau comportementale mais aussi au niveau cellulaire.

Donc le premier objectif spécifique de ce travail, est de mettre en place un modèle approprié pour étudier la problématique indiquée dans l'objectif global. Le choix de ce modèle repose essentiellement sur son respect des critères de validation d'un modèle animal de la MP. Nous nous sommes intéressés dans cette première partie à évaluer un modèle émergent dans l'étude de la MP, qui repose sur une intoxication avec des molécules environnementales le PQ/MB et de le comparer avec le modèle utilisé habituellement dans notre laboratoire qui utilise la 6-OHDA. Ce premier objectif spécifique consiste à étudier les effets de l'intoxication par un traitement combiné de PQ et MB chez le rat Sprague Dawley sur (i) l'activité locomotrice et la coordination motrice, (ii) le comportement anxieux et dépressif, (iii) les contenus tissulaires de la dopamine dans le striatum d'une part, et de la noradrénaline et de la sérotonine dans le cortex frontal d'autre part (iv) l'activité électrique des neurones du noyau sous-thalamique qui

représente une structure des ganglions de la base jouant un rôle clé dans la physiopathologie de la MP.

Prenant en considération les conclusions de la première partie (Tinakoua et al., 2015), nous avons opté pour le modèle 6-OHDA, qui en plus d'être bien documenté et plus reproductible, permet d'étudier les effets des déplétions des trois systèmes monoaminergiques impliqués dans la MP. Dans cette optique, le deuxième objectif spécifique de cette thèse est d'étudier les effets de la déplétion dopaminergique seule ou combinée avec les déplétions noradrénergique et/ou sérotoninergique sur l'activité locomotrice des rythmes circadiens et aussi sur l'activité électrique des neurones des noyaux suprachiasmatiques chez le rat Sprague Dawley. Dans cette thèse seront présentés les résultats électrophysiologiques des SCN, mais pas les résultats de l'étude comportementale qui est encore en cours de réalisation.

III. Matériel et méthodes :

1. Le modèle animal

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec la directive 2010/63/UE du conseil du 22 Septembre 2010 du parlement européen, relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Pour l'ensemble des études des rats adultes mâles de souche Sprague-Dawley, pesant entre 260 et 300 grammes ont été utilisés. Tous les animaux ont été placés à température constante de 22°C et ont été nourris *ad libitum* et ont eu libre accès à l'eau.

i. Intoxication combinée au PQ/MB

Les expériences de cette partie du projet, ont été conduites sur trente-quatre rats Sprague-Dawley mâles de 8 semaines à leur réception (Fournisseur Centre d'Élevage Depré, Saint Doulchard, France). Les animaux ont été hébergés par trois ou quatre dans chaque cage et placés dans l'animalerie du laboratoire sous un cycle de 12h de lumière/12h d'obscurité.

Initialement, les animaux ont été divisés en deux groupes comme suit: (i) 26 rats qui ont reçu par injection intrapéritonéale, le PQ (10mg/Kg) et le MB (30mg/Kg), deux fois par semaine durant deux (n=16), quatre (n=6) ou six (n=4) semaines suivant leur réponses au traitement (ii) 8 rats contrôles, qui ont reçu 40mg/Kg d'acétate de Sodium dans les mêmes conditions. Les doses utilisées ont été choisies, en se basant sur les données de la littérature (Cicchetti et al., 2005; Thiruchelvam et al., 2000a). Les animaux ont été pesés deux fois par semaine, et ceux qui ont perdu plus de 20% de leur poids ont été sacrifiés.

ii. 6-hydroxydopamine (6-OHDA)

Cinq groupes ont été réalisés dans cette partie du projet: le groupe contrôle ne recevant que du NaCl (0,9%) et quatre groupes qui ont reçu la 6-OHDA (SIGMA-ALDRICH, réf.: H116-5MG), une neurotoxine spécifique des neurones catecholaminergiques avec quatre différentes

combinaisons de déplétions monoaminergiques: (i) une déplétion dopaminergique seule, (ii) une double déplétion dopaminergique et noradrénergique, (iii) une double déplétion dopaminergique et sérotoninergique (iv) et une triple déplétion combinant les trois systèmes monoaminergiques. En addition de la 6-OHDA, plusieurs produits ont été utilisés pour réaliser ces déplétions, notamment la Désipramine hydrochloride (SIGMA-ALDRICH, réf.: D3900-5G) pour protéger les neurones noradrénergiques et la 5,7-Dihydroxytryptamine (5,7-DHT, SIGMA-ALDRICH, réf.: 37970-100MG) pour léser les neurones sérotoninergiques.

Les rats ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale (i.p.) de ketamine hydrochloride (75mg/kg, Centravet réf.: KET204) et de xylazine hydrochloride (10mg/kg, SIGMA-ALDRICH, réf.: X1251-5g). Le rat anesthésié est ensuite placé sur un cadre stéréotaxique (Unimecanique, France). Le crâne est mis à nu puis séché afin de distinguer les repères anatomiques à la surface du crâne : bregma et lambda. Les injections de 6-OHDA et de la 5,7-DHT ont été réalisées au niveau du faisceau médian du télencéphale (MFB) selon les coordonnées stéréotaxiques de Paxinos et Watson (1996), au niveau duquel se trouvent les fibres dopaminergiques et sérotoninergiques issues respectivement de la SNc et du noyau Raphé. Ainsi, A l'aide de l'atlas stéréotaxique, les MFB droit et gauche sont atteints en déplaçant la canule aux coordonnées suivantes : AP (antéropostérieur) : - 2,8 mm par rapport au bregma ; L (latéral) : $\pm 2,0$ mm par rapport à la ligne médiane ; DV (dorsoventral) : -8,4 mm par rapport à la surface.

Tous les rats des groupes traités ont reçu une injection de 4,2 μ g de 6-OHDA (dissouts dans un volume de 2,5 μ l de NaCl 0,9%), injectés dans chaque MFB. Injectée toute seule sans désipramine, la 6-OHDA nous a permis d'obtenir un groupe de rats ayant subi une double déplétion Dopaminergique et noradrénergique, puisque la 6-OHDA atteint aussi les neurones Noradrénergiques. Le groupe de rats ayant subi une déplétion Dopaminergique seule a été obtenu avec l'injection préalable de la désipramine (0,4%, 5ml/kg) permettant l'inhibition de

la recapture de la 6-OHDA par les neurones noradrénergiques et donc la protection de ces neurones contre la toxicité de la 6-OHDA. Cette injection par voie intrapéritonéale a été réalisée 30min avant l'injection de la 6-OHDA. La désipramine a été utilisée aussi de la même façon pour le groupe de rats ayant subi une double déplétion Dopaminergique et sérotoninergique, qui en plus de la 6-OHDA a reçu une injection bilatérale de la 5-7-DHT (24 µg), une neurotoxine spécifique des neurones sérotoninergiques (Liu et al., 2007b). Finalement le groupe de rats ayant subi une triple déplétion a reçu une injection de la 6-OHDA et de la 5-7-DHT dans les mêmes conditions.

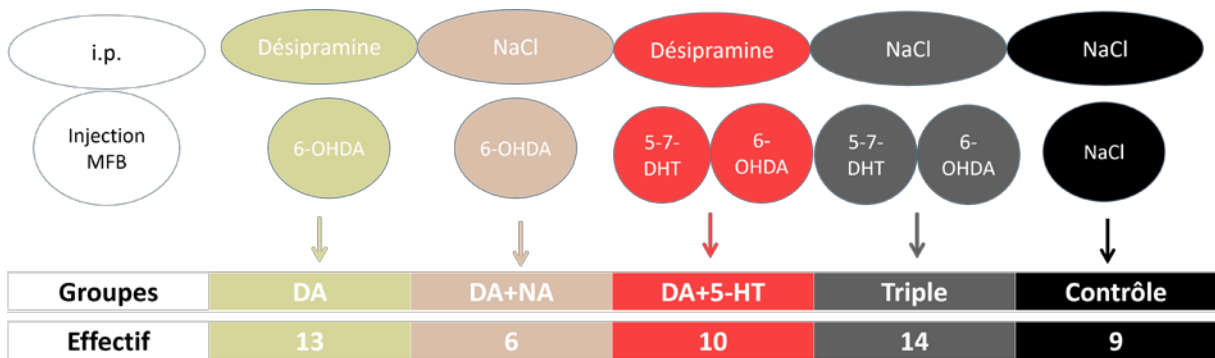


Tableau 2 : Récapitulatif des groupes de déplétion utilisés et leurs effectifs, ainsi que les produits utilisés pour réaliser chacune des déplétions.

6-OHDA: 6-hydroxydopamine; 5,7-DHT: 5,7-Dihydroxytryptamine MFB : faisceau médian du télencéphale.

2. Etude comportementale

i. Tests moteurs

a) Champ Ouvert ou "Open Field"

L'Open Field, permet l'étude de l'activité locomotrice horizontale et le redressement chez l'animal. Le dispositif utilisé (Actitrack, Panlab, Barcelona, Spain) est composé d'une boîte carrée qui mesure 45x45cm³ et d'une unité de contrôle qui permet la collecte des données. La boîte est équipée de deux barres contenant des faisceaux infrarouges situés à deux hauteurs différentes. Ainsi, l'appareil peut détecter trois types de mouvements : horizontaux car le rat

interrompt l'un des faisceaux de la barre la plus basse, verticaux quand il interrompt ceux de la barre la plus haute et des mouvements plus fins, stéréotypés correspondant au grattage et au toilettage qui peuvent être quantifiés par la barre la plus basse (Belujon et al., 2007). Le protocole suivi, est celui décrit auparavant par (Chetrit et al., 2009). Brièvement, chaque rat effectue une séance de 20 minutes pendant les premiers jours qui correspondent à la période d'habitation, qui peut durer de trois à cinq jours jusqu'à ce que le nombre de mouvement atteigne un niveau constant. Puis, le jour d'après correspond au jour test, pour lequel la valeur de l'activité locomotrice est prise en considération. Seules, les dix dernières minutes sont prises en considération dans ce test, puisqu'elles correspondent à une activité locomotrice détachée d'autres paramètres qui peuvent biaiser les valeurs du test, sachant que les dix premières minutes correspondent plutôt à une activité exploratrice. Ce test, est effectué dans une salle isolée du bruit et faiblement éclairée. Toutes les séances ont été effectuées entre 8h et 14h.



Figure 12: Open Field infrarouge, utilisé pour la mesure de l'activité locomotrice spontanée des rats au moyen des rayons photo-électriques infrarouges (BIOSEB, USA)

b) Rotarod

Parmi les nombreux tests comportementaux développés pour évaluer les performances motrices des rats, le test du Rotarod est particulièrement adapté pour tester la coordination motrice. Le Rotarod utilisé (Bioseb, in vivo Research Instruments, Spain) est composé d'un tambour à

multiples voies, entraîné en mouvement de rotation autour de son axe, par un moteur électrique à vitesse réglable, et muni d'un détecteur de chute mécanique et une minuterie pour chaque voie. L'expérimentation a été réalisée comme décrite auparavant (Papp and Bal, 1987; Rozas et al., 1997), tous les rats ont été entraînés au Rotarod, pendant trois jours. Pendant cette période d'entraînement, chaque rat a été placé sur le tambour qui tourne à une vitesse graduelle de 4 à 20 rotations par minutes, pour une durée maximale de 15 minutes. Au terme de ces trois jours, un niveau constant de performance est atteint. Au quatrième jour, c'est-à-dire, le jour test, la performance au Rotarod a été enregistrée pour chaque rat pendant cinq tentatives, pour une durée maximale de 3 minutes et la moyennes a été prise en considération. Le test et l'entraînement ont été effectués durant le jour, entre 9h et 14h.

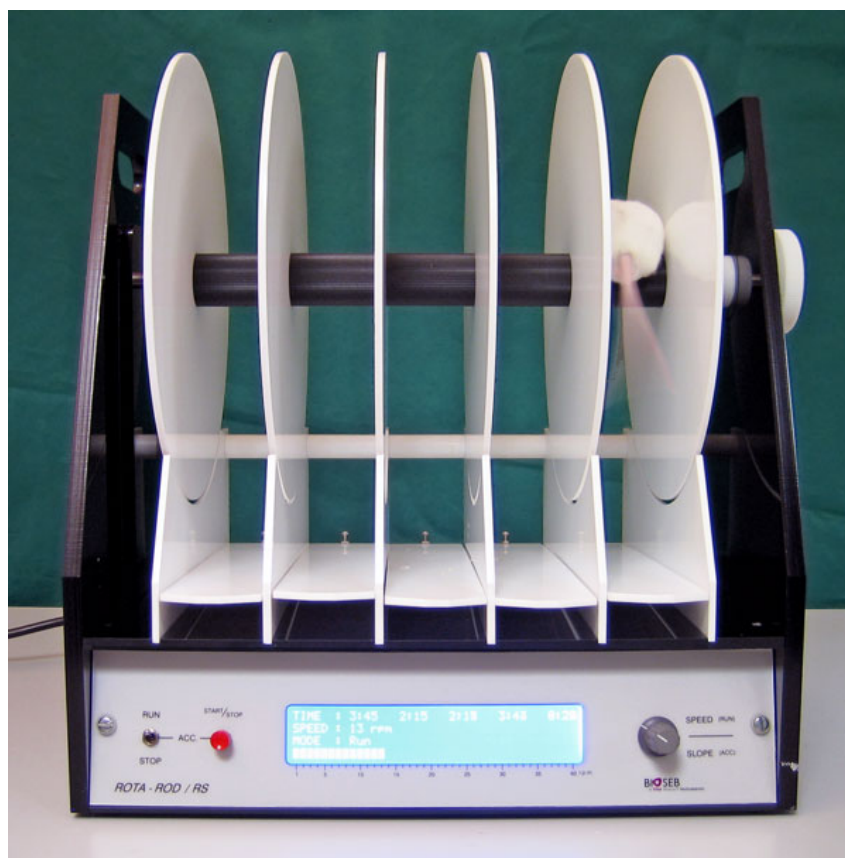


Figure 13: Photographie d'un appareil de Rotarod utilisé pour mesurer la coordination motrice.

ii. Tests non-moteurs

a) Labyrinthe en Croix Surélevé (EPM)

Le comportement anxieux a été mesuré par le test du labyrinthe en croix surélevé (EPM, *Elevited Plus Maze*). C'est un test qui permet de mesurer la peur et l'anxiété chez les rongeurs. Ce test exploite, chez le rat, la préférence des endroits sombres et fermés comme zone de confort et le désir d'explorer un nouvel environnement.

Un rat anxieux, a tendance à rester dans le bras fermé, plutôt que d'explorer le bras ouvert. Ainsi, le comportement anxieux est évalué à partir des pourcentages du nombre d'entrées et du temps passé dans les bras fermés par rapport au nombre d'entrées et du temps total passés dans les deux bras.

En fait, le labyrinthe en croix surélevé est un dispositif en bois, qui possède deux bras d'un mètre de longueur et 10 cm de largeur. Les deux bras se croisent perpendiculairement au milieu en laissant un espace de forme carré (10cm x 10cm) à leur intersection, donnant ainsi la forme d'une croix à l'EPM. Alors que les deux côtés de l'un des bras sont bordés de parois opaques de 40 cm de haut, l'autre bras constitue une plateforme ouverte. L'ensemble du dispositif se trouve à environ 75cm au-dessus du sol, afin d'augmenter l'anxiété du rat qui se déplace sur le bras découvert (Figure 14).



Figure 14 : Photographie du labyrinthe en croix surélevé utilisé pour mesurer le comportement anxieux.

Le test a été réalisé pendant 5 minutes chez des rats qui n'avaient jamais été exposés à l'EPM, et ce, pour garder le caractère « exploration » offert par l'appareil (Walf and Frye, 2007). Brièvement, le test consiste à placer le rat dans l'espace carré du milieu, avec la tête en direction de l'un des côtés ouverts de l'appareil et de mesurer deux paramètres qui reflètent le niveau anxieux de l'animal : le nombre d'entrées dans les bras ouverts et fermés en fonction du nombre totale d'entrées (une entrée n'est prise en compte que si les quatre pattes de l'animal sont dans le bras) ; le temps passé dans ces bras en fonction du temps total passé dans les bras. L'ensemble de l'expérimentation se déroule dans une salle isolée du bruit et faiblement éclairée. Toutes les séances ont été effectuées pendant le jour, entre 9h et 14h.

b) Dépression ou Consommation Préférentielle du Sucre

L'anhédonie est l'un des symptômes de la dépression, qui est définie comme la perte de la sensation de plaisir. Le test de la préférence au sucrose est fréquemment utilisé pour évaluer l'anhédonie. Il consiste à comparer la consommation d'une solution de sucrose avec de l'eau. Un rat normal a tendance à choisir la solution contenant du sucrose, tandis qu'un rat dépressif choisit de l'eau normale. Ce test a été utilisé comme décrit auparavant dans (Delaville et al., 2012). Il se déroule sur cinq jours, les trois premiers servent à habituer les rats à la présence de deux biberons, alors que le quatrième est le jour pré-test qui sert à habituer les rats au sucrose et le dernier est le jour test. Durant les trois premiers jours les rats ont été placés dans des cages individuelles avec deux biberons remplis d'eau. Les deux derniers jours, 30 minutes après le début du cycle nocturne, les rats avaient accès à deux biberons, un rempli avec de l'eau et l'autre, rempli d'une solution de sucrose à 1% et cela pendant 2 heures (figure 15). Afin d'éviter que les rats développent une préférence pour une place en particulier, les biberons de chaque cage, sont inversés aléatoirement dans le temps. Pour déterminer la consommation de l'eau et

du sucrose, les biberons ont été pesés avant et après la fin du test. Ainsi, en connaissant la consommation du sucrose (CS) et la consommation d'eau (CE), on peut déduire la préférence au sucrose (PS), avec l'équation suivante :

$$PS = \frac{CS (g) * 100}{CS (g) + CE (g)}$$

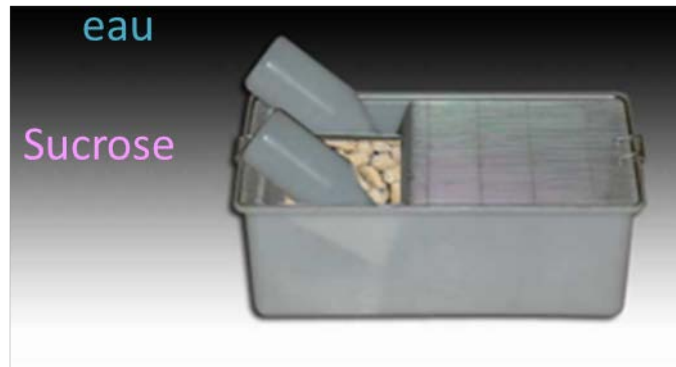


Figure 15: Photographie du dispositif mis en place pour mesurer l'anhédonie.

c) Nage forcée

Ce test se déroulant sur deux jours consécutifs, consiste à placer l'animal dans un cylindre en plexiglass transparent (50cm de haut, 20cm de diamètre) rempli de 30cm d'eau à une température de 25 ± 2 °C. La profondeur de l'eau est délibérément choisie à 30cm (Borsini and Meli, 1988) contrairement aux 15cm utilisés à l'origine par (Porsolt et al., 1978) afin d'empêcher le rat de toucher le fond du cylindre. Les animaux sont filmés afin d'analyser visuellement les différents paramètres: le temps de la nage, la durée de l'immobilité et de l'escalade des parois. Le premier jour, considéré comme le « pré-test » dure 15 min pour chaque rat et correspond à l'habituation de l'animal au milieu. Le jour «test», l'évaluation dure 5 min.

L'analyse off-line, a été réalisée comme décrite précédemment par (Detke et al., 1995). Un rat est considéré immobile, quand il reste flottant dans l'eau, sans fournir d'efforts pour nager et en gardant que le minimum de mouvements nécessaires pour garder sa tête hors de l'eau. Ainsi, un animal est considéré comme étant dépressif, lorsqu'il passe plus de temps immobile. Ce test

a été réalisé pour les animaux des groupes 2 et 3 traités au PQ/MB. Toutes les séances ont été effectuées pendant le jour, entre 9h et 14h.

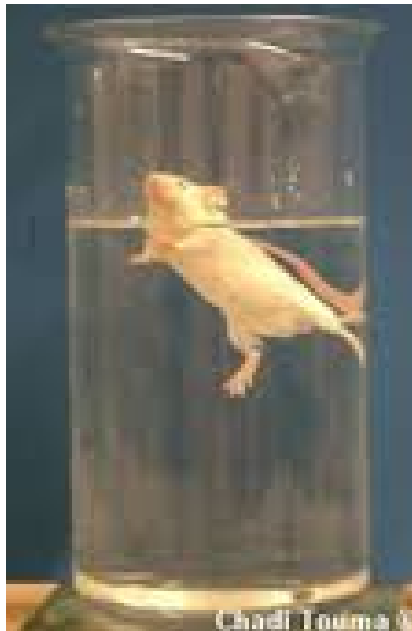


Figure 16 : Photographie montrant une expérience de la nage forcée

3. Etude électrophysiologique *in vivo* du NST et du SCN

i. Chirurgie

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

SCN : AP : -0,8mm ; L : 00 mm ; P : 8,8 – 9,3 mm

NST: AP: -3,8mm; L: -2,5 mm ; P : 6,8 – 8,5 mm

Une craniectomie est réalisée afin de placer l'électrode d'enregistrement selon les trois valeurs des coordonnées stéréotaxiques. La dure mère est ensuite dégagée avant de descendre l'électrode dans la structure souhaitée.

ii. Electrodes

Les microélectrodes sont préparées à partir de tubes capillaires en verre (150 F, WPI, Inc, Hertfordshire, UK) et étirées au moyen d'une étireuse horizontale. L'extrémité de l'électrode d'enregistrement est cassée sous microscope afin d'obtenir une ouverture dont le diamètre intérieur est inférieur à 1 μm . L'impédance est vérifiée et doit être comprise entre 8 et 12 M Ω . L'électrode est ensuite remplie avec le bleu de pontamine 1% dissout dans du NaCl 0,9%, et introduite dans le NST ou le SCN suivant les coordonnées respectives définies ci-haut. Le bleu de pontamine est injecté, à la fin de chaque séance d'enregistrement pour marquer l'endroit d'enregistrement.

iii. Enregistrement et acquisition des signaux

Les enregistrements électrophysiologiques des neurones du NST ont été réalisés chez des rats contrôles et ayant été traités au PQ/MB, alors que ceux des neurones du SCN ont été réalisés chez des rats contrôles et ayant subi des déplétions monoaminergiques. L'activité spontanée des neurones est filtrée (bande passante entre 300 Hz et 3 KHz) et amplifiée grâce au système « Neurolog » (Digitimer, USA). L'acquisition du signal est réalisée à l'aide du système « PowerLab » (AD Instruments, USA). Ce signal analogique est ensuite converti en signal numérique grâce au logiciel Chart 5 (AD Instruments, USA) qui permet la visualisation en temps réel.

Que cela soit pour les rats traités au PQ/MB et ou ayant subi des déplétions monoaminergiques et leurs témoins, l'activité électrique spontanée de chaque neurone est ensuite enregistrée de façon continue pendant 10min après vérification de la stabilité de son activité sur Chart 5.

iv. Analyse de l'activité électrique enregistrée

Les enregistrements sont analysés en « off-line » en utilisant trois logiciels de traitement du signal. D'abord, Le logiciel Chart5 avec sa composante «Spike histogram» (ADInstruments, USA) permet dans un premier temps de discriminer les potentiels d'action du bruit de fond. Ensuite, le logiciel «Neuroexplorer» (AlphaIOmega, Allemagne) permet de déterminer les paramètres électrophysiologiques comme la fréquence moyenne de décharge correspondant au nombre de potentiels d'action par seconde, l'intervalle moyen entre les potentiels d'action (Interspike interval ou ISI), ou encore le coefficient de variation de l'ISI, défini comme le rapport de la déviation standard sur l'ISI moyen, ici utilisé comme indice de régularité du mode de décharge. Finalement, un algorithme « pattern » mis au point au Laboratoire a été utilisé pour permettre la détermination du mode de décharge des neurones selon la méthode de (Kaneoke and Vitek, 1996). Cette méthode est basée sur le concept de distribution de densité et une définition statistique rigoureuse du mode de décharge. Ainsi, trois modes sont déterminés : régulier, irrégulier, et en bouffées (voir figure 24).

A la fin de chaque séance d'enregistrement électrophysiologique, et afin de localiser le site d'enregistrement, une injection iontophorétique (DAM 80i, WPI, UK) de bleu de pontamine est réalisée via la pipette d'enregistrement. Les animaux traités au PQ/MB et leurs témoins, ont été sacrifiés, puis les cerveaux prélevés, congelés dans de l'isopentane à - 45°C et stocké à - 80°C en vue de l'étude biochimique des contenus tissulaires en monoamines, Tandis que les animaux ayant subi des déplétions monoaminergiques ont été sacrifiés après perfusion, en vue d'une étude immuno-histochimique.

4. Etude biochimique :

Après l'enregistrement électrophysiologique et l'injection du bleu de pontamine, les rats ont été décapités et leur cerveaux prélevés rapidement et congelé dans l'isopentane à -45 °C. Les

structures cérébrales (Cortex et striatum gauches et droits) ont été prélevés à -20 °C par punch et placés dans des tubes eppendorf et conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation pour les dosages biochimiques. A ce moment, les structures, ont été retirées rapidement et directement placées dans la glace pour la pesée. Dès que le poids des échantillons a été déterminé, 200 µl d'HClO₄ (0.1N, 4 °C) sont rajoutés. Les structures ont été ensuite dissociées pendant 5 secondes environ par sonification à 4 °C et l'homogénat a été centrifugé à 13000 tours/min pendant 30 minutes à 4 °C. Le surnageant récupéré a subi des dilutions avant d'être finalement injecté dans le système de HPLC en phase inversée à des concentrations précises. Ce système qui nous a permis la séparation des catécholamines et des indolamines, est formé de plusieurs composantes : La phase mobile (ou solvant), la pompe, la phase stationnaire (ou colonne) et le détecteur. 20 µl du surnageant ont été dilués dans la phase mobile composée de la façon suivante : NaH₂PO₄ (60 mM), Na₂EDTA (0,1 mM), acide octylsulphonique (0,2 mM), 7 % méthanol et ajustée à un pH de 3.9 avec de l'acide orthophosphorique et filtrée à travers un filtre millipore à 0.22 µm. Le surnageant dilué est injecté dans la colonne (Cromasy1 C8, 4.6 x 150mm, 5µm, Touzard et Matignon, Paris), elle-même précédée d'une précolonne (Browlee-Newgard, RP-8, 15 X 3.2 mm, 7µM). Cette injection a été faite à l'aide d'un injecteur manuel (vanne rhéodyne 7725) équipé d'une boucle de 200 µl (injection en boucle partielle). Le système HPLC est piloté soit par le logiciel GOLD, le logiciel ChromaNav ou le logiciel Spike 2. La détection des différents composants a été faite par électrochimie de type coulométrique. Ce système se compose d'une cellule de garde (modèle 5021, ESA) dont le potentiel est fixé à 0,1 V, une cellule analytique (modèle 5011, ESA) et un détecteur Coulochem I ou II (ESA). Des potentiels de + 350 mV et - 270 mV ont été appliqués pour oxyder et réduire les composés, respectivement. Le traitement du signal ampérométrique se fait par le logiciel CED. Le seuil de détection pour les différentes molécules (rapport signal/bruit=3) est d'environ 15 pg/20µl injectés.

IV. Résultats :

1. L'effet de l'administration du PQ/MB

i. Réponses au PQ/MB

L'idée initiale de ce travail était de mettre en place deux groupes de rats : un groupe de rats contrôle et un autre groupe constitué de rats traité au PQ/MB. Ce traitement au PQ/MB consistait en deux injections d'une solution contenant du PQ (10mg/Kg) combiné au MB (30mg/Kg) par semaine et ce pendant 6 semaines, mais dès le début, les rats traités au PQ/MB ont montré plusieurs profils différents de réponses.

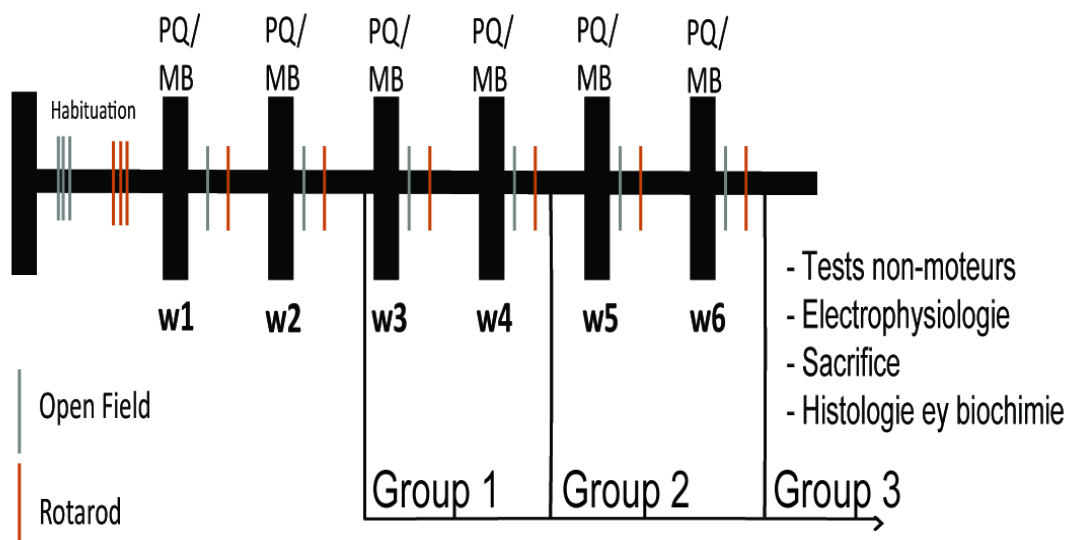


Figure 17 : Une représentation schématique du déroulement de l'expérimentation.

En effet, deux semaines après le début du traitement, les animaux traités ont manifesté trois réponses différentes : (1) La majorité des rats (group 1, n=16) ont montré une perte de poids rapide et sévère (Two way ANOVA, $F=19.19$, $p<0.001$) avec un tremblement de repos dans tout le corps accompagné de signes de problèmes pulmonaires ; Cinq rats de ce groupe sont mort et les onze restants ont été sacrifiés et leur cerveaux prélevés et conservés pour l'analyse

biochimique des monoamines. (2) Les animaux du groupe 2 (n=6) manifestaient seulement un tremblement de repos sans perte significative de poids, nous avons continué les injections pour ce groupe jusqu'à la quatrième semaine, quand ils ont montré à leur tour une chute sévère du poids (Two way ANOVA, $F=11.32$, $p<0.001$), nous avons décidé de sacrifier les rats de ce groupe et de prélever et conserver leurs cerveaux. (3) Enfin, seulement quatre rats sont restés insensibles aux injections du PQ/MB, tout au long des six semaines du traitement. (Two way ANOVA, $F=0.82$, $p=0.61$) (Voir figure 20)

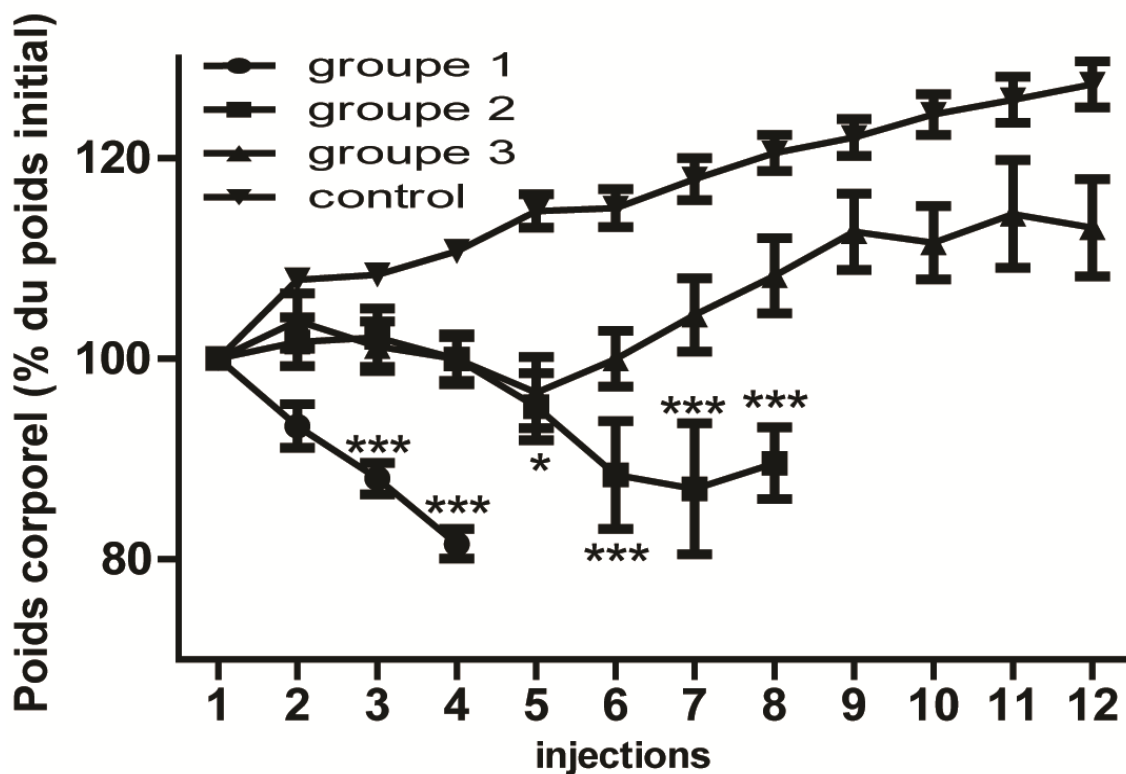


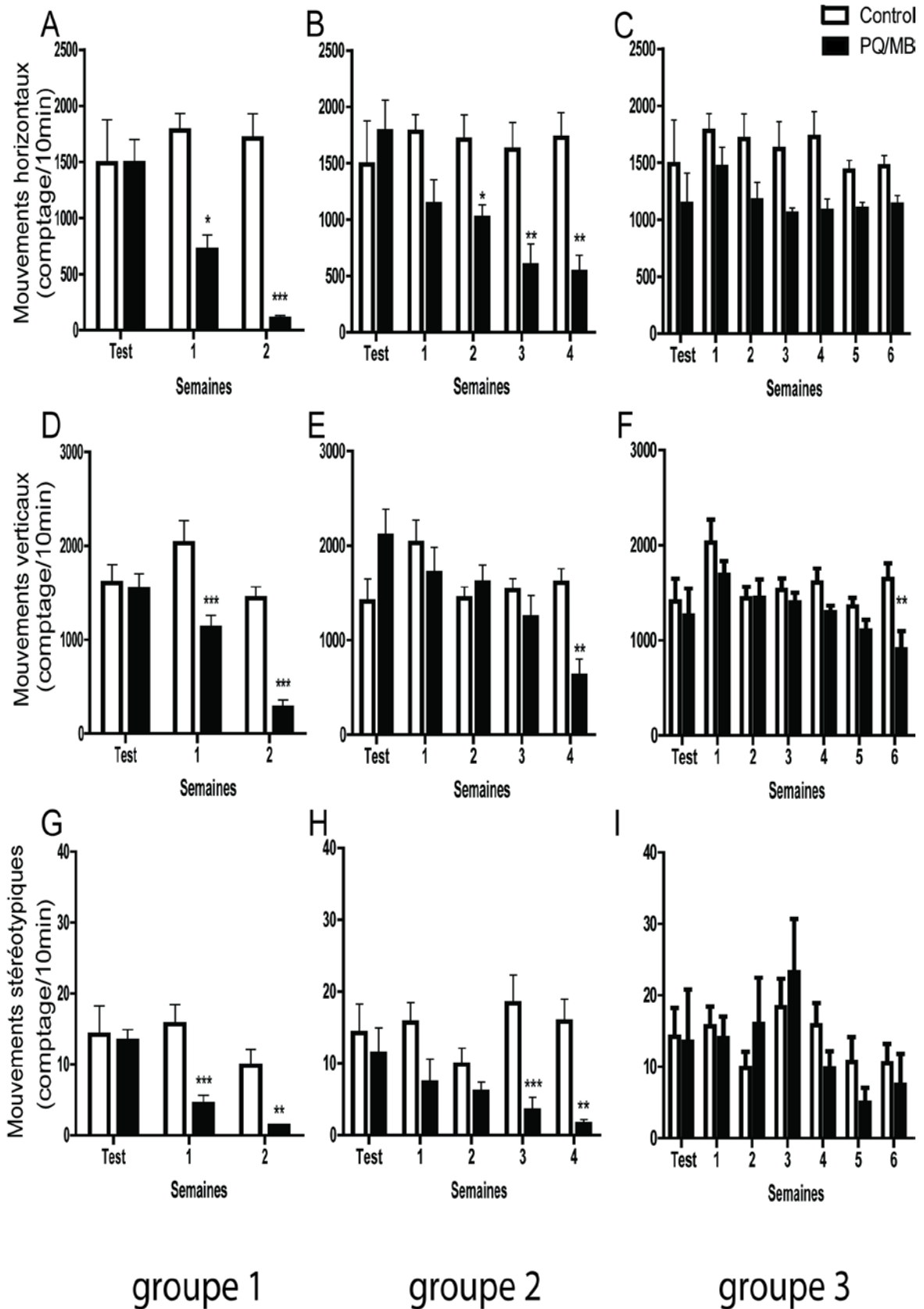
Figure 18 : L'effet du traitement PQ/MB sur le poids corporel.

Le traitement au PQ/MB, induit une réduction du poids corporel, seulement chez les animaux des groupes 1 et 2. Les données rapportées en moyen \pm SEM proviennent des groupes de rats 1 (n=16), 2 (n=6) et 3 (n=4) traités ainsi que du groupe control (n=8). Les comparaisons ont été réalisées en utilisant le test TWO-WAY ANOVA suivi par le post test de Bonferroni : * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

ii. Effet du PQ/MB sur l'activité locomotrice :

L'activité locomotrice a été évaluée par l'*Open Field* une fois par semaine chez les rats contrôles et après deux injections de PQ/MB et ce chez les rats traités. Comparés aux rats

contrôles, le traitement au PQ/MB a affecté les mouvements horizontaux et verticaux au fil du temps et ce, chez le groupe 1 (Two way ANOVA, $F= 7.611, p=0.001$ et $F= 7.554, p=0.001$ respectivement, Figure 3A and 3D) et le groupe 2 (Two way ANOVA, $F= 2.969, p<0.05$ et $F= 3,886, p<0.01$ respectivement Figure 3B et 3E). Contrairement aux rats du groupe 2 (Two way ANOVA, $F= 1.688, p= 0.168$, Figure 3H), les mouvements stéréotypés de ceux du groupe 1 ont été affectés (Two way ANOVA, $F=5,320, p<0.01$, Figure 3G). Finalement, l'injection du PQ/MB durant trois semaines, n'a affecté aucun des mouvements horizontaux (Two way ANOVA, $F= 0.218, p=0.969$, Figure 3C), verticaux (Two way ANOVA, $F= 1.279, p= 0.282$, Figure 3F) ou stéréotypés (Two way ANOVA, $F= 0.647, p= 0.691$, Figure 3I) chez les animaux du groupe 3. Les résultats de l'analyse de la deuxième session de dix minutes dans l'*Open Field*, chez les animaux du groupe 1, montre une réduction significative des mouvements horizontaux ($p<0.001$), verticaux ($p<0.01$) et stéréotypés ($p<0.001$), après la première semaine de traitement au PQ/MB, qui continue de baisser encore plus après la deuxième semaine ($p<0.001, p<0.001$ and $p<0.01$ respectivement). Pour le groupe 2, le début de la diminution de l'activité horizontale, n'apparaît qu'après la troisième semaine et six injections de PQ/MB ($p<0.05$) qui continue après la quatrième semaine d'injection ($p<0.01$). Aucune diminution significative dans l'activité verticale n'a été observée chez les rats du groupe 2 jusqu'à la quatrième semaine ($p<0.05$), alors que l'activité stéréotypée a diminué après trois semaines de traitement ($p<0.01$) et a continué après la quatrième semaine ($p<0.05$). Contrairement aux rats du groupe 1 et 2, l'activité locomotrice de ceux du groupe 3, n'a pas été affectée significativement même après six semaines de traitement au PQ/MB.



de l'activité locomotrice représente les nombre de mouvements horizontaux (A-C), verticaux (D-F) et stéréotypique (G-I) enregistrés durant la deuxième séance de 10 minutes, avant le début des injections et après chaque deux injections, chez les trois groupes d'animaux traités et chez les contrôles. Les données rapportées en moyen \pm SEM proviennent des groupes de rats 1 (n=16), 2 (n=6) et 3 (n=4) traités ainsi que du groupe control (n=8). Les comparaisons ont été réalisées en utilisant le test Two way ANOVA suivi par le post test de Bonferroni : * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

iii. Effet du traitement au PQ/MB sur la coordination motrice :

Le test du Rotarod a été utilisé pour évaluer l'effet du traitement au PQ/MB sur la coordination motrice et ce, une fois par semaine. Comparés aux contrôles, le traitement au PQ/MB, affecte significativement la performance des rats des groupes 1 et 2 sur le Rotarod (Two way ANOVA, $F=3.699$, $p<0.05$ and $F=6.042$, $p<0.001$ respectivement, Figure 20A et 20B). Chez les rats du groupe 1, la réduction du temps passé sur la barre rotative du Rotarod a débuté juste après deux injections ($p<0.05$). Ce temps a continué à chuter après le deuxième traitement ($p<0.001$). Chez les animaux du groupe 2, la moyenne du temps passé sur la barre du Rotarod, a aussi baissé seulement après la première semaine ($p<0.01$) et a continué à baisser après la deuxième ($p<0.01$), troisième ($p<0.001$) et quatrième semaine ($p<0.001$). Contrairement aux rats des groupe 1 et 2, la performance des animaux du groupe 3 n'a pas été affectée même après douze injections durant 6 semaines (Two way ANOVA, $F=0.078$, $p=0.998$, Figure 20C).

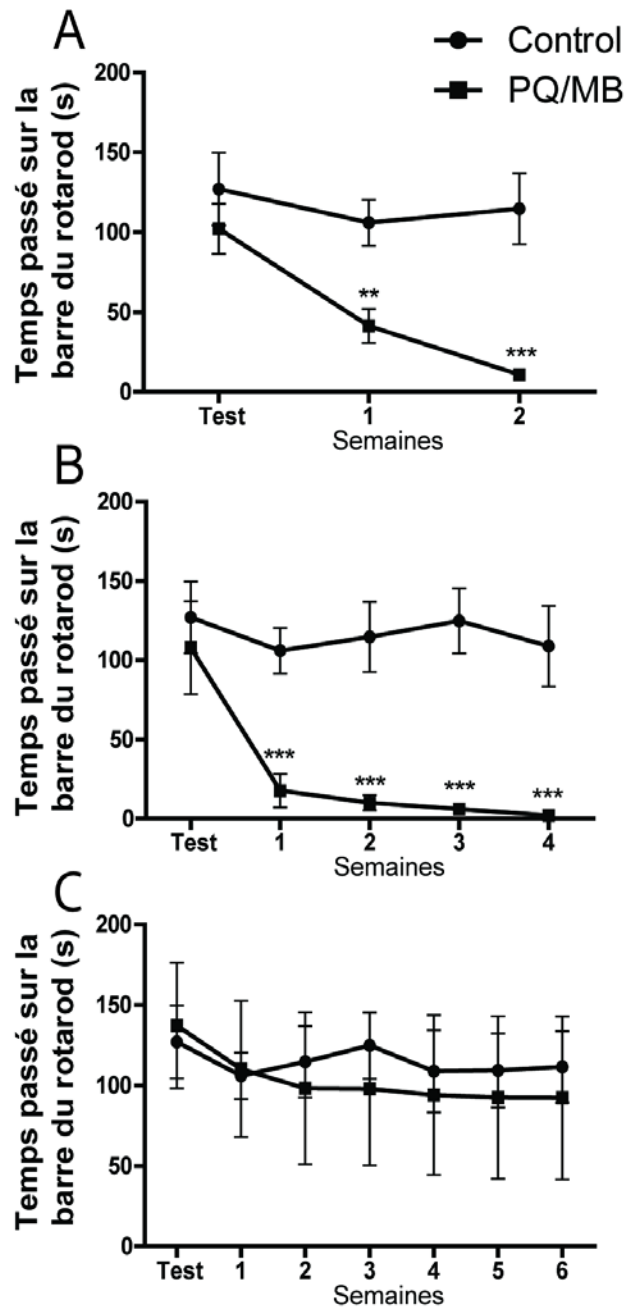


Figure 20: L'effet du traitement au PQ/MB sur la coordination motrice mesurée dans le rotarod.

Le traitement au PQ/MB, réduit le maintien des rats des groupes 1 et 2 sur la barre du Rotarod, mais pas celui du groupe 3. Les histogrammes représentent la durée moyenne du maintien des rats sur la barre du Rotarod, avant les injections et après chaque deux injections, pour les rats des trois groupes traités et du groupe contrôle. Les données rapportées en moyen \pm SEM proviennent des groupes de rats 1 (n=16), 2 (n=6) et 3 (n=4) traités ainsi que du groupe control (n=8). Les comparaisons ont été réalisées en utilisant le test TWO-WAY ANOVA suivi par le post test de Bonferroni : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

iv. L'intoxication au PQ/MB induit l'anxiété :

La chute rapide et sévère du poids des animaux du groupe 1 accompagnée par les problèmes respiratoires nous ont empêchés d'évaluer le comportement anxieux chez ces animaux. Pour les groupes 2 et 3, le comportement anxieux a été évalué avec le labyrinthe en croix surélevé (EPM), à la fin du traitement au PQ/MB, c'est-à-dire, après quatre semaines d'injection au PQ/MB pour les animaux du groupe 2 et six semaines pour les animaux du groupe 3. Les résultats pour ces deux groupes montrent que le PQ/MB réduit significativement de façon spectaculaire le nombre d'entrées dans les bras ouverts (-95.23% and -98.96% respectivement, Kruskal-Wallis one-way ANOVA suivi par *Dunn's post-test*, $p < 0.01$, Figure 21A). Le temps passé dans les bras ouverts a été aussi affecté par le traitement ($p < 0.01$, Kruskal-Wallis test, Figure 21B), il a été réduit de -99.01% chez le groupe 2 et de 92.5% chez le groupe 3.

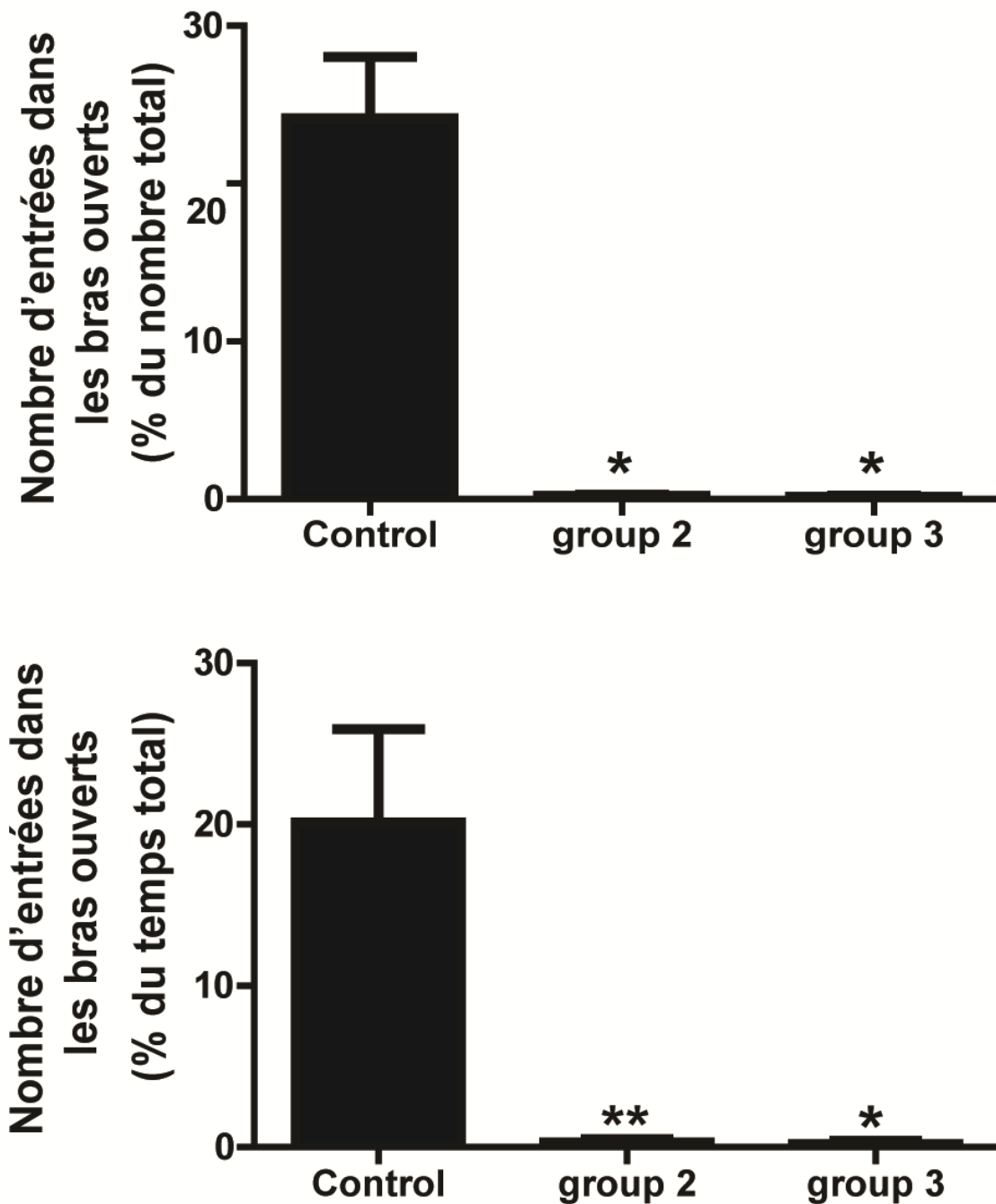


Figure 21: L'effet du traitement au PQ/MB sur l'humeur.

Le traitement au PQ/MB induit l'anxiété chez les groupes 2 et 3 par rapport aux contrôles. (A) les histogrammes montrent le pourcentage du nombre d'entrées dans les bras ouverts dans l'EPM par rapport au nombre total du nombre d'entrées dans les quatre bras. (B) Les histogrammes montrent le pourcentage du temps passé dans les bras ouverts par rapport au temps total passé dans les quatre bras. Les données rapportées en moyen \pm SEM proviennent des groupes de rats 2 (n=5) et 3 (n=4) traités ainsi que du groupe control (n=8). Les comparaisons ont été réalisées en utilisant le test de Kruskal-Wallis One way ANOVA suivi par le post test de Dunn's : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

v. L'intoxication au PQ/MB induit un comportement dépressif :

Pour les mêmes raisons que l'évaluation de l'anxiété, les animaux du groupe 1 n'ont pas été évalués pour le comportement dépressif. Le comportement dépressif a été évalué chez les rats contrôles et traités au PQ/MB, en utilisant le test de la nage forcée à la fin des injections. Les résultats montrent que l'intoxication au PQ/MB augmente significativement le temps d'immobilité chez les rats des groupes 2 et 3 (86.00 ± 23.58 sec and 99.60 ± 4.85 secondes respectivement) contre 6.17 ± 1.49 sec chez les rats contrôles (Kruskall-Wallis suivi de *Dunn's post-test*, $p < 0.01$, Figure 22A). En outre, l'anhédonie a été évaluée en utilisant le test de la préférence au sucrose. Les résultats montrent une réduction de la consommation du sucrose chez les rats des groupes 2 et 3, comparés aux animaux contrôles (-30.66% et -33.59% respectivement, Kruskall-Wallis suivi de *Dunn's post-test*, $p < 0.01$, Figure 22B).

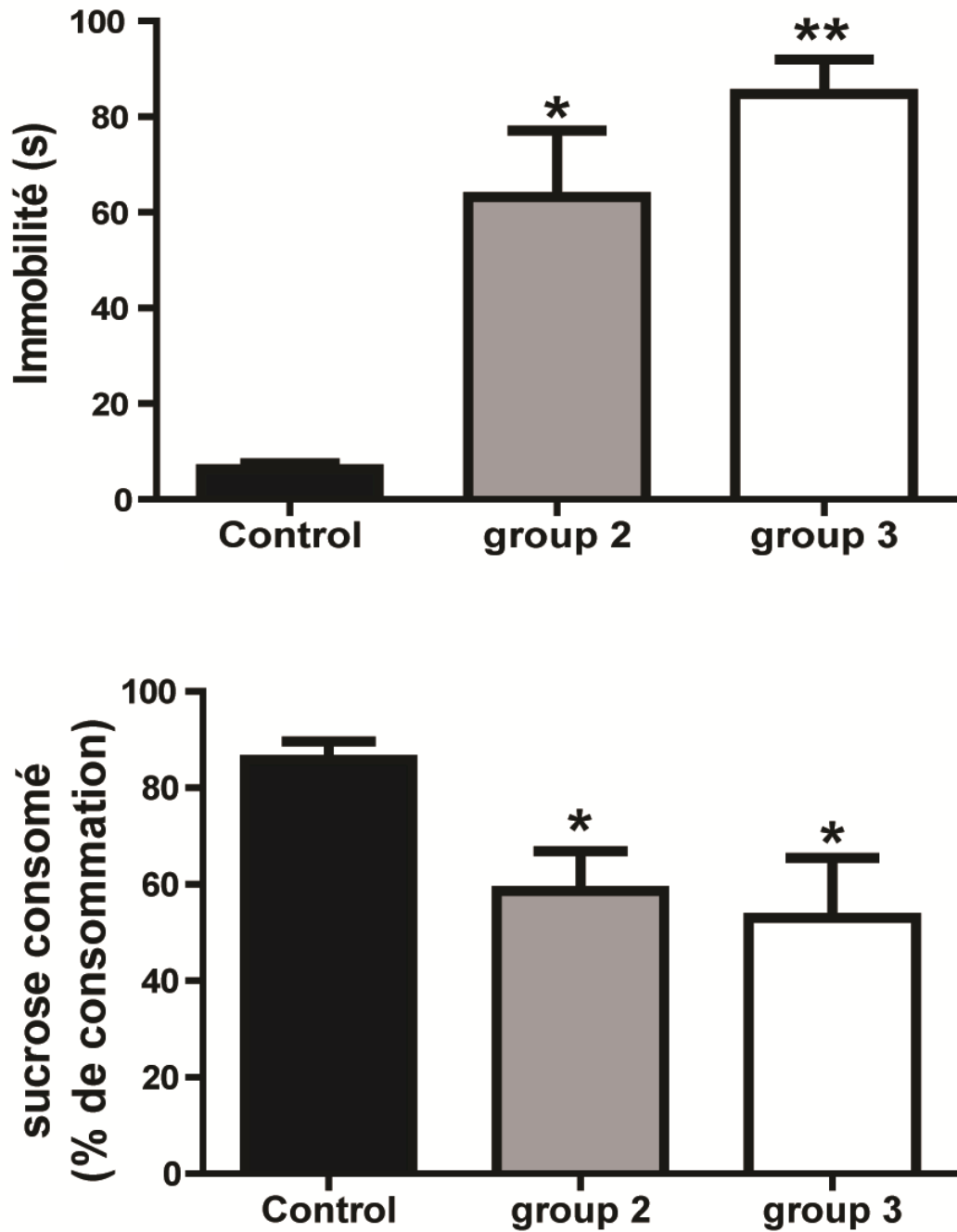


Figure 22 : L'effet du traitement au PQ/MB sur l'humeur.

Le traitement au PQ/MB induit un comportement dépressif (A) et de l'anhédonie (B) chez les rats des groupes 2 et 3 par rapport aux contrôles. (A) Les histogrammes montrent la durée d'immobilité dans le test de la nage forcée. (B) les histogrammes montrent le pourcentage du liquide sucré consommé par rapport à la consommation totale. Les données rapportées en $\text{moyen} \pm \text{SEM}$ proviennent des groupes de rats 2 ($n=5$) et 3 ($n=4$) traités ainsi que du groupe control ($n=8$). Les comparaisons ont été réalisées en utilisant le test de Kruskal-Wallis One way ANOVA suivi par le post test de Dunn's : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

- vi. L'intoxication au PQ/MB induit une baisse du contenu tissulaire de la dopamine mais pas celui de la noradréline ou la sérotonine

Comme le montre la figure 23, l'administration systémique du PQ/MB, produit une altération significative de la concentration tissulaire de la dopamine (One way ANOVA, $F= 6.101$, $p=0.004$) ainsi que de son métabolite le DOPAC (Kruskall-Wallis, $p=0.029$), mais pas celui de la sérotonine ou son métabolite le 5-HIAA (Kruskall-Wallis one-way ANOVA, $p=0.379$ et One way ANOVA, $F= 0.490$, $p=0.693$ et $F= 0.494$, $p=0.690$ respectivement, Figure 23D et 23E). Comparé aux rats contrôles, le traitement au PQ/MB réduit significativement le contenu tissulaire de la dopamine striatale chez les animaux du groupe 1 (54.53%; $p<0.01$), groupe 2 (46.6% ; $p<0.05$) et celui du groupe 3 (49.85% ; $p<0.05$) (Figure 23A). Concernant le DOPAC, l'intoxication au PQ/MB, ne produit une diminution significative que chez les rats du groupe 1 par 48.89% ($p<0.05$), mais une tendance élevée dans ce sens chez les rats des groupes 2 et 3 (Figure 23B). Au niveau du cortex frontal, la concentration de la noradréline n'a pas été affecté par l'intoxication PQ/MB et ce pour les trois groupes traités (One way ANOVA, $F= 0.490$, $p=0.693$; Figure 23C).

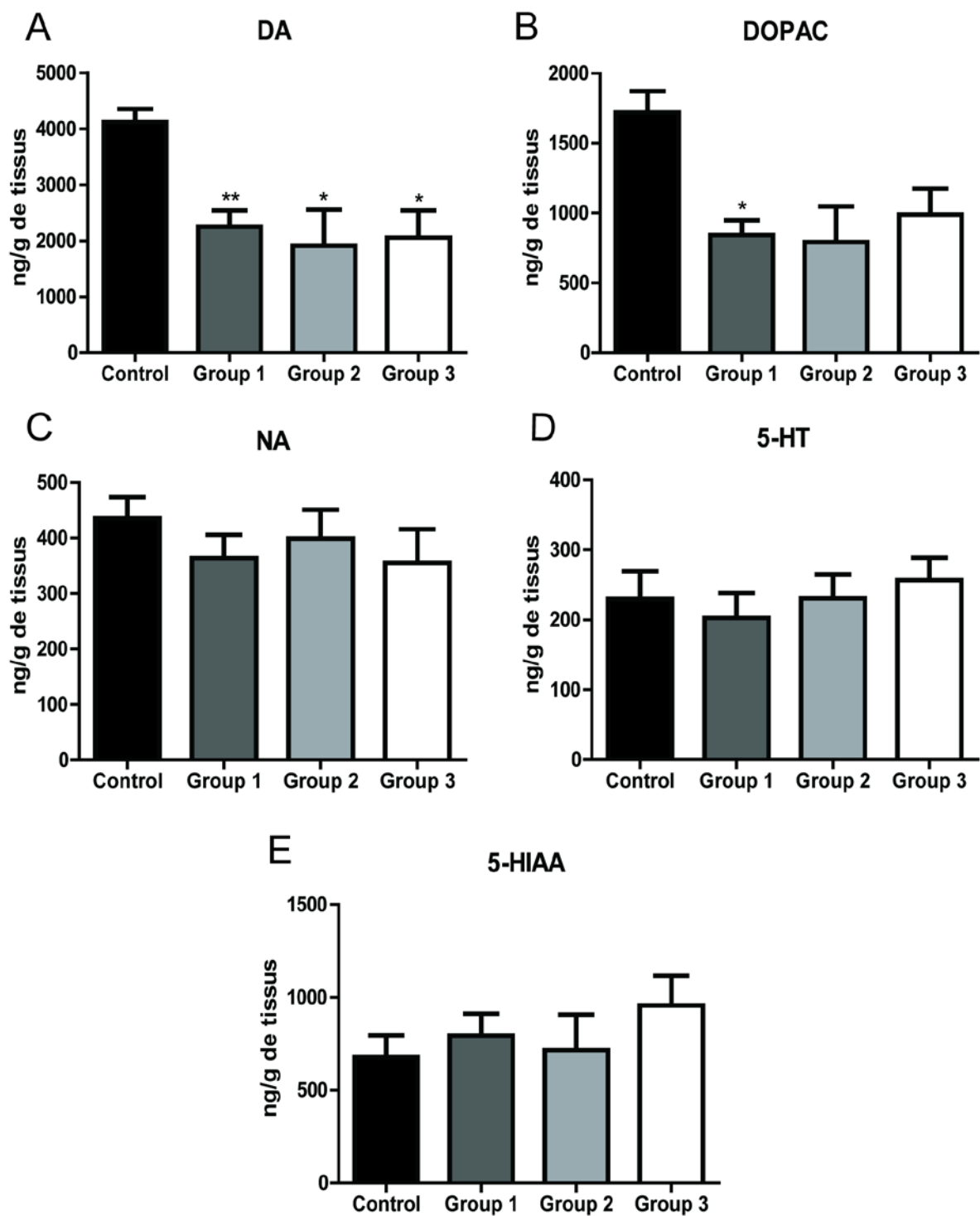


Figure 23 : L'analyse biochimique des contenus tissulaires des monoamines et leurs métabolites dans le striatum et le cortex frontal.

Les histogrammes montrent les concentrations tissulaires de la dopamine (DA, A) et son métabolite la DOPAC (B) dans le striatum et la noradrénaline (NA, C), la sérotonine (5-HT, D) et son métabolite (5-HIAA, E) dans le cortex frontal chez des rats traités avec le PQ/MB comparés aux contrôles. Les données rapportées en moyen \pm SEM des concentrations en ng/g du tissu. Les comparaisons ont été réalisées en utilisant le test de Kruskal-Wallis ONE-WAY ANOVA suivi par le post test de Dunn's ou par le test ONE-WAY ANOVA suivi du post-test Bonferroni : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en comparaison avec les contrôles.

vii. Le traitement au PQ/MB induit des changements de l'activité électrique des neurones du NST chez les animaux de tous les groupes traités

Chez les rats contrôles, la moyenne de la fréquence de décharge des neurones du NST (n=43) était de 11.36 ± 1.25 potentiels d'actions/s (PAs/s). La majorité des neurones déchargeaient de façon régulière (69.04%, Figure 24A) et seulement peu de neurones déchargeaient de façon irrégulière (19.04%, Figure 24B) ou en bouffées (11.90%, Figure 6C). Comparés aux rats contrôles, le traitement au PQ/MB, affecte significativement la fréquence de décharge chez les rats du groupe 1 (4.21 ± 1.01 PAs/s, $p < 0.001$), groupe 2 (5.13 ± 0.79 PAs/s, $p < 0.001$), et groupe 3 (2.96 ± 0.5 PAs/s, $p < 0.001$) (Kruskall-Wallis One-way ANOVA suivi du test de *Dunn's post-test*, $p < 0.001$, Figure 24D). En plus, l'analyse du coefficient de variation (CV) de la distribution de l'intervalle interspike (ISI, intervalle entre les potentiels d'action) montre un changement du mode de décharge des neurones du NST chez les animaux intoxiqués au PQ/MB. En effet, Cette intoxication augmente significativement le CV des neurones chez les animaux du groupe 1 (1.25 ± 0.15), groupe 2 (1.16 ± 0.18) et group 3 (1.3 ± 0.12) comparé aux rats contrôles (0.61 ± 0.06) (Kruskall-Wallis One way ANOVA suivi de *Dunn's post-test*, $p < 0.001$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectivement, Figure 24E). Ce constat se traduit par une diminution significative des neurones déchargeant de façon régulière (14.7%, 27.02% et 8% chez les rats du groupe 1, groupe 2 et group 3 respectivement) alors que les pourcentages des cellules déchargeant de façon irrégulière (44.4%, 43.24% et 44% chez les rats du groupe 1, groupe 2 et group 3 respectivement) et en bouffées (41.17%, 29.72% et 48% chez les rats du groupe 1, groupe 2 et group 3 respectivement) a significativement augmenté ($\chi^2 = 43.64$, $p < 0.002$, Figure 24F). De façon identique, le pourcentage des potentiels d'action en bouffées, chez les rats intoxiqués au PQ/MB avait augmenté (23.52 ± 4.6 , 22.31 ± 3.32 , $29.33 \pm 4.36\%$ Chez les groupes 1, 2 et 3 respectivement) comparée aux rats contrôles ($8.97 \pm 2.05\%$) (Kruskall-Wallis One way ANOVA suivi par *Dunn's post-test*, $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$ respectivement, Figure 24H). Le nombre

de bouffées avait augmenté significativement seulement chez les rats des groupe 2 (0.057 ± 0.009) et 3 (0.082 ± 0.018) comparé aux rats contrôles (0.035 ± 0.01) (Kruskall-Wallis One way ANOVA suivi par *Dunn's post-test*, $p < 0.05$ et $p < 0.001$ respectivement, Figure 24G).

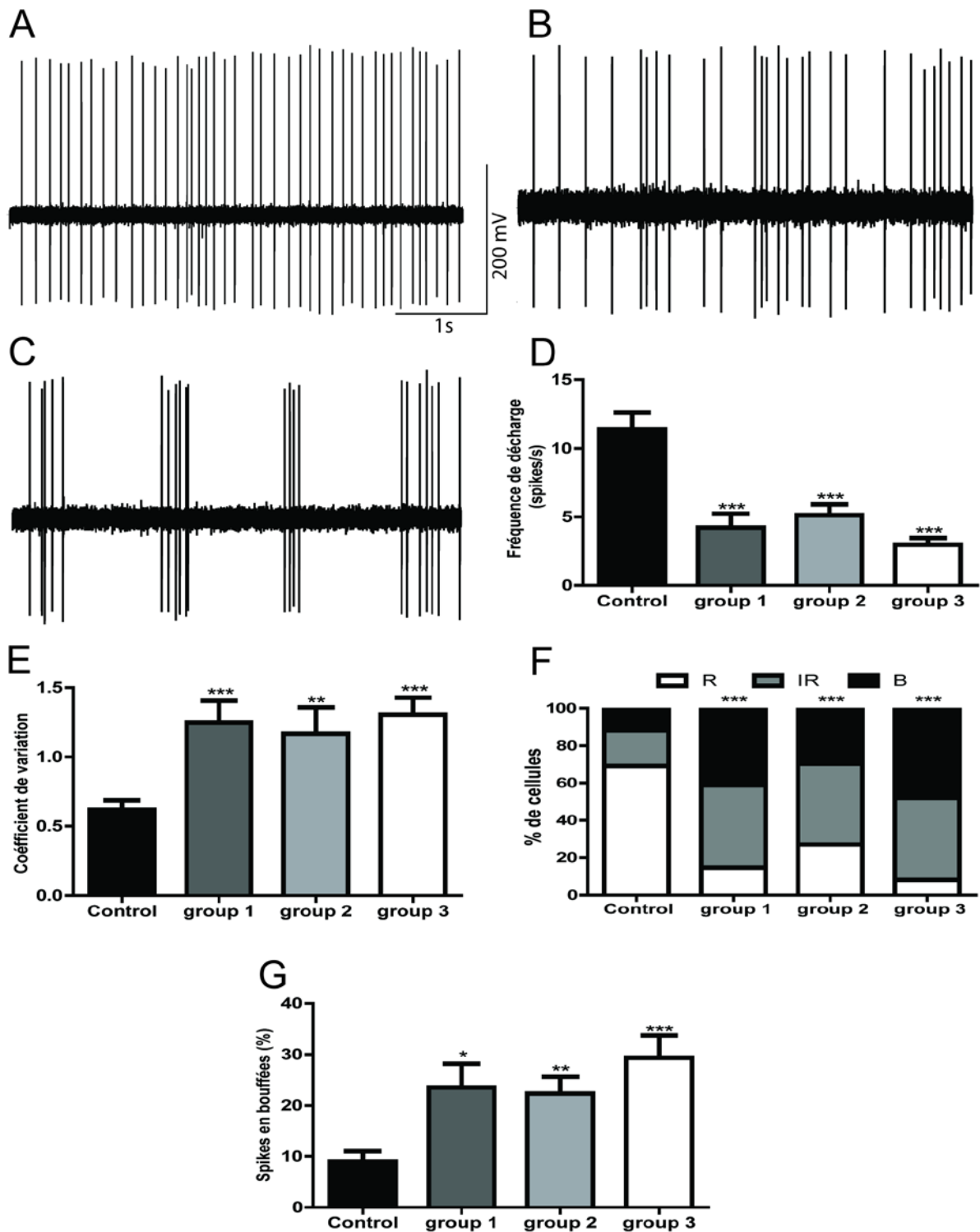


Figure 24 : L'effet du traitement au PQ/MB sur l'activité électrique des neurones du NST.

Le traitement au PQ/MB réduit la fréquence de décharge et induit une augmentation du mode de décharge en bouffées par rapport au mode de décharge régulier dans le NST chez les rats des trois groupes traités par rapport aux rats contrôles. (A-C) des exemples représentatifs de trains de potentiels d'action dans des cellules du NST qui déchargent en (A) régulier, (B) irrégulier et (C) en bouffées. (D) Le histogramme représente la fréquence de décharge dans les cellules du NST. (E) L'histogramme montre le coefficient de variation. (F) L'histogramme montre la proportion de cellules du NST déchargeant en régulier, irrégulier et en bouffées. (G) L'histogramme montre le pourcentage de bouffées par seconde (H) L'histogramme montre le pourcentage de potentiels d'action en bouffées. Les données rapportées en $\text{moyen} \pm \text{SEM}$ proviennent des groupes de rats 1, 2 et 3 traités ainsi que du groupe control ($n=8$). Les comparaisons ont été réalisées en utilisant le test de Kruskal-Wallis ONE-WAY ANOVA suivi par le post test de Dunn's pour (D, E, H) et le test de Chi^2 pour le mode de décharge (F) : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ en comparaison avec les contrôles.

2. Effets des lésions sur l'activité électrique du SCN

Les enregistrements électrophysiologiques de l'activité électrique de 453 cellules du SCN a été enregistrée et analysée chez 52 rats, tous groupes confondus. Seuls ont été retenus les rats chez qui le point du bleu de Pontamine a été identifié dans le SCN (Figure 25).



Figure 25 : Localisation du site d'enregistrement sur une coupe du cerveau montrant le SCN.

Le tableau, suivant résume le nombre de neurones retenus pour l'analyse des données enregistrées chez les rats de chaque groupe étudié :

	Groupe DA	Groupe DA + NA	Groupe DA + 5-HT	Groupe triple DA+NA+5HT	Groupe Contrôle
Nombre de neurones	65	136	67	100	85
Nombre de rats	9	13	6	10	14

Tableau 3 : Tableau récapitulatif de l'effectif de chaque groupe, et les produits utilisés pour réaliser chacune des déplétions.

i. Caractérisation

L'activité électrique d'un totale de 85 cellules des SCN a été enregistrée chez 14 rats contrôles. Les résultats montrent que les fréquences de décharge vont de 0.04 à 6.68 PAs/seconde avec une moyenne de 1.61 ± 0.16 (n=85, Figure 28) La moyenne du CV (Coefficient de variation) de l'ISI (L'intervalle entre potentiels d'action ; Interspike Interval) était de 2.04 ± 0.21 (Figure 29). Le pourcentage de potentiels d'action dans une bouffée est de 34.13 ± 2.63 (Figure 30). La majorité des neurones du SCN sont caractérisés par un mode de décharge en bouffées (48/85, 56%), alors que seulement 31% (26/85) sont irréguliers et 13% (11/85) sont réguliers (Figure 26).

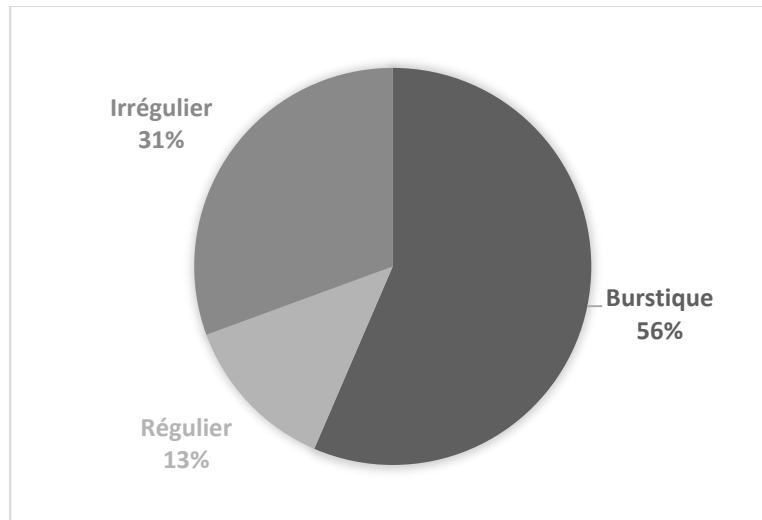


Figure 26: Graphique représentant la distribution des modes de décharge des neurones enregistrés dans le SCN.

ii. Effet des déplétions monoaminergiques

Trois semaines après les déplétions, les enregistrements électrophysiologiques commencent pour chaque groupe de rats ayant subi une lésion monoaminergique ou reçu une injection de NaCl. Le tableau ci-dessus résume le nombre de neurones retenus pour chaque groupe et le nombre de rats utilisés.

Comparés au rats contrôles, la moyenne de la fréquence de décharge des neurones du SCN a significativement été affectée par les déplétions (Kruskall-wallis One way ANOVA suivi d'un post test Dunn's, $H=21.36$, $p<0.001$). Elle a augmenté significativement chez les rats avec une double déplétion DA + NA (2.92 ± 0.27 , $p<0.05$) et DA + 5-HT (3.41 ± 0.46 , $p<0.05$) ainsi que chez le groupe des animaux avec une triple déplétion (4.23 ± 0.47 , $p<0.01$). Par contre chez les rats du groupe avec une déplétion en DA seule, une tendance à l'augmentation a été observée mais sans qu'elle soit significative. Le groupe des animaux avec une triple déplétion a été aussi affecté par rapport au groupe DA seule ($p<0.05$) (Figure 27).

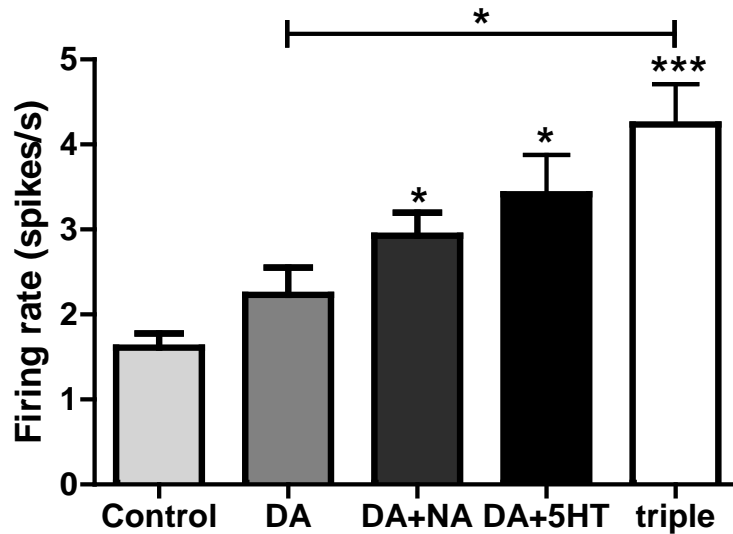


Figure 27 : L'effet des déplétions monoaminergiques sur la fréquence de décharge des neurones du SCN.

Les histogrammes représentent les moyennes de fréquence de décharge chez les différents groupes de rats avec déplétions ainsi que chez les rats contrôles. Les données rapportées en moyen \pm SEM proviennent des groupes de rats avec des déplétions dopaminergique seule ou combinée avec des déplétions NA + 5-HTergiques ou encore des triples déplétions ainsi que du groupe control. Les comparaisons ont été réalisées en utilisant le test de Kruskal-Wallis One way ANOVA suivi par le post test de Dunn's: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ en comparaison avec les contrôles.

Egalement le CV de l'ISI a été affecté chez les groupes avec des déplétions (Kruskal-wallis One Way ANOVA suivi d'un post test Dunn's, $H=18.40$, $p < 0.001$) avec une baisse significative chez les rats du groupe avec une déplétion en DA seule (1.17 ± 0.06 , $p < 0.05$) et les groupes avec une double déplétion DA + NA (1.42 ± 0.1 , $p < 0.01$) ou une déplétion DA + 5-HT (1.37 ± 0.12 , $p < 0.01$), de même que pour le groupe avec une triple déplétion (1.49 ± 0.15 , $p < 0.01$) (Figure 28).

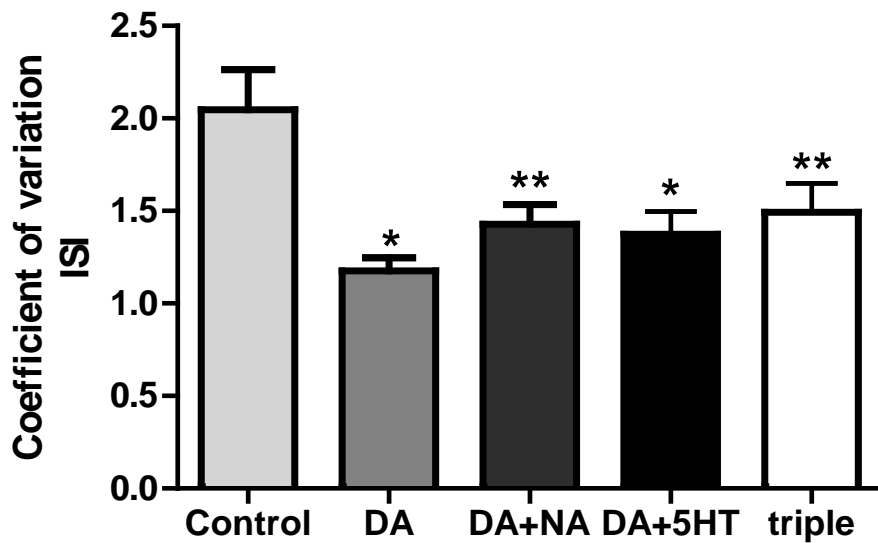


Figure 28: L'effet des déplétions monoaminergiques sur la coefficient de variation des intervalles entre les potentiels d'action (ISI) des neurones du SCN.

Les histogrammes représentent les moyennes des coefficients de variation de l'ISI chez les différents groupes de rats avec déplétions ainsi que chez les rats contrôles. Les données rapportées en moyen ± SEM proviennent des groupes de rats avec des déplétions dopaminergique seule ou combinée avec des déplétions NA + 5-HTergiques ou encore des triples déplétions ainsi que du groupe control. Les comparaisons ont été réalisées en utilisant le test de Kruskal-Wallis ONE-WAY ANOVA suivi par le post test de Dunn's: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ en comparaison avec les contrôles.

Dernier paramètre analysé est le pourcentage de potentiels d'action dans les bouffées, qui a été affecté chez tous les groupes avec des déplétions monoaminergiques (Kruskal-wallis One Way ANOVA suivi d'un post test Dunn's, $H=23.25$, $p < 0.001$). Ce pourcentage a baissé chez le groupe des animaux avec une déplétion en DA ($21,72 \pm 2.37$, $p < 0.05$) ainsi que chez les rats des groupes avec une double déplétion DA + NA et DA + 5-HT et aussi avec une triple déplétion ($24,03 \pm 1.98$, $p < 0.05$; $22,86 \pm 2.52$ et $18,97 \pm 2.07$ respectivement) (Figure 29).

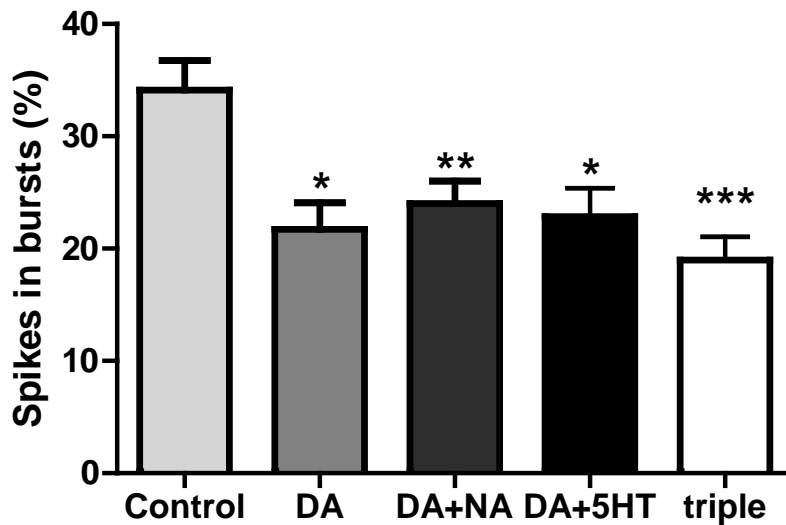


Figure 29 : L'effet des déplétions monoaminergiques sur le pourcentage de potentiels d'action en bouffées des neurones du SCN.

Les histogrammes représentent les moyennes des pourcentages de potentiels d'action en bouffées chez les différents groupes de rats avec déplétions ainsi que chez les rats contrôles. Les données rapportées en moyen \pm SEM proviennent des groupes de rats avec des déplétions dopaminergique seule ou combinée avec des déplétions NA + 5-HTergiques ou encore des triples déplétions ainsi que du groupe control. Les comparaisons ont été réalisées en utilisant le test de Kruskal-Wallis ONE-WAY ANOVA suivi par le post test de Dunn's: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ en comparaison avec les contrôles.

Le mode de décharge des neurones du SCN a quant à lui été affecté chez les rats des groupes avec les différentes lésions ($\chi^2 = 27.58$, ddl = 8, $p < 0.001$). La déplétion en DA seule augmente significativement la proportion des neurones irréguliers à 48.43% et réduit celle des neurones en bouffées à 39.06%, celle des neurones réguliers est restée stable à 12.5% ($\chi^2 = 7.21$, ddl = 2, $p = 0.02$) alors que la double déplétion en DA + NA augmente encore plus la proportion des neurones irréguliers (50.73%) et réduit celle des neurones déchargeant en bouffée (35.29%), celle des neurones réguliers n'a pas changé (13.97%) ($\chi^2 = 9.91$, ddl = 2, $p = 0.007$). La double déplétion DA + 5HT quant à elle, suit le même schéma avec une augmentation des neurones irréguliers (49.25%) et une diminution de celle des neurones déchargeant en bouffées (38.8%) et une stabilisation des neurones réguliers (11.94%) ($\chi^2 = 7.67$, ddl = 2, $p = 0.02$). Finalement la triple déplétion augmente considérablement la proportion des neurones irréguliers (66.33%) et

réduit celle des neurones en bouffées (25.74%) alors que celle des neurones réguliers a été légèrement réduite (7.92%) ($\chi^2 = 25.87$, $ddl = 2$, $p < 0.001$). Le mode de décharge des neurones du SCN du groupe des rats triplement lésés a été plus affecté par rapport aux rats avec une déplétion en DA seule ($\chi^2 = 6.55$, $ddl = 2$, $p < 0.03$) (Figure 30).

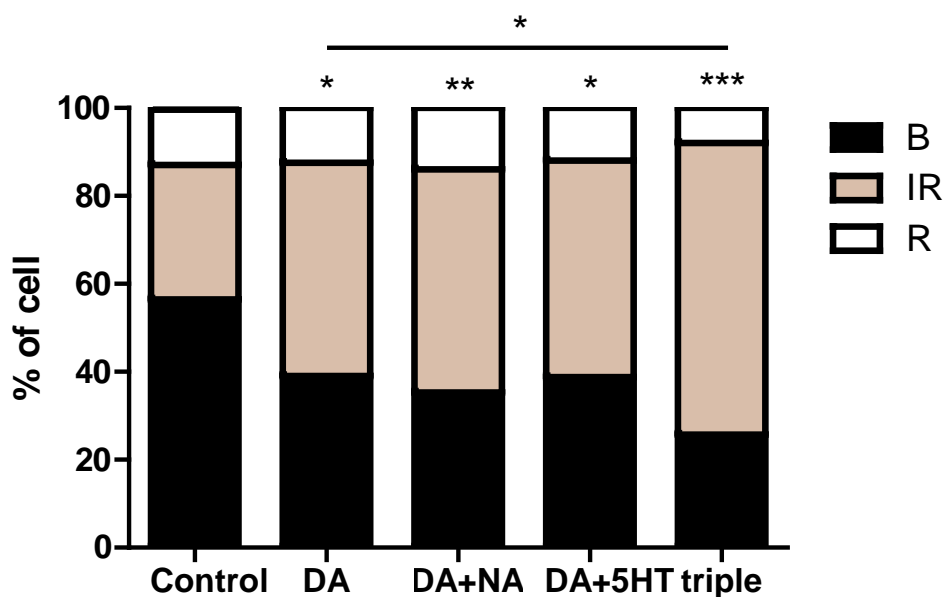


Figure 30: L'effet des déplétions monoaminergiques sur la distribution des modes de décharge dans les cellules du SCN.

Les données rapportées en moyen \pm SEM proviennent des groupes de rats avec des déplétions dopaminergique seule ou combinée avec des déplétions NA + 5-HTergiques ou encore des triples déplétions ainsi que du groupe control. Les comparaisons ont été réalisées en utilisant le test de Chi² pour le mode de décharge: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ en comparaison avec les contrôles.

V. Discussion:

1. Discussion de la première partie :

Les résultats de cette étude ont montré que les animaux exposés à l'effet toxique du PQ/MB manifestent différentes réponses comportementales : i) une partie des animaux (groupe 1) présente des troubles moteurs précoces et une perte de poids brusque et sévère accompagnée par un tremblement sévère, ii) une autre partie (groupe 2) a développé des troubles moteurs et non-moteurs relativement tardifs, accompagnés d'une perte de poids significative avec un léger tremblement qui apparaissent au moins à la quatrième semaine après le début du traitement, iii) enfin, le reste des animaux traités (groupe 3) a développé un déficit moteur mineur qui apparaît seulement après la cinquième semaine de traitement, sans qu'il y ait une perte de poids, mais accompagné de troubles non-moteurs significatifs. Pour les trois groupes, ces problèmes moteurs et non-moteurs vont de pair avec une réduction significative du contenu tissulaire en DA et son métabolite le DOPAC, aussi bien qu'un changement au niveau de l'activité électrique des neurones du NST. Cependant, le contenu tissulaire de la noradrénaline et de la sérotonine et son métabolite 5-HIAA n'est pas affecté par l'intoxication au PQ/MB.

Le but principal de cette partie du projet était d'évaluer la pertinence des modèles animaux employant le PQ/MB pour étudier la physiopathologie de la MP. En effet, pour considérer une molécule comme une neurotoxine impliquée dans l'induction de déficits similaire à ceux de la MP ou candidate pour être employée chez des modèles animaux de la maladie, ceci requiert des preuves que l'administration de cette molécule induit des dysfonctionnements moteurs et/ou non-moteurs reflétant la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée et des neurones issus d'autres structure non-dopaminergiques, notamment ceux des systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques. La formation de corps d'inclusions au niveau des

cellules survivantes et plus importante encore, la reproductibilité qui est un élément très important pour la mise en place de modèles animaux efficaces (Cicchetti et al., 2009) sont également des conditions nécessaires pour la sélection de ce modèle. Nous avons essayé de vérifier si ce modèle de PQ/MB remplit les conditions de ces exigences.

Nos résultats montrent que le traitement au PQ/MB induit chez la majorité des animaux traités une perte significative du poids avec un tremblement de repos dans tout le corps, accompagnée de troubles respiratoires traduisant des problèmes pulmonaires. Cependant, d'autres rats intoxiqués au PQ/MB dans les mêmes conditions ne montrent aucune perte de poids ni n'accusent de problèmes pulmonaires. La présence de problèmes pulmonaires a été déjà constatée chez des humains exposés au PQ (Papiris et al., 1995) et chez des animaux expérimentaux intoxiqués au PQ/MB (Dey et al., 1990; Xiangdong et al., 2011). Chez les animaux du laboratoire exposés au PQ seul ou combiné avec le MB, se différencient deux groupes, les animaux du premier ne montrent aucun signe de difficultés respiratoires, alors que ceux du deuxième souffrent sévèrement de problèmes pulmonaires. Satomi et ses collègues (Satomi et al., 2004) ont rapporté une fibrose pulmonaire chez une partie des rats intoxiqués au PQ et pas de signes de problèmes pulmonaires chez une autre partie des animaux. Aussi, nos résultats avec d'autres études (Cicchetti et al., 2005; Saint-Pierre et al., 2006; Satomi et al., 2004) qui rapportent cette différenciation montrent que le PQ/MB entraîne différents effets selon la vulnérabilité individuelle de chaque animal qui peut être attribuée à la différence d'expression ou de mutations de gènes entre les animaux. La perte de poids peut être liée aux complications pulmonaires, mais elle a été attribuée plutôt au fait que le PQ s'accumule préférentiellement dans l'hypothalamus (Corasaniti and Nistico, 1993) qui est impliqué dans la régulation de la prise alimentaire et le contrôle du poids corporel (Krauchi et al., 1984; van der Gugten et al., 1977).

Les troubles moteurs constatés et évalués par les tests de l'Open Field et du Rotarod ont été aussi différents selon les rats et ce, que cela soit sur le fait de l'apparition de ces problèmes ou non, ou sur le moment de leur apparition. Alors qu'une rapide et brusque réduction de l'activité locomotrice a été montrée chez les animaux du groupe 1, une réduction progressive a été montrée chez les animaux du groupe 2. Cependant, les animaux du groupe 3, n'ont pas montré de baisse significative de leur activité locomotrice, même après un plus grand nombre d'injections et sur une plus longue durée. Le même schéma est observé pour le Rotarod, qui montre que les animaux du groupe 3 ayant reçu le plus d'injections ne montrent aucune baisse au niveau de la coordination motrice, alors que celle des groupes 1 et 2 a été considérablement affectée. Les problèmes moteurs observés chez les animaux du groupe 1 et 2, sont en accord avec des études précédentes chez le rat et la souris (Cicchetti et al., 2005; Fahim et al., 2013; Thiruchelvam et al., 2003). Toutefois, les résultats observés chez les rats du groupe 3, qui montrent une insensibilité vis-à-vis du traitement au PQ/MB, n'ont pas été décrits dans la littérature ; ils démontrent que les rats ne sont pas vulnérables de façon égale et reproductible, et qu'il y a des paramètres individuels qu'il faut prendre en considération.

Contrairement au comportement moteur, qui a été bien étudié et documenté chez les animaux de laboratoires exposés au PQ/MB, le comportement non-moteur n'a pas bénéficié d'autant d'intérêt et seules quelques études se sont intéressées à évaluer les troubles non-moteurs chez les animaux exposés au PQ seul (Campos et al., 2013; Litteljohn et al., 2008) et à notre connaissance, aucune étude n'a exploré ces troubles non-moteurs chez des animaux exposés au PQ/MB. Dans ce travail, nous montrons pour la première fois, que le traitement au PQ/MB induit des troubles non-moteurs chez les rats du groupe 2, chez lesquels les performances se sont détériorées, mais aussi chez les rats du groupe 3, chez lesquels aucune détérioration des capacités motrices n'a été constatée. En effet, nos résultats montrent que l'intoxication au PQ/MB induit l'anxiété chez les animaux des deux groupes, exprimée par la réduction

spectaculaire du nombre d'entrées et du temps passé dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé. Ce traitement induit aussi un comportement dépressif, exprimé par l'augmentation du temps auquel les rats restent immobiles dans le test de la nage forcée. De façon similaire, l'intoxication au PQ/MB induit aussi l'anhédonie montrée par la réduction de la consommation du sucrose dans le test de préférence au sucrose, et ce, chez les rats des deux groupes. En prenant en compte que les données du groupe 2, on peut supposer que les complications non-motrices sont juste les conséquences des troubles moteurs et du handicap causé par ceux-ci, et que ces fonctions elles même ne sont pas affectées. Les résultats de ce travail démontrent que cette supposition est fautive, puisque les animaux du groupe 3 qui ne montrent aucun déficit moteur, ont aussi souffert de troubles non-moteurs. Un autre argument qui soutient cette conclusion est le fait que les données issues du test de préférence au sucrose, qui est un test ne dépendant pas de la locomotion, prouvent que les fonctions non-motrices sont affectées en dehors des dysfonctionnements moteurs.

On peut attribuer ces dysfonctionnements développés chez les animaux traités, à la déplétion bilatérale partielle de la dopamine, comme le montre les résultats biochimique, avec la réduction significative du niveau de la dopamine tissulaire par 54% dans le striatum, accompagnée d'une réduction significative de son principal métabolite le DOPAC sans aucun effet sur les contenus tissulaires des autres monoamines, la noradrénaline et la sérotonine ainsi que son métabolite le 5-HIAA. Dans la littérature, des données contradictoires sont rapportées à propos de l'impact du PQ seul ou combiné avec le MB sur le système dopaminergique et spécialement sur la dopamine striatale. En effet, les premières études qui ont suggéré d'évaluer la toxicité du PQ sur les neurones dopaminergiques ont utilisé une injection intranigrale directe, c'est-à-dire une injection du PQ directement au niveau de la SNc, et les résultats ont montré une réduction du contenu de la dopamine striatale, atteignant 91.5% similaire au niveau de la mort neuronale obtenu par la MPP+, une neurotoxine classique des modèles animaux de la MP

(Liou et al., 1996). Néanmoins, cet effet pourrait être expliqué par le fait que le PQ est un oxydant très fort, qui peut naturellement causer un niveau de mort cellulaire important si la barrière hémato-encéphalique n'est pas prise en considération (Miller, 2007). Quand le PQ est administré de façon systémique, les retours étaient équivoques dépendants de plusieurs paramètres : la voie d'administration, l'âge des animaux, l'espèce et la dose administrée. En effet, la dégénérescence des corps cellulaires et des terminaisons dopaminergiques suite à l'administration du PQ n'a pas été constatée régulièrement (Brooks et al., 1999; Cicchetti et al., 2005; McCormack et al., 2002; Rojo et al., 2007; Thiruchelvam et al., 2000a). En plus, même dans les laboratoires où la baisse des neurones de la SNc a été constatée, l'effet du PQ sur la dopamine striatale n'a pas été significatif (McCormack et al., 2002). Quand le PQ a été combiné avec le MB, la mort des neurones dopaminergiques a été plus importante, mais pas plus que 21% par rapport aux rats contrôles (Cicchetti et al., 2005) et 35% chez la souris (Thiruchelvam et al., 2000a). Ces pourcentages ne sont pas suffisants pour diminuer significativement les taux de la dopamine striatale (Allen et al., 2014; Thiruchelvam et al., 2000b; Thiruchelvam et al., 2000a) ou les terminaisons dopaminergiques dans le striatum (Cicchetti et al., 2005). Ce dernier paramètre, constitue une caractéristique importante de la MP. En effet, et en se basant sur les données cliniques et issues des modèles classiques de la MP, il est clair que l'apparition des symptômes moteurs requiert la dégénérescence de 70% des neurones dopaminergiques qui résulte en une diminution de plus de 80% de la dopamine striatale (Dauer and Przedborski, 2003). A titre comparatif avec les modèles animaux de la MP souvent utilisés, la perte des neurones dopaminergiques dans la SNc induite par la 6-OHDA peut atteindre jusqu'à 90% comparés aux rats contrôles (Breit et al., 2007) et la concentration tissulaire de la dopamine striatale peut être réduite de 95% (Delaville et al., 2012). Egalement, le MPTP réduit les neurones dopaminergiques de plus de 90% par rapport aux contrôles chez le singe, et cela aboutit à une baisse importante de la dopamine striatale (Miller, 2007). Ce qui n'était pas le cas

de la présente étude étant donné que le maximum de la baisse des taux de la dopamine striatale constaté est de 54%.

Prenant en considération la perte du poids, les dommages pulmonaires et l'absence d'un effet important de l'intoxication au PQ/MB sur la dopamine striatale, il est difficile d'assumer que les déficits moteurs observés sont le résultat de la dégénérescence des cellules dopaminergiques. Il est plus justifié de dire que ces perturbations motrices sont plutôt le résultat des problèmes périphériques causés par la combinaison du PQ/MB, cette hypothèse est plus solide du fait que seuls les animaux malades des groupes 1 et 2 ont vu leurs capacités motrices se détériorer.

En plus des études comportementales et biochimiques, nous nous sommes intéressés aussi à l'aspect électrophysiologique qui nous a permis de mieux comprendre l'effet du PQ/MB sur l'activité électrique des neurones du NST chez les animaux des trois groupes. Nos résultats, montrent pour la première fois que le PQ/MB induit des changements spectaculaires dans la fréquence et le mode de décharge neurones du NST et ce, de façon similaire chez les animaux des trois groupes. En effet, la fréquence de décharge a été réduite chez tous les groupes de rats. De plus, le mode de décharge régulier, caractéristique des neurones du NST en situation normale est devenu majoritairement en bouffées et irrégulier, caractéristique de ces neurones en situation pathologique (Benazzouz et al., 2002). De façon surprenante, le mode de décharge en bouffées et irrégulier des neurones du NST enregistrés chez les animaux du groupe 3 malgré que les animaux aient montré une déplétion partielle en DA sans développer de déficits moteurs. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude récente qui s'est intéressée au lien entre le degré de sévérité de la déplétion dopaminergique, les déficits moteurs et l'activité en bouffées des cellules du NST, chez des rats ayant reçu des injections stéréotaxiques de la 6-OHDA dans le MFB (Janssen et al., 2012). Ces auteurs ont montré que les animaux avec une légère lésion ne montrent aucun déficit moteur, mais le mode de décharge des neurones du NST passe d'un

mode régulier à un autre en bouffées, d'une façon similaire à celle des animaux subissant des lésions plus sévères. De façon identique, une autre étude a montré que les pourcentages de neurones du NST déchargeant en bouffées sont similaires chez des rats avec des lésions faibles et des lésions sévères (Breit et al., 2007). L'apparition précoce du phénotype en bouffées est probablement la conséquence des projections dopaminergiques en provenance de la SNc vers le NST (Chetrit et al., 2009; Janssen et al., 2012; Ni et al., 2001b), contribuant au mécanisme compensatoire mis en place, afin d'amener les cellules restantes de la SNc à libérer plus de DA dans le striatum (Bezard et al., 1999).

En conclusion, cette étude menée chez les rats mâles Sprague Dawley, met en évidence que les effets toxiques du PQ/MB ne sont pas reproductibles et que les animaux ne sont pas sensibles de la même façon au traitement au PQ/MB. Elle montre que les déficits moteurs observés chez une partie des animaux intoxiqués ne sont pas seulement le résultat de la dégénérescence des neurones dopaminergiques, mais également la conséquence des dysfonctionnements périphériques, notamment la perte du poids et les problèmes respiratoires. Cependant, ce modèle pourrait constituer une bonne ressource pour étudier les troubles non-moteurs dans la MP.

2. Discussion de la deuxième partie

i. La caractérisation de l'activité électrique du SCN

Les propriétés du système circadien sont dépendantes de façon cruciale aux interactions entre le SCN et les autres structures. Ce constat fait des enregistrements in vivo le meilleur moyen d'étudier le SCN en tant que composante principale d'un large réseau de connections avec d'autres régions cérébrales (Meijer and Michel, 2015). Un des objectifs de cette thèse était de réaliser une caractérisation électrophysiologique des neurones du SCN avant d'en étudier les changements dans le modèle animal de la MP. Nos résultats montrent que la fréquence de

décharge moyenne est de 1.61 ± 0.16 PAs/seconde, avec une majorité de cellules qui ont un mode de décharge en bouffée. La fréquence de décharge correspond à une moyenne relativement lente et en accord avec ce qui a été rapporté dans d'autres travaux qui ont étudié l'activité électriques des neurones du SCN in vivo (Miller and Fuller, 1992, Alamilla et al., 2015). In vitro, les résultats étaient très controversés (Voir références en bas).

La considération de l'électrophysiologie in vivo comme étant un moyen important d'étudier le SCN a fait que les premiers enregistrements ont été fait dans les années 70 (Groos and Mason, 1978; Inouye and Kawamura, 1979; Nishino et al., 1976). Depuis, les expérimentateurs se sont intéressés à différents aspects de l'électrophysiologie du SCN qui touche surtout à son activité électrique circadienne (Saeb-Parsy and Dyball, 2003a) ou à sa réponse à la stimulation des afférences photiques (Saeb-Parsy and Dyball, 2003b) et non photiques (Alamilla et al., 2015). Récemment, Une étude électrophysiologique in vivo sur des rats en mouvements libres a analysé l'activité électrique du SCN enregistrée simultanément avec l'activité locomotrice. Cette étude a montré que le SCN influence l'activité locomotrice au niveau circadien. Il l'influence aussi au niveau ultradien (Houben et al., 2014). Ceci montre qu'il est intéressant d'étudier le mode de décharge. A notre connaissance, rares sont les travaux qui se sont intéressés à l'activité électrique des cellules du SCN et à son mode de décharge au niveau ultradien et une seule a rapporté une distribution de ces modes dans ces neurones (Saeb-Parsy and Dyball, 2003a). Cette étude sur des rats anesthésiés à l'uréthane rapporte que moins de 2% des neurones du SCN déchargent en bouffées et le même pourcentage pour les cellules régulières alors que le reste des cellules enregistrées (plus que 96%) sont irrégulières (Saeb-Parsy and Dyball, 2003a). les résultats de notre étude montrent par contre une prédominance du mode de décharge en bouffées dans les neurones du SCN (56%), par rapport aux modes de décharge irrégulier (31%) et régulier qui reste minoritaire (13%). Si nos résultats concordent avec (Saeb-Parsy and Dyball, 2003a) sur l'infériorité des cellules régulières, ils sont largement en désaccord sur la

distribution des autres modes de décharge. Cette différence est de nature méthodologique. En fait, (Saeb-Parsy and Dyball, 2003a) définit un mode de décharge en bouffées ou phasique comme étant l'occurrence d'une phase de silence où il y a une absence totale de potentiels d'action, au moins deux fois pendant un enregistrement de 10 minutes, alors que nous le considérons, comme il a été décrit par Kaneoke and Vitek (1996) comme étant l'occurrence de plusieurs périodes où le nombre de potentiels d'actions est plus élevé comparé à d'autres périodes du même enregistrement. La classification de (Saeb-Parsy and Dyball, 2003a) est basée sur une méthode rapportée initialement par (Groos and Hendriks, 1979) qui repose exclusivement sur le CV (Coefficient de variation) de l'ISI (Interspike Interval) défini comme le rapport de la déviation standard sur l'ISI moyen (Cf. voir « matériel et méthodes »). Cette méthode classe chaque neurone avec un $CV < 0.20$ comme étant régulier et chaque neurone avec un $CV > 0.20$ comme étant irrégulier (Groos and Hendriks, 1979; Shibata and Moore, 1988). Cette classification aboutit à considérer comme neurones à bouffées, uniquement les cellules qui expriment des blocs de potentiels d'action bien distincts séparés par des périodes silencieuses régulières. Les neurones qui déchargent en bouffées mais dont les potentiels d'action ne forment pas des blocs bien séparés ou séparés par des périodes silencieuses irrégulières, sont par conséquent considérés comme étant irréguliers. Notre analyse repose sur un algorithme qui se base sur la méthode de (Kaneoke and Vitek, 1996). Cette méthode particulièrement conçue pour détecter les bouffées, est basée sur le concept de distribution de densité et une définition statistique rigoureuse de cette dernière. Cela consiste à déterminer la densité de décharge en calculant le nombre de potentiels d'action dans un intervalle défini. Ces différences méthodologiques justifient les résultats différents, d'autant plus qu'une autre étude, qui a utilisé la méthode de (Groos and Hendriks, 1979) a aussi rapporté l'existence de neurones qui déchargent en bouffées et qui constituent un nombre considérable des neurones du SCN (Miller and Fuller, 1992). L'occurrence des bouffées a été confirmée dans d'autres études in

vivo chez des rats anesthésiés (Nishino et al., 1976) ou en mouvements libres (Miller et al., 1987). Récemment une étude d'électrophysiologie sur des souris non anesthésiés avec la tête fixée a aussi décrit des neurones à décharge en bouffées dans le SCN (Sakai, 2014). De son côté, (Lewandowski, 2002) décrit cette activité en bouffée comme étant une activité basique nécessaire pour générer les rythmes circadiens.

En plus des études électrophysiologiques expérimentales *in vivo* et *in vitro*, le rôle des modèles computationnelles a été essentiel dans la compréhension du mécanisme biologique complexe qui génère les rythmes circadiens, par reconstitution des données et réalisation des prédictions qui ont été validées expérimentalement (Forger et al., 2007; Gallego et al., 2006; Lewis et al., 1992; Locke et al., 2005). Dans ce sens, une étude computationnelle s'est basée sur le modèle mathématique classique de Hodgkin–Huxleyde qui décrit la génération et la propagation des potentiels d'action (Hodgkin and Huxley, 1952) pour modéliser l'activité électrique du SCN (Sim and Forger, 2007). Ce modèle montre que le placement du SCN au milieu d'un réseau hypothétique où il reçoit différents agents de signalisation chimique et électrique, et la simulation de l'effet de l'un de ces agents, en l'occurrence le courant post-synaptique inhibiteur par la GABA, induit des bouffées irrégulières dans le train de potentiels d'action des neurones du SCN (Sim and Forger, 2007).

Contrairement aux enregistrements *in vivo*, plusieurs études *in vitro* se sont penchées sur le mode de décharge du SCN. Si tous ces travaux s'accordent en général à reconnaître que les cellules du SCN sont hétérogènes et que les trois modes de décharge (régulier, irrégulier et en bouffées) sont exprimés, la proportion de chacun de ces modes de décharge reste confus. Alors que (Brown et al., 2008; Kim and Dudek, 1993; Laemle et al., 2002) rapportent que la majorité des cellules enregistrées en tranches sont régulières, d'autres équipes (Cahill and Menaker, 1989; Mason et al., 1987; Zhang et al., 1995; Groos and Hendriks, 1979; Kononenko et al., 2008; Ling et al., 1990; Thomson et al., 1984; Walsh et al., 1992) montrent au contraire que les

neurones irréguliers sont majoritaires. Et finalement les résultats de (Pennartz et al., 1997) montrent une distribution équilibrée des trois modes de décharges. Il est clair que les enregistrements *in vitro* sont d'une utilité importante pour comprendre plusieurs phénomènes dans le système circadien, en l'occurrence, l'expression rythmique des gènes de l'horloge (Nakamura et al., 2005), la libération des neurotransmetteurs (Shinohara et al., 1998), le rythme circadien de l'activité électrique (Gillette et al., 1995) ainsi que les canaux ioniques (Pennartz et al., 1997). Ils offrent aussi l'avantage d'être considérablement stables par rapport aux enregistrements *in vivo* (Sabatier et al., 2004). Cependant, ils restent non représentatifs des enregistrements *in vivo*, notamment à cause de l'inévitable interruption des connections neuronales inhérentes aux préparations *in vitro* (Bhumbra and Dyball, 2010; Brown and Piggins, 2007). Ceci est approuvé par plusieurs études qui montrent que le mode de décharge est modifiable suite à différents stimuli externes. Par exemple, une étude électrophysiologique a montré que dans une culture comportant au moins le SCN, le nerf optique et le chiasma optique, des cellules déchargeant en irrégulier tendent vers un mode de décharge en bouffée après la stimulation du nerf optique (Cahill and Menaker, 1989). Une autre étude a montré que l'orexine qui joue un rôle très important dans l'entraînement non-photique du SCN et dans la régulation du cycle veille/sommeil (Aston-Jones et al., 2001), influence le mode de décharge des cellules du SCN en culture déchargeant en irrégulier. L'orexine induit un mode de décharge en bouffées dans les neurones (Brown et al., 2008). Ces résultats montrent qu'au moins deux paramètres contribuant à l'induction du mode de décharge en bouffées sont absents des échantillons en culture où on a évalué les modes de décharge des neurones du SCN.

Donc la question qui se pose légitimement au vu de ces résultats et des données de la littérature, est de connaître le rôle de cette activité dans le fonctionnement des rythmes circadiens. Bien que la réponse soit loin d'être résolue, plusieurs éléments permettent de proposer une hypothèse :

- i) l'existence de l'activité en bouffée dans l'IGL (Lewandowski et al., 2000) et dans le DRN et

le MRN (Hajos et al., 1995; Hajos et al., 1996; Ku and Wang, 1991) qui jouent un rôle important dans le fonctionnement des rythmes circadiens et qui sont, anatomiquement et fonctionnellement, étroitement liées les unes aux autres et au SCN. ii) la position anatomique du SCN à proximité de l'axe hypothalamo-pituitaire et des noyaux hypothalamiques avec qui le SCN a des connections directes, notamment avec le noyau paraventriculaire (PVN), le DMH, la zone sub-paraventriculaire (SPVZ), le noyau supra-optique (SON) et l'aire hypothalamique latérale (LH) (Leak et al., 1999; van Esseveldt et al., 2000). iii) le fait que plusieurs de ces noyaux hypothalamiques soient aussi caractérisés par une activité en bouffée importante surtout dans le PVN, le LH et le SON (Andrew and Dudek, 1983; Haller and Wakerley, 1980; Hatton, 1982; Poulain and Wakerley, 1982). iv) Le constat d'une sécrétion pulsative d'un certain nombre de neuro-hormones de l'axe hypothalamo-pituitaire, telles que la vasopressine, la somatotropine, L'hormone lutéinisante (LH), L'hormone folliculo-stimulante (FSH), adrénocorticotrophine (ACTH) ou encore L'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) (Lewandowski and Blasiak, 2004; Silverman and Zimmerman, 1983). Sur la lumière de tous ces éléments, plusieurs auteurs ont proposé l'hypothèse selon laquelle l'activité en bouffée des neurones des centres impliqués dans le système circadien, serait à l'origine de la sécrétion pulsative des hormones (Ahmad et al., 2001; Lewandowski and Blasiak, 2004; Pitts et al., 2001) et que cette activité pourrait correspondre à une libération accrue de neuropeptides dans l'hypothalamus (Bhumbra and Dyball, 2010; Dutton and Dyball, 1979).

Cette hypothèse est fondée et beaucoup d'éléments dans la littérature la soutiennent. Par exemple, nous pouvons évoquer dans cette discussion, l'activité en bouffées caractéristique des magnocellules du noyau supraoptique qui a été corrélée avec la libération accrue de Vassopressine (Brown, 2004; Li et al., 2007; Poulain and Wakerley, 1982) et de l'ocytocine (Brown et al., 2000; Rossoni et al., 2008). Il a été aussi rapporté, que la sécrétion pulsative des gonadotrophines des neurones pré-optiques, pourrait être le résultat d'activité en bouffées dans

ces neurones (Kuehl-Kovarik et al., 2005; Suter et al., 2000). De son côté, (Miller and Fuller, 1992) propose que cette activité en bouffées est la signature d'une population de cellules oscillatoires autonomes à l'origine de la rythmicité endogène des neurones du SCN. Toutes ces études montrent l'importance de ce mode de décharge, que notre étude révèle être prédominant.

La nature de l'hétérogénéité dans l'activité électrique que nous avons constatée dans ce travail, et que d'autres équipes ont rapportée, n'est pas encore bien élucidé. Cependant, nous pouvons émettre deux hypothèses. Soit elle est attribuée à l'hétérogénéité même des populations cellulaires du SCN, comme tend à l'expliquer certains auteurs et donc des propriétés intrinsèques propres à chaque cellules (Laemle et al., 2002; Pennartz et al., 1997), ou bien elle reflète la variabilité de la réponse d'un même neurone au cycle circadien. Ceci implique que les neurones du SCN sont capable de changer de mode de décharge, comme tendent à l'expliquer d'autres auteurs. Par exemple (Brown et al., 2008) et (Shibata et al., 1984) montrent que les proportions de chaque mode changent suivant le jour ou la nuit. Les travaux cités auparavant qui montrent que l'orexine (Brown et al., 2008) ou une stimulation photique (Cahill and Menaker, 1989) peuvent induire un changement de mode de décharge vers le mode en bouffée, donnent plus de crédibilité à la deuxième hypothèse.

ii. L'effet des déplétions monoaminergiques sur l'activité électrique du SCN

Tous les éléments cités auparavant, portent à considérer que l'activité électrique du SCN est largement dépendante en plus des mécanismes intrinsèques du SCN, aux afférences externes reçues. Donc, on peut facilement imaginer que cette activité électrique soit modifiable de par la modification des afférences au SCN, qui peuvent être causées potentiellement par une lésion ou une maladie neurodégénérative ou encore par une stimulation photique ou non photique. C'est cette conclusion que les résultats de notre étude tendent à confirmer. En effet, un deuxième objectif de cette étude était d'évaluer les changements qui pouvaient survenir dans

l'activité électriques des neurones du SCN pendant le jour, après différentes combinaisons de déplétions monoaminergiques chez le rat. Cette évaluation concerne la fréquence et le mode de décharge.

Le premier changement rapporté pour la première fois dans cette étude, concerne la fréquence de décharge des neurones des SCN, qui augmente chez les rats ayant subi une déplétion. Cette augmentation a été significative chez les groupes avec une double ou triple déplétion, avec un changement plus marqué lorsque les trois monoamines sont lésées. Un autre changement concerne le mode de décharge qui devient plus irrégulier et moins en bouffées par rapport aux contrôles, avec comme pour la fréquence de décharge un changement plus marqué chez les rats ayant subi une triple déplétion. A la différence du paramètre précédent, le mode de décharge a cependant été aussi affecté chez les rats du groupe avec une déplétion dopaminergique seule. Comme il a été mentionné au début de cette discussion, peu d'études se sont intéressées à l'activité électrique des SCN sur des courtes durées et à notre connaissance, aucune n'a étudié cette question chez des modèles animaux de la MP. Cette absence de repères bibliographiques est compensée par un certain nombre d'éléments dans la littérature qui pourraient aider à la compréhension de ces changements observés.

D'abord, L'absence de changements significatifs dans la fréquence de décharge chez le groupe d'animaux ayant subi une déplétion dopaminergique seule, est en accord avec plusieurs études qui ont investi le système circadien chez des modèles animaux de la MP. En effet, chez des rats 6-OHDA avec une lésion bilatérale (Ben and Bruguerolle, 2000) ou unilatérale (Baier et al., 2006) sévères du système nigro-striatale, le rythme journalier de l'activité locomotrice et de la température sont restés intacts, bien que les capacités locomotrices aient été sélectivement affaiblies. A noter que ces deux études ont testé le rythme circadien de l'activité locomotrice seulement dans des conditions nyctémérales, auxquelles le cycle lumière/obscurité joue un puissant rôle de régulation du comportement et des neuropeptides. Une autre étude qui a

examiné le même paramètre chez des rats 6-OHDA, mais cette fois ci, dans des conditions d'obscurité constante, a montré que les rats lésés sont moins actifs dans la roue avec une activité rythmique désorganisée sans aucun effet sur le profil journalier de l'expression de PER2 dans le SCN (Gravotta et al., 2011). De la même façon, l'architecture du sommeil chez des souris MPTP a été perturbée (Laloux et al., 2008; Lima et al., 2007). Une critique qui peut être faite à ces études c'est que l'évaluation de l'activité locomotrice circadienne a été réalisée sur une courte durée qui ne dépasse pas un mois en général après les opérations. En effet, de telles opérations aussi lourdes que les lésions monoaminergiques, demandent un minimum de trois semaines de récupération des animaux et de stabilisation des réseaux neuronaux, notamment pour permettre la distinction entre l'effet irréversible des neurotoxines utilisées et l'effet et conséquences de l'opération, qui disparaissent en général au bout de cette période de récupération. Effectivement, les effets cités ci-dessus se sont avérés être transitoires et les paramètres évalués sont retournés à la normale avec le temps. Cependant, dans une autre étude sur des souris MPTP qui a été conduite sur une longue période et qui avait examiné les paramètres circadiens dans les conditions LD, DD et LL, aucun paramètre circadien n'a été altéré (Fifel et al., 2013). D'autres études sur des modèles de souris transgéniques ont investi ce sujet. Kudo et Collègues (Kudo et al., 2011) ont montré chez des souris transgéniques avec une expression de alpha-synucléique excessive (ASO), plusieurs altérations significatives dans l'activité circadienne qui consistent essentiellement à une fragmentation remarquable du rythme de l'activité sur la roue et une altération de la distribution temporelle du sommeil. A noter que cette dernière étude sur la souris transgénique a montré que les neurones du SCN *in vitro* déchargent plus lentement que des cellules SCN normales. Ce dernier constat, va à l'encontre de nos résultats. Ceci peut être expliqué par les mêmes raisons mentionnées au-dessus dans la première partie de cette discussion et qui font la différence entre les enregistrements *in vivo* et *in vitro*. Une troisième étude sur des souris MitoPark transgénique

qui répliquent la nature lente et progressive de la perte neuronale dans la MP, a rapporté que ces souris montrent une perturbation ou une suppression du rythme de l'activité/repos dans les conditions constantes. Ces dysfonctionnements sont apparus qu'à partir d'un âge relativement avancé (Fifel and Cooper, 2014). Par ailleurs, des études sur des singes MPTP, rapportent des perturbations du sommeil avec une somnolence excessive pendant le jour et une fragmentation du sommeil (Barraud et al., 2009; Fifel et al., 2014; Vezoli et al., 2011) semblables à celles constatées chez des patients atteints de la MP (Happe et al., 2007).

Au vu de ces résultats, une question s'impose, c'est de comprendre si les perturbations des rythmes circadiens relevées dans les différents modèles animaux de la MP, reflètent un dysfonctionnement de l'horloge circadien endogène, c'est-à-dire un dysfonctionnement du SCN, ou bien le problème se situe en aval, c'est-à-dire dans les structures cibles du SCN. Comme le notent Fifel and Cooper (2014), la perte de la rythmicité dans les conditions constantes est généralement observée suite à une déficience dans le fonctionnement du SCN après lésion (Reppert and Weaver, 2002; Stephan and Zucker, 1972) ou bien dans le cas d'une perturbation des gènes clock du SCN (Reppert and Weaver, 2002), ce qui n'est pas le cas au moins chez le rat 6-OHDA (Hood et al., 2010). Cette dernière étude montre par contre une réduction de PER2 striatal impliqué dans la régulation de la dopamine journalière, qui constitue une cible de la régulation circadienne du SCN (Hood et al., 2010). A part la diminution de la fréquence de décharge constatée *in vitro* par (Kudo et al., 2011) et les changements dans l'activité électrique rapporté dans notre travail, aucun dysfonctionnement dans le SCN n'a été rapporté. L'hypothèse que les altérations observées sont d'origine post-SCN a été émise (Fifel and Cooper, 2014). Prenant en considération l'effet de la déplétion dopaminergique sur la fréquence de décharge, notre étude rejoint ce constat puisque cette fréquence n'a pas été affectée chez ces animaux. Cependant notre étude ne confirme qu'en partie cette hypothèse. En effet nos résultats montrent que le mode de décharge des neurones du SCN a été affecté et qu'ils

deviennent légèrement plus irréguliers. Notre étude ne permet pas de quantifier l'effet de ce changement ni de le corrélérer à aucune des altérations observées et des études comportementales supplémentaires sont nécessaires chez les mêmes groupes d'animaux. Une hypothèse pour expliquer ce constat est qu'il est probable que le mode de décharge de l'activité électrique influence les sorties du SCN et sa perturbation pourrait jouer un rôle dans la fragmentation du sommeil ou encore dans la réduction de l'amplitude des rythmes, deux manifestations récurrentes dans les études citées auparavant (Fifel and Cooper, 2014; Fifel et al., 2014; Kudo et al., 2011), sans que cette perturbation ne soit assez robuste pour modifier les paramètres des rythmes circadiens. A souligner que les modèles avec une déplétion dopaminergique seule ne reflètent pas tous les aspects de la MP, surtout quand l'objectif recherché est d'évaluer un paramètre comme les rythmes circadiens.

Sur la lumière de ce constat, les autres déplétions monoaminergiques ont été ajoutées, ce qui reflète plus l'implication d'autres systèmes dans la maladie, notamment ceux qui sont liés directement avec l'horloge circadienne (le système sérotoninergique) ou avec les centres de réveil dans le cerveau (le système sérotoninergique et le système noradrénergique). Effectivement, l'activité électrique du SCN a été plus affectée chez ces groupes. En l'absence d'études comportementales ou électrophysiologiques qui ont investi ce sujet, la dissection de la nature des afférences du SCN pourrait apporter des éléments de réponse. D'abord il est important de souligner l'absence de récepteurs dopaminergiques fonctionnels dans le SCN (Duffield et al., 1998), ce qui pourrait expliquer l'absence ou la légèreté de l'effet de la déplétion dopaminergique. Par contre, d'autres noyaux importants dans le système circadien et qui constituent les afférences majeurs du SCN, reçoivent des projections dopaminergiques ou contiennent des neurones dopaminergiques. En effet, le DRN reçoit une dense innervation dopaminergique qui module son activité avec un effet exciteur tonique (Di Giovanni et al., 2008), et la perte de cette innervation peut entraîner la réduction drastique de sa fréquence de

décharge et l'altération de son mode de décharge qui devienne plus en bouffées (Prinz et al., 2013 (Zhang et al., 2007). A noter que le DRN est impliqué dans la modulation indirecte du SCN via l'IGL. Bien que l'existence des neurones dopaminergiques dans le DRN et le MRN est rapportée, leurs projections s'avèrent plutôt en direction du noyau accumbens (Jahanshahi et al., 2013; Stratford and Wirtshafter, 1990). La dopamine rétinienne est aussi affectée dans la MP (Nguyen-Legros, 1988). Une étude sur des souris transgéniques avec l'expression de la TH sélectivement atténuée a montré la perte totale de la régulation circadienne de la réponse à la lumière dans l'électrorétinogramme (Jackson et al., 2012), mais l'influence sur l'activité du SCN reste à élucider. Finalement, bien que la régulation rythmique de la dopamine par le SCN est connue et se fait indirectement via le noyau pré-optique médial, une innervation dans le sens inverse n'a jamais été montrée (Tsujino and Sakurai, 2009).

De la même façon, Le LC qui est impliqué dans la régulation circadienne du cycle veille/sommeil (Aston-Jones et al., 2001), est innervé indirectement par le SCN via le noyau hypothalamique dorso-médial. A l'inverse du VTA, le LC projette faiblement ses terminaisons noradrénergiques en direction de l'IGL sans que cette innervation soit réciproque (Horowitz et al., 2004). Nous ne pouvons pas affirmer si cette innervation supplémentaire de l'IGL, pourraient jouer un rôle dans l'augmentation légère de la fréquence de décharge observée dans les neurones du SCN du groupe ayant subi une double déplétion dopaminergique et noradrénergique. Une ancienne étude montre que l'application directe de la noradrénaline sur des cellules du SCN, induit une augmentation spectaculaire de la fréquence de décharge (Nishino and Koizumi, 1977). Ce résultat n'a jamais été démontré *in vivo*.

Comme il a été décrit dans l'introduction de ce manuscrit (Cf. voir les afférences du SCN), les trois principales structures qui projettent vers le SCN sont la rétine, l'IGL et la partie médiane du noyau raphé. L'innervation du RHT provenant de la rétine est excitatrice et elle est induite par le glutamate et renforcée par le PACAP (Harrington, 1997; Michel et al., 2006), ces deux

peptides sont activés par la lumière ou par une stimulation du RHT (Brown and Piggins, 2007). Cette voie constitue le synchroniseur majeur du SCN par son effet excitateur robuste.

La deuxième voie afférente au SCN est de nature sérotoninergique, qui contrairement à la dopamine et la noradrénaline, innerve densément le SCN et provient essentiellement du MRN, et agit sur différents types de récepteurs sérotoninergiques (Morin and Allen, 2006; Pickard and Rea, 1997). L'effet inhibiteur de la sérotonine sur les neurones du SCN est bien connu et a été démontré par des enregistrements électrophysiologiques unitaires *in vivo* et *in vitro* (Huang and Pan, 1993; Kow and Pfaff, 1984; Miller and Fuller, 1990; Nishino and Koizumi, 1977; Shibata et al., 1983; Ying and Rusak, 1994; Ying and Rusak, 1997) ainsi que par des études pharmacologiques avec un agoniste sérotoninergique (8-OH-DPAT) (Prosser et al., 1990; Shibata et al., 1992). Ces projections inhibitrices sérotoninergiques du MRN modulent l'effet excitateur du glutamate rétinien (Liou et al., 1986b; Rea et al., 1994; Smith et al., 2001; Ying and Rusak, 1994; Ying and Rusak, 1997). Donc on peut comprendre que l'absence de la sérotonine induite par une lésion ou par une maladie neurodégénérative renforce l'effet excitateur du glutamate. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la fréquence de décharge que nous avons montrée chez les groupes d'animaux ayant subi une déplétion sérotoninergique qu'elle soit seule ou en double ou triple avec les deux autres monoamines. Ceci expliquerait aussi pourquoi cette augmentation n'était pas aussi remarquable ou n'était pas significative dans les groupes de rats avec le système sérotoninergique intact. Il a été montré que les neurones du SCN sont plus sensibles à la sérotonine pendant la nuit (Mason, 1986) et que le pic de la sérotonine mesurée par micro-dialyse *in vivo* dans le SCN se situe juste avant le début de la nuit (Barassin et al., 2002). A partir de ce constat, nous pouvons prédire que l'effet de la déplétion sérotoninergique pendant la nuit serait plus remarquable.

La troisième voie afférente au SCN est aussi de nature inhibitrice. Elle agit essentiellement avec le GABA (Jiao and Rusak, 2003) et le NPY (Harrington, 1997), qui sont les neurotransmetteurs

majeurs de la GHT. Alors que le NPY a été décrit pour son action inhibitrice (Cutler et al., 1998; Gribkoff et al., 1998; Liou and Albers, 1991; van den Pol et al., 1996), l'action du GABA sur les neurones du SCN est encore sujet de débat. Alors que la plupart des auteurs indiquent son effet inhibiteur (Brown and Piggins, 2007), d'autres indiquent au contraire que le GABA joue un rôle excitateur pendant le jour (Wagner et al., 1997; Wagner et al., 2001) ou la nuit (De Jeu and Pennartz, 2002) ou encore seulement sur la partie dorsale du SCN (Albus et al., 2005). Bien que notre étude ne permet pas de confirmer ou d'infirmer l'une ou l'autre des hypothèses, mais elle montre qu'un certain équilibre entre ces trois voies et d'autres est essentiel pour le maintien de l'activité électrique des neurones du SCN. Une fois cet équilibre est perturbé, le fonctionnement du SCN est perturbé. Cette perturbation peut affecter la fréquence ou le mode de décharge.

Cette étude rapporte des éléments de preuve que l'activité neuronale du SCN chez les rats ayant subi une triple déplétion monoaminergiques, a été profondément modifiée, ce qui montre le rôle important que joue la sérotonine dans la régulation de cette activité. Cette conclusion pourrait apporter des nouveaux éléments à prendre en considération pour améliorer le traitement sérotoninergique actuel. Ce traitement repose surtout sur des antidépresseurs (Bomasang-Layno et al., 2015 pour revue) et des agonistes sérotoninergique spécifiques aux récepteurs 5-HT_{2A} contre les psychoses (Schrag et al., 2015) ou encore, plus tardivement des agonistes aux récepteurs 5-HT_{1A} pour remédier à la dyskinésie induite par la L-DOPA (Lindenbach et al., 2015). Si les cellules du SCN expriment les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{1A}, il expriment aussi d'autres, notamment les récepteurs 5-HT_{5A}, 5-HT₇, 5-HT_{2C} et 5-HT_{1B} (Belenky and Pickard, 2001; Duncan et al., 2000; Duncan et al., 1999; Moyer and Kennaway, 1999; Oliver et al., 2000; Prosser et al., 1993; Sprouse et al., 2004a; Sprouse et al., 2004b). Ces récepteurs jouent tous un rôle important dans le système circadien (Morin and Allen, 2006 pour revue).

VI. Conclusions générales et perspectives :

Le premier objectif de cette thèse était de vérifier la validité d'un modèle animal de la MP en évaluant ses réponses aux critères établis pour considérer un modèle comme étant bon pour reproduire les symptômes moteurs et non-moteurs de la MP ainsi que les différents aspects physiopathologiques de la maladie ou encore vérifier sa reproductibilité qui est un critère très important dans le développement des modèles animaux. Cette partie de la thèse a montré que l'intoxication au PQ/MB induit certes, une lésion partielle des neurones dopaminergiques sans qu'il y ait un changement dans les niveaux de la sérotonine et de la noradrénaline. Cette lésion dopaminergique, bien qu'elle soit significative, reste loin de celle constatée chez d'autres modèles animaux de la maladie, en l'occurrence les rats 6-OHDA et les singes MPTP, et ne peut pas à elle seule expliquer les troubles moteurs constatés chez une partie des animaux traités. Le fait que chez ces animaux les troubles constatés sont accompagnés par des problèmes pulmonaires sévères et une perte considérable du poids corporel, alors que ces troubles sont absents chez l'autre partie des animaux qui ne montrent pas de complications périphériques implique que les perturbations motrices observées ne sont pas seulement le résultat de la perte dopaminergique, mais aussi l'effet des dysfonctionnements pulmonaires.

Donc les résultats de cette première partie, fournissent des éléments tangibles qui permettent de conclure que les rats Sprague Dawley, ne sont pas sensibles de la même façon au PQ/MB, et de ce point de vue, ils ne sont pas reproductibles en tant que modèles animaux. Par contre, les résultats des tests non-moteurs, peuvent être exploités dans le futur pour mieux comprendre cet aspect encore mal connu de la maladie, vu qu'ils montrent une atteinte significative de ces fonctions chez tous les groupes. Les changements électrophysiologiques observés pourraient aussi être exploités pour étudier la maladie dans ses premiers stades, vu qu'ils ressemblent aux résultats des études électrophysiologiques chez des animaux avec des déplétions dopaminergiques partielles. Evidemment ces deux conclusions, nécessitent d'autres études pour

mettre en place un modèle exploitable dans ce sens. Plusieurs études supplémentaires pourraient être proposées, notamment en diminuant les doses et en allongeant de la durée d'exposition. Nous pouvons aussi proposer l'évaluation de cette combinaison sur des vieux rats et le changement de la voie d'administration pour une intoxication via la nourriture. Finalement, ces résultats constituent une sonnette d'alarme de la dangerosité de ces produits utilisés sans aucune restriction au Maroc et ailleurs dans d'autres pays, et pourraient constituer la base d'études épidémiologiques et cliniques pour vérifier s'il y a une corrélation entre l'utilisation de ces deux substances et l'occurrence de la MP et des atteintes pulmonaires sévères dans les régions où ils sont massivement utilisés.

Les résultats de cette première partie, nous ont clairement fait décider à choisir le modèle 6-OHDA que nous avons trouvé le plus approprié pour étudier la problématique centrale de cette thèse. Ce choix vient du fait que ce modèle nous permet de répliquer le mieux la MP, avec la possibilité qu'il offre pour étudier et comparer les effets de la déplétions des trois systèmes monoaminergiques majeurs impliqués dans la maladie. Comparé avec le modèle PQ/MB, on note que dans ce dernier les systèmes noradrénergique et sérotoninergique restent intacts alors qu'ils sont fortement impliqués dans la modulation des rythmes circadiens

En effet, le deuxième objectif de cette thèse était d'évaluer les effets de la dégénérescence des neurones monoaminergiques sur les rythmes circadiens en général et sur l'activité électrique des neurones du SCN en particulier. Nos résultats ont montré que ces déplétions induisent des changements significatifs dans cette activité neuronale, en particulier dans deux paramètres importants pour évaluer cette activité, qui sont la fréquence et le mode de décharge. Alors que ces changements ne concernent que le mode de décharge chez les rats avec une déplétion dopaminergique seule, qui ont vu leur activité en bouffées diminuer légèrement en faveur de l'activité irrégulière, chez les autres groupes, ces changements ont été plus importants et ont

concerné les deux paramètres. A noter que ces changements ont été spectaculaires chez le groupe de rats avec une triple déplétion.

Les résultats de cette partie de la thèse montrent clairement l'implication des neurotransmetteurs monoaminergiques dans la modulation de l'activité électrique des neurones du SCN. Ils fournissent aussi des éléments de preuves de l'implication éventuelle de ces changements électrophysiologiques dans la physiopathologie des perturbations des rythmes circadiens dans le contexte de la MP.

Au-delà de ces changements électrophysiologiques constatés, ce travail répond partiellement à une question qui a souvent accompagné les études qui se sont intéressées aux perturbations des rythmes circadiens constatées chez les parkinsoniens. Cette question, est de savoir lequel des composants du système circadien est affecté pour provoquer l'apparition de ces troubles. Est-ce qu'il s'agit de l'entrée de l'horloge ? De sa sortie ? Ou de l'horloge elle-même ? A notre connaissance, aucune étude n'a montré que le fonctionnement du SCN a été affecté par la suppression du contrôle monoaminergique. Donc le fait que nos résultats montrent pour la première fois un changement au sein même du SCN, met en question la tendance précédente à croire que c'est plutôt les cibles du SCN qui sont affectées et que le SCN reste intacte. Reste à savoir si ces changements affectent le fonctionnement intrinsèque du SCN ou bien c'est le résultat de sa dénervation tonique, et qu'une fois cette dénervation compensée, le fonctionnement du SCN retourne à la normale. Dans l'optique de répondre à ces questions, nous pouvons proposer des études expérimentales d'ordre pharmacologique et électrophysiologique qui nous permettront d'y répondre. Ainsi, nous pouvons utiliser des agonistes et des antagonistes de la sérotonine et de la noradrénaline pour étudier l'action spécifique de ces neurotransmetteurs sur l'activité électrique du SCN. Nous pouvons aussi utiliser les agents pharmaceutiques utilisés classiquement dans la thérapie de la MP, pour voir la réponse électrophysiologique en temps réel des neurones du SCN à ces différents agents chez les

groupes de rats contrôles et avec des déplétions. Ces agents pourraient être la L-DOPA ou les agonistes dopaminergiques ou encore la stimulation électrique du NST. Nous pouvons aussi utiliser des antagonistes dopaminergiques sur des rats contrôles pour voir si le SCN réagit de la même façon que la déplétion. Si les changements sont significatifs, nous pouvons même aller encore plus loin et utiliser des agonistes spécifiques des DR1 et DR2 pour déterminer par quelle voie la dopamine pourrait influencer l'activité neuronale du SCN. A noter qu'une grande partie de ces expériences sont déjà entamées. De la même façon, Nous pouvons aussi, utiliser deux électrodes, une classique d'enregistrement et une de stimulation, pour à la fois stimuler le LC ou le noyau Raphé et enregistrer l'activité du SCN. Ces expériences apporteraient des réponses sur les questions encore suspendues.

Ces résultats ne seraient concluantes, qu'une fois corrélés avec les réponses comportementales aux différentes déplétions effectuées. Effectivement, nous avons déjà réfléchi et entamé cette partie avec la mise en place des différents groupes déjà testés en électrophysiologie, dont les rythmes circadiens seront évalués avec l'analyse de l'activité locomotrice journalière en acétimétrie. Nous nous attendons à ce que le groupe de déplétion dopaminergique seule, confirme les résultats déjà existants dans la littérature, mais à ce que les autres groupes montrent des perturbations des rythmes circadiens beaucoup plus significatives. Cette étude comportementale pourrait être complétée par une analyse de l'activité métabolique par l'étude où nous pouvons mesurer par immun-réactivité les variations circadiennes de neuropeptides telles que la Vasopressine ou le peptide intestinal vasoactif. Elle pourrait aussi être enrichie par une analyse de l'activité de l'horloge moléculaire en mesurant l'expression gènes horloges *bmal1*, *per1-2*, *cry1-2*.

A souligner, qu'en marge de cette étude sur les effets des déplétions monoaminergiques sur l'activité neuronale des cellules du SCN, notre étude présente pour la première fois la distribution des modes de décharge de ces cellules chez les rats normaux, en se basant sur les

méthodes récentes de différencier ces modes de décharge qui reposent sur une analyse rigoureuse et automatisée de plusieurs paramètres recueillis des enregistrements électrophysiologiques. Cet aspect longtemps négligé pourrait contribuer à approfondir notre compréhension du fonctionnement du SCN physiologiquement et physiopathologiquement.

Bien que l'architecture du système circadien soit complexe, nos résultats avec les données de la littérature nous permettent de proposer un modèle qui pourrait expliquer les différents changements observés au sein du SCN (figure 31). Ce modèle chargé de points d'interrogations reste à compléter. A cette fin, beaucoup d'études complémentaires sont nécessaires. Ces études sont d'ordres comportementaux, électrophysiologiques et pharmacologiques. Ils pourraient concerner en plus des expériences déjà proposées plus haut, l'évaluation de la stimulation ou l'inhibition de l'IGL dont le fonctionnement représente le grand point d'interrogation du modèle proposé dans la figure et qui reste par rapport à la voie rétino-hypothalamique et la voie sérotoninergique la voie la plus mal connue.

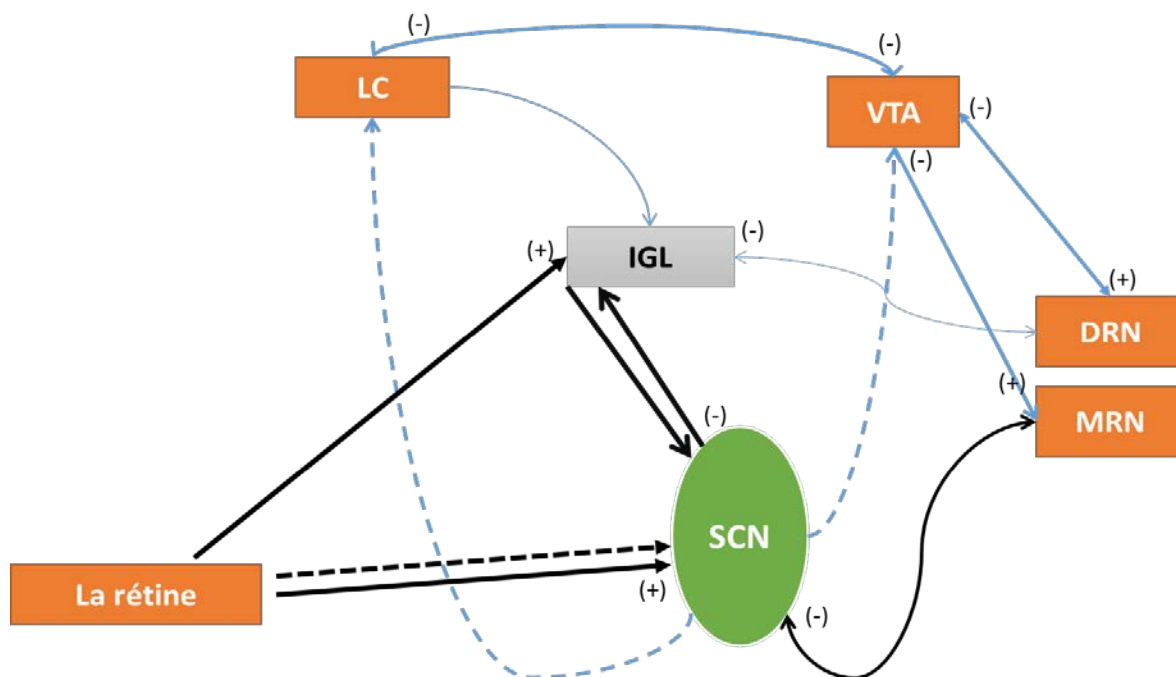


Figure 31 : Une représentation schématique des connexions du SCN qui pourraient jouer un rôle dans la perturbation des rythmes circadiens dans le contexte de la MP.

En tirets sont indiquées, les connexions indirectes du SCN, alors que les traits continus représentent les connexions directes. Abréviations : IGL, Feuillet intergénéral latéral

du thalamus ; SCN, noyau suprachiasmatique; DRN, Noyau Raphé dorsal ; MRN, Noyau Raphé médian ; LC, Locus Coeruleus ; VTA, Aire tegmentale ventrale.

VII. Bibliographie

- Aarsland, D., et al., 2005. Disorders of motivation, sexual conduct, and sleep in Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 96, 56-64.
- Abbott, R. D., et al., 2005. Excessive daytime sleepiness and subsequent development of Parkinson disease. *Neurology.* 65, 1442-6.
- Abrahamson, E. E., Moore, R. Y., 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 916, 172-91.
- Agid, Y., et al., 1973. Injection of 6-hydroxydopamine into the substantia nigra of the rat. II. Diffusion and specificity. *Brain Res.* 58, 291-301.
- Ahmad, A. M., et al., 2001. Circadian and ultradian rhythm and leptin pulsatility in adult GH deficiency: effects of GH replacement. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 3499-506.
- Aizman, O., et al., 2000. Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci.* 3, 226-30.
- Alamilla, J., et al., 2015. The anterior Paraventricular Thalamus Modulates Neuronal Excitability in the Suprachiasmatic Nuclei of the Rat. *Eur J Neurosci.*
- Albin, R. L., et al., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366-75.
- Albus, H., et al., 2005. A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr Biol.* 15, 886-93.
- Alexander, G. E., Crutcher, M. D., 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13, 266-71.
- Alexander, G. E., et al., 1990. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res.* 85, 119-46.
- Alexander, G. E., et al., 1986. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci.* 9, 357-81.
- Allen, J. L., et al., 2014. Consequences of developmental exposure to concentrated ambient ultrafine particle air pollution combined with the adult paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype in male mice. *Neurotoxicology.* 41c, 80-88.
- Alvarez, L., et al., 2005. Bilateral subthalamotomy in Parkinson's disease: initial and long-term response. *Brain.* 128, 570-83.
- Andrew, R. D., Dudek, F. E., 1983. Burst discharge in mammalian neuroendocrine cells involves an intrinsic regenerative mechanism. *Science.* 221, 1050-2.
- Antle, M. C., Silver, R., 2005. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci.* 28, 145-51.
- Arnulf, I., 2012. REM sleep behavior disorder: motor manifestations and pathophysiology. *Mov Disord.* 27, 677-89.
- Arnulf, I., Leu-Semenescu, S., 2009. Sleepiness in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 15 Suppl 3, S101-4.
- Ascherio, A., et al., 2006. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 60, 197-203.
- Aschoff, J., 1984. Circadian timing. *Ann N Y Acad Sci.* 423, 442-68.
- Aston-Jones, G., Bloom, F. E., 1981. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci.* 1, 876-86.
- Aston-Jones, G., et al., 2001. A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nat Neurosci.* 4, 732-8.
- Aston-Jones, G., Cohen, J. D., 2005. An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci.* 28, 403-50.
- Aubert, I., et al., 2005. Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol.* 57, 17-26.

- Aziz, T. Z., et al., 1991. Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate. *Mov Disord.* 6, 288-92.
- Azmitia, E. C., Segal, M., 1978. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 179, 641-67.
- Baier, P. C., et al., 2006. Circadian distribution of motor-activity in unilaterally 6-hydroxy-dopamine lesioned rats. *Exp Brain Res.* 169, 283-8.
- Baloyannis, S. J., et al., 2006. Morphological alterations of the synapses in the locus coeruleus in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 248, 35-41.
- Baltazar, M. T., et al., 2014. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases-A mechanistic approach. *Toxicol Lett.*
- Barassin, S., et al., 2002. Circadian tryptophan hydroxylase levels and serotonin release in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Eur J Neurosci.* 15, 833-40.
- Bargiello, T. A., Young, M. W., 1984. Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81, 2142-6.
- Barlow, B. K., et al., 2003. Increased synaptosomal dopamine content and brain concentration of paraquat produced by selective dithiocarbamates. *Journal of Neurochemistry.* 85, 1075-1086.
- Barraud, Q., et al., 2009. Sleep disorders in Parkinson's disease: the contribution of the MPTP non-human primate model. *Exp Neurol.* 219, 574-82.
- Belenky, M. A., Pickard, G. E., 2001. Subcellular distribution of 5-HT(1B) and 5-HT(7) receptors in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol.* 432, 371-88.
- Belujon, P., et al., 2007. Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci.* 27, 9595-606.
- Ben, V., Bruguierolle, B., 2000. Effects of bilateral striatal 6-OHDA lesions on circadian rhythms in the rat: a radiotelemetric study. *Life Sci.* 67, 1549-58.
- Benarroch, E. E., 2009a. The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance. *Neurology.* 73, 1699-704.
- Benarroch, E. E., 2009b. Serotonergic modulation of basal ganglia circuits: complexity and therapeutic opportunities. *Neurology.* 73, 880-6.
- Benazzouz, A., et al., 2002. Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 17 Suppl 3, S145-9.
- Benazzouz, A., et al., 1993. Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci.* 5, 382-9.
- Benazzouz, A., Hallett, M., 2000. Mechanism of action of deep brain stimulation. *Neurology.* 55, S13-6.
- Benazzouz, A., et al., 2014. Involvement of dopamine loss in extrastriatal basal ganglia nuclei in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci.* 6, 87.
- Berger, M., et al., 2009. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med.* 60, 355-66.
- Bergman, H., et al., 1990. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science.* 249, 1436-8.
- Bergman, H., et al., 1994. The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol.* 72, 507-20.
- Bernheimer, H., et al., 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci.* 20, 415-55.
- Berson, D. M., et al., 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science.* 295, 1070-3.
- Bevan, M. D., et al., 2007. GABAergic control of the subthalamic nucleus. *Prog Brain Res.* 160, 173-88.
- Bezard, E., et al., 1999. Involvement of the subthalamic nucleus in glutamatergic compensatory mechanisms. *Eur J Neurosci.* 11, 2167-70.

- Bezard, E., et al., 2001. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 21, 6853-61.
- Bezard, E., et al., 1998. Experimental models of Parkinson's disease: from the static to the dynamic. *Rev Neurosci.* 9, 71-90.
- Bezard, E., Przedborski, S., 2011. A tale on animal models of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 26, 993-1002.
- Bhumbra, G. S., Dyball, R. E., 2010. Reading between the spikes of the hypothalamic neural code. *J Neuroendocrinol.* 22, 1239-50.
- Biello, S. M., 1995. Enhanced photic phase shifting after treatment with antiserum to neuropeptide Y. *Brain Res.* 673, 25-9.
- Blandini, F., Armentero, M. T., 2014. Dopamine receptor agonists for Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 23, 387-410.
- Blum, D., et al., 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, 135-72.
- Bobillier, P., et al., 1976. The raphe nuclei of the cat brain stem: a topographical atlas of their efferent projections as revealed by autoradiography. *Brain Res.* 113, 449-86.
- Bokobza, B., et al., 1984. [³H]spiperone binding, dopamine and HVA concentrations in Parkinson's disease and supranuclear palsy. *Eur J Pharmacol.* 99, 167-75.
- Bolam, J. P., Ellender, T. J., 2015. Histamine and the Striatum. *Neuropharmacology.*
- Bomasang-Layno, E., et al., 2015. Antidepressive treatments for Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord.* 21, 833-42; discussion 833.
- Bordet, R., et al., 2003. Study of circadian melatonin secretion pattern at different stages of Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol.* 26, 65-72.
- Borsini, F., Meli, A., 1988. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl).* 94, 147-60.
- Bos, N. P., Mirmiran, M., 1990. Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 511, 158-62.
- Bosler, O., Beaudet, A., 1985. VIP neurons as prime synaptic targets for serotonin afferents in rat suprachiasmatic nucleus: a combined radioautographic and immunocytochemical study. *J Neurocytol.* 14, 749-63.
- Bouabid, S., et al., 2014. Manganese-induced atypical parkinsonism is associated with altered Basal Ganglia activity and changes in tissue levels of monoamines in the rat. *PLoS One.* 9, e98952.
- Boulamery, A., et al., 2010. Effects of L-Dopa on circadian rhythms of 6-OHDA striatal lesioned rats: a radiotelemetric study. *Chronobiol Int.* 27, 251-64.
- Braak, H., et al., 2006. Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord.* 21, 2042-51.
- Braak, H., et al., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 24, 197-211.
- Braak, H., et al., 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 318, 121-34.
- Breit, S., et al., 2007. Effects of 6-hydroxydopamine-induced severe or partial lesion of the nigrostriatal pathway on the neuronal activity of pallido-subthalamic network in the rat. *Exp Neurol.* 205, 36-47.
- Bremer, T., 1920. Encephalite lethargique avec syndrome Parkinsonien et catatonie
Rev Neurol. 27, pp. 770-772.
- Brevetti, G., et al., 1990. Parkinson's disease and hypotension: 24-hour blood pressure recording in ambulant patients. *Clin Cardiol.* 13, 474-8.

- Brissaud, E., 1895. Nature et pathogenie de la maladie de Parkinson. . In: Masson G. editor. Lecons sur les maladies nerveuses, Paris.
- Brooks, A. I., et al., 1999. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res.* 823, 1-10.
- Brown, C. H., 2004. Rhythmogenesis in vasopressin cells. *J Neuroendocrinol.* 16, 727-39.
- Brown, D., et al., 2000. The variability of basal action potential firing is positively correlated with bursting in hypothalamic oxytocin neurones. *J Neuroendocrinol.* 12, 506-20.
- Brown, T. M., et al., 2007. Disrupted neuronal activity rhythms in the suprachiasmatic nuclei of vasoactive intestinal polypeptide-deficient mice. *J Neurophysiol.* 97, 2553-8.
- Brown, T. M., et al., 2008. Electrophysiological actions of orexins on rat suprachiasmatic neurons in vitro. *Neurosci Lett.* 448, 273-8.
- Brown, T. M., et al., 2005. Gastrin-releasing peptide promotes suprachiasmatic nuclei cellular rhythmicity in the absence of vasoactive intestinal polypeptide-VPAC2 receptor signaling. *J Neurosci.* 25, 11155-64.
- Brown, T. M., Piggins, H. D., 2007. Electrophysiology of the suprachiasmatic circadian clock. *Prog Neurobiol.* 82, 229-55.
- Bruin, V. M., et al., 2012. Sleep-wake disturbances in Parkinson's disease: current evidence regarding diagnostic and therapeutic decisions. *Eur Neurol.* 67, 257-67.
- Buijs, R. M., et al., 1994. Ultrastructural evidence for intra- and extranuclear projections of GABAergic neurons of the suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol.* 340, 381-91.
- Buijs, R. M., et al., 2003. The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol.* 464, 36-48.
- Buonamici, M., et al., 1986. D-1 receptor supersensitivity in the rat striatum after unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Eur J Pharmacol.* 126, 347-8.
- Burns, R. S., et al., 1983. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80, 4546-50.
- Cahill, G. M., Menaker, M., 1989. Responses of the suprachiasmatic nucleus to retinohypothalamic tract volleys in a slice preparation of the mouse hypothalamus. *Brain Res.* 479, 65-75.
- Campos, F. L., et al., 2013. Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Front Behav Neurosci.* 7, 175.
- Card, J. P., et al., 1981. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J Neurosci.* 1, 1289-303.
- Card, J. P., et al., 1988. Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res.* 252, 307-15.
- Card, J. P., Moore, R. Y., 1984. The suprachiasmatic nucleus of the golden hamster: immunohistochemical analysis of cell and fiber distribution. *Neuroscience.* 13, 415-31.
- Card, J. P., Moore, R. Y., 1989. Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J Comp Neurol.* 284, 135-47.
- Carlsson, A., 1959. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev.* 11, 490-3.
- Carlsson, A., et al., 1957. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature.* 180, 1200.
- Castaneda, T. R., et al., 2004. Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. *J Pineal Res.* 36, 177-85.
- Castel, M., et al., 1993. Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci.* 5, 368-81.
- Castel, M., Morris, J. F., 2000. Morphological heterogeneity of the GABAergic network in the suprachiasmatic nucleus, the brain's circadian pacemaker. *J Anat.* 196 (Pt 1), 1-13.

- Castelino, C. B., Schmidt, M. F., 2010. What birdsong can teach us about the central noradrenergic system. *J Chem Neuroanat.* 39, 96-111.
- Chan-Palay, V., 1991a. Alterations in the locus coeruleus in dementias of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Prog Brain Res.* 88, 625-30.
- Chan-Palay, V., 1991b. Locus coeruleus and norepinephrine in Parkinson's disease. *Jpn J Psychiatry Neurol.* 45, 519-21.
- Chan-Palay, V., Asan, E., 1989. Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *J Comp Neurol.* 287, 373-92.
- Charara, A., Parent, A., 1994. Brainstem dopaminergic, cholinergic and serotonergic afferents to the pallidum in the squirrel monkey. *Brain Res.* 640, 155-70.
- Chastrette, N., et al., 1991. Effects of daytime and nighttime stress on Fos-like immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, the habenula, and the posterior paraventricular nucleus of the thalamus. *Brain Res.* 563, 339-44.
- Chaudhuri, K. R., et al., 2006. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 5, 235-45.
- Chaudhuri, K. R., Martinez-Martin, P., 2008. Quantitation of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 15 Suppl 2, 2-7.
- Chaudhuri, K. R., Naidu, Y., 2008. Early Parkinson's disease and non-motor issues. *J Neurol.* 255 Suppl 5, 33-8.
- Chaudhuri, K. R., Odin, P., 2010. The challenge of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Prog Brain Res.* 184, 325-41.
- Chetrit, J., et al., 2009. Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics. *PLoS One.* 4, e6208.
- Chiba, K., et al., 1984. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 120, 574-8.
- Chin-Chan, M., et al., 2015. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci.* 9, 124.
- Cicchetti, F., et al., 2009. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends Pharmacol Sci.* 30, 475-83.
- Cicchetti, F., et al., 2005. Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiol Dis.* 20, 360-71.
- Cocheme, H. M., Murphy, M. P., 2008. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem.* 283, 1786-98.
- Colwell, C. S., 2000. Rhythmic coupling among cells in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurobiol.* 43, 379-88.
- Colwell, C. S., 2010. Preventing dehydration during sleep. *Nat Neurosci.* 13, 403-4.
- Colwell, C. S., et al., 2003. Disrupted circadian rhythms in VIP- and PHI-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285, R939-49.
- Colwell, C. S., et al., 1990. Do NMDA receptors mediate the effects of light on circadian behavior? *Brain Res.* 523, 117-20.
- Corasaniti, M. T., et al., 1991. Evidence that paraquat is able to cross the blood-brain barrier to a different extent in rats of various age. *Funct Neurol.* 6, 385-91.
- Corasaniti, M. T., Nistico, G., 1993. Determination of paraquat in rat brain by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 643, 419-25.
- Crane, B. R., Young, M. W., 2014. Interactive features of proteins composing eukaryotic circadian clocks. *Annu Rev Biochem.* 83, 191-219.
- Creese, I., et al., 1977. Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science.* 197, 596-8.
- Cui, L. N., Dyball, R. E., 1996. Synaptic input from the retina to the suprachiasmatic nucleus changes with the light-dark cycle in the Syrian hamster. *J Physiol.* 497 (Pt 2), 483-93.

- Cutler, D. J., et al., 1998. Responses to neuropeptide Y in adult hamster suprachiasmatic nucleus neurones in vitro. *Eur J Pharmacol.* 345, 155-62.
- Dahlstroem, A., Fuxe, K., 1964. EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta Physiol Scand Suppl. Suppl 232*:1-55.
- Dahlstrom, A., Fuxe, K., 1964. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia.* 20, 398-9.
- Dai, J., et al., 1997. Distribution of vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) fibers in the human hypothalamus with special emphasis on suprachiasmatic nucleus efferent projections. *J Comp Neurol.* 383, 397-414.
- Dai, J., et al., 1998. Postmortem tracing reveals the organization of hypothalamic projections of the suprachiasmatic nucleus in the human brain. *J Comp Neurol.* 400, 87-102.
- Dailly, E., et al., 2006. Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of Swiss mice by neurotoxins. *J Neurosci Methods.* 150, 111-5.
- Dardente, H., Cermakian, N., 2005. [How many pieces to build a circadian clock?]. *Med Sci (Paris).* 21, 66-72.
- Dardente, H., et al., 2004. Daily and circadian expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Brain Res Mol Brain Res.* 124, 143-51.
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 39, 889-909.
- Davis, G. C., et al., 1979. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1, 249-54.
- Day, M., et al., 2006. Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci.* 9, 251-9.
- De Cock, V. C., et al., 2008. Sleep disturbances in patients with parkinsonism. *Nat Clin Pract Neurol.* 4, 254-66.
- De Gori, N., et al., 1988. Behavioural and electrocortical changes induced by paraquat after injection in specific areas of the brain of the rat. *Neuropharmacology.* 27, 201-7.
- De Jeu, M., Pennartz, C., 2002. Circadian modulation of GABA function in the rat suprachiasmatic nucleus: excitatory effects during the night phase. *J Neurophysiol.* 87, 834-44.
- Deboer, T., et al., 2007. Long term effects of sleep deprivation on the mammalian circadian pacemaker. *Sleep.* 30, 257-62.
- Deboer, T., et al., 2003. Sleep states alter activity of suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat Neurosci.* 6, 1086-90.
- Delaville, C., et al., 2012. Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in Parkinsonism. *Neurobiol Dis.* 45, 763-73.
- Delaville, C., et al., 2011. Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci.* 5, 31.
- DeLong, M. R., 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13, 281-5.
- DeLong, M. R., Wichmann, T., 2007. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol.* 64, 20-4.
- Detke, M. J., et al., 1995. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl).* 121, 66-72.
- Deurveilher, S., Semba, K., 2005. Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience.* 130, 165-83.
- Dey, M. S., et al., 1990. Paraquat pharmacokinetics using a subcutaneous toxic low dose in the rat. *Fundam Appl Toxicol.* 14, 208-16.
- Dhawan, V., et al., 2006. Sleep-related problems of Parkinson's disease. *Age Ageing.* 35, 220-8.
- Di Giovanni, G., et al., 2008. Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog Brain Res.* 172, 45-71.
- Di Rocco, A., et al., 1996. Parkinson's disease: progression and mortality in the L-DOPA era. *Adv Neurol.* 69, 3-11.

- Dibner, C., et al., 2010. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol.* 72, 517-49.
- Dick, F. D., et al., 2007. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med.* 64, 666-72.
- Diederich, N. J., McIntyre, D. J., 2012. Sleep disorders in Parkinson's disease: many causes, few therapeutic options. *J Neurol Sci.* 314, 12-9.
- Doi, M., et al., 2006. Impaired light masking in dopamine D2 receptor-null mice. *Nat Neurosci.* 9, 732-4.
- Doig, N. M., et al., 2010. Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J Neurosci.* 30, 14610-8.
- Dorenbos, R., et al., 2007. Expression of circadian clock genes in retinal dopaminergic cells. *Vis Neurosci.* 24, 573-80.
- Dray, A., et al., 1976. Evidence for the existence of a raphe projection to the substantia nigra in rat. *Brain Res.* 113, 45-57.
- Duffield, G. E., et al., 1998. Investigation into the regulation of the circadian system by dopamine and melatonin in the adult Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Neuroendocrinol.* 10, 871-84.
- Duncan, M. J., et al., 2000. Localization of serotonin(5A) receptors in discrete regions of the circadian timing system in the Syrian hamster. *Brain Res.* 869, 178-85.
- Duncan, M. J., et al., 1999. Comparison of the effects of aging on 5-HT7 and 5-HT1A receptors in discrete regions of the circadian timing system in hamsters. *Brain Res.* 829, 39-45.
- Dutton, A., Dyball, R. E., 1979. Phasic firing enhances vasopressin release from the rat neurohypophysis. *J Physiol.* 290, 433-40.
- Duty, S., Jenner, P., 2011. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol.* 164, 1357-91.
- Earnest, D. J., et al., 1991. Effects of tetrodotoxin on the circadian pacemaker mechanism in suprachiasmatic explants in vitro. *Brain Res Bull.* 26, 677-82.
- Earnest, D. J., et al., 1999. Immortal time: circadian clock properties of rat suprachiasmatic cell lines. *Science.* 283, 693-5.
- Edgar, D. M., et al., 1991. Activity feedback to the mammalian circadian pacemaker: influence on observed measures of rhythm period length. *J Biol Rhythms.* 6, 185-99.
- Edgar, D. M., et al., 1993. Serotonin and the mammalian circadian system: II. Phase-shifting rat behavioral rhythms with serotonergic agonists. *J Biol Rhythms.* 8, 17-31.
- Ehringer, H., Hornykiewicz, O., 1960. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr.* 38, 1236-9.
- Eisenberg, D. P., et al., 2010. Seasonal effects on human striatal presynaptic dopamine synthesis. *J Neurosci.* 30, 14691-4.
- Ejaz, A. A., et al., 2006. Characteristic findings on 24-h ambulatory blood pressure monitoring in a series of patients with Parkinson's disease. *Eur J Intern Med.* 17, 417-20.
- Erhardt, C., et al., 2004. Modulation of photic resetting in rats by lesions of projections to the suprachiasmatic nuclei expressing p75 neurotrophin receptor. *Eur J Neurosci.* 19, 1773-88.
- Erspamer V, V. M., 1937. Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Boll d Soc Med-chir Pavia.* 51:357-363.
- Fahim, M. A., et al., 2013. Daily subacute paraquat exposure decreases muscle function and substantia nigra dopamine level. *Physiol Res.* 62, 313-21.
- Fahn, S., et al., 1971. Monoamines in the human neostriatum: topographic distribution in normals and in Parkinson's disease and their role in akinesia, rigidity, chorea, and tremor. *J Neurol Sci.* 14, 427-55.

- FALCK, B., et al., 1962. FLUORESCENCE OF CATECHOL AMINES AND RELATED COMPOUNDS CONDENSED WITH FORMALDEHYDE. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 10, 348-354.
- Faull, R. L., Laverty, R., 1969. Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Exp Neurol*. 23, 332-40.
- Feng, Y., et al., 2015. Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 349, 3-9.
- Ferraz, H. B., et al., 1988. Chronic exposure to the fungicide maneb may produce symptoms and signs of CNS manganese intoxication. *Neurology*. 38, 550-3.
- Fifel, K., Cooper, H. M., 2014. Loss of dopamine disrupts circadian rhythms in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 71, 359-69.
- Fifel, K., et al., 2013. Lack of long-term changes in circadian, locomotor, and cognitive functions in acute and chronic MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) mouse models of Parkinson's disease. *Chronobiol Int*. 30, 741-55.
- Fifel, K., et al., 2014. Alteration of daily and circadian rhythms following dopamine depletion in MPTP treated non-human primates. *PLoS One*. 9, e86240.
- Filion, M., 1979. Effects of interruption of the nigrostriatal pathway and of dopaminergic agents on the spontaneous activity of globus pallidus neurons in the awake monkey. *Brain Res*. 178, 425-41.
- Fite, K. V., et al., 1999. Retinal afferents to the dorsal raphe nucleus in rats and Mongolian gerbils. *J Comp Neurol*. 414, 469-84.
- Forger, D., et al., 2007. Beyond intuitive modeling: combining biophysical models with innovative experiments to move the circadian clock field forward. *J Biol Rhythms*. 22, 200-10.
- Fox, S. H., et al., 2008. Non-dopaminergic treatments in development for Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 7, 927-38.
- Franco, R., et al., 2010. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chem Biol Interact*. 188, 289-300.
- Francois-Bellan, A. M., Bosler, O., 1992. Convergent serotonin and GABA innervation of VIP neurons in the suprachiasmatic nucleus demonstrated by triple labeling in the rat. *Brain Res*. 595, 149-53.
- Frisina, P. G., et al., 2009. The neuropathological basis for depression in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 15, 144-8.
- Fukuhara, C., et al., 1997. Day-night variation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) level in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*. 229, 49-52.
- Fuxe, K., et al., 2007. From the Golgi-Cajal mapping to the transmitter-based characterization of the neuronal networks leading to two modes of brain communication: wiring and volume transmission. *Brain Res Rev*. 55, 17-54.
- Fuxe, K., et al., 1970. Immunohistochemical localization of dopamine- α -hydroxylase in the peripheral and central nervous system. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1, 627-36.
- Gallego, M., et al., 2006. An opposite role for tau in circadian rhythms revealed by mathematical modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 10618-23.
- Galvan, A., Wichmann, T., 2008. Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol*. 119, 1459-74.
- Gardoni, F., Bellone, C., 2015. Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. *Front Cell Neurosci*. 9, 25.
- Gaspar, P., et al., 1991. Alterations of dopaminergic and noradrenergic innervations in motor cortex in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 30, 365-74.
- Gerfen, C. R., et al., 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*. 250, 1429-32.
- Gerfen, C. R., Surmeier, D. J., 2011. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci*. 34, 441-66.
- Gerson, S. C., Baldessarini, R. J., 1980. Motor effects of serotonin in the central nervous system. *Life Sci*. 27, 1435-51.

- Gillette, M. U., et al., 1995. Intrinsic neuronal rhythms in the suprachiasmatic nuclei and their adjustment. *Ciba Found Symp.* 183, 134-44; discussion 144-53.
- Glass, J. D., et al., 2012. Cocaine modulates pathways for photic and nonphotic entrainment of the mammalian SCN circadian clock. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 302, R740-50.
- Goedert, M., et al., 2013. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol.* 9, 13-24.
- Goetz, C. G., 2011. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1, a008862.
- Goldman-Rakic, P. S., 1998. The cortical dopamine system: role in memory and cognition. *Adv Pharmacol.* 42, 707-11.
- Golombek, D. A., Rosenstein, R. E., 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev.* 90, 1063-102.
- Gorell, J., et al., 2006. Whole-Body Lifetime Occupational Lead Exposure And Risk Of Parkinson's Disease. *Environmental Health Perspectives.*
- Graham, D. G., 1978. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol.* 14, 633-43.
- Gravotta, L., et al., 2011. Global depletion of dopamine using intracerebroventricular 6-hydroxydopamine injection disrupts normal circadian wheel-running patterns and PERIOD2 expression in the rat forebrain. *J Mol Neurosci.* 45, 162-71.
- Graybiel, A. M., et al., 1994. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science.* 265, 1826-31.
- Green, D. J., Gillette, R., 1982. Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.* 245, 198-200.
- Gribkoff, V. K., et al., 1998. Phase shifting of circadian rhythms and depression of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus by neuropeptide Y: mediation by different receptor subtypes. *J Neurosci.* 18, 3014-22.
- Grillner, S., et al., 2005. Mechanisms for selection of basic motor programs--roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci.* 28, 364-70.
- Groos, G., Mason, R., 1978. Maintained discharge of rat suprachiasmatic neurons at different adaptation levels. *Neurosci Lett.* 8, 59-64.
- Groos, G. A., Hendriks, J., 1979. Regularly firing neurones in the rat suprachiasmatic nucleus. *Experientia.* 35, 1597-8.
- Guigoni, C., et al., 2005. Pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia: focus on D1 and D3 dopamine receptors. *Parkinsonism Relat Disord.* 11 Suppl 1, S25-9.
- Guilarte, T. R., 2013. Manganese neurotoxicity: new perspectives from behavioral, neuroimaging, and neuropathological studies in humans and non-human primates. *Front Aging Neurosci.* 5, 23.
- Guillaumond, F., et al., 2005. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms.* 20, 391-403.
- Guldner, F. H., Wolff, J. R., 1978. Retinal afferents form Gray-type-I and type-II synapses in the suprachiasmatic nucleus (rat). *Exp Brain Res.* 32, 83-9.
- Hajos, M., et al., 1995. Evidence for a repetitive (burst) firing pattern in a sub-population of 5-hydroxytryptamine neurons in the dorsal and median raphe nuclei of the rat. *Neuroscience.* 69, 189-97.
- Hajos, M., et al., 1996. Intracellular recordings from burst-firing presumed serotonergic neurones in the rat dorsal raphe nucleus in vivo. *Brain Res.* 737, 308-12.
- Haller, E. W., Wakerley, J. B., 1980. Electrophysiological studies of paraventricular and supraoptic neurones recorded in vitro from slices of rat hypothalamus. *J Physiol.* 302, 347-62.
- Halliday, G., et al., 2008. The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 115, 409-15.
- Halliday, G. M., et al., 1990a. Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Res.* 510, 104-7.
- Halliday, G. M., et al., 1990b. Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Res.* 510, 104-7.

- Hamada, T., et al., 2004. Temporal and spatial expression patterns of canonical clock genes and clock-controlled genes in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci.* 19, 1741-8.
- Hamp, G., et al., 2008. Regulation of monoamine oxidase A by circadian-clock components implies clock influence on mood. *Curr Biol.* 18, 678-83.
- Hannibal, J., et al., 1998. Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a daytime regulator of the biological clock. *Ann N Y Acad Sci.* 865, 197-206.
- Hannibal, J., et al., 2002. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci.* 22, Rc191.
- Happe, S., et al., 2007. Association of daytime sleepiness with nigrostriatal dopaminergic degeneration in early Parkinson's disease. *J Neurol.* 254, 1037-43.
- Harrington, M. E., 1997. The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neurosci Biobehav Rev.* 21, 705-27.
- Hartmann, A., et al., 1997. Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: ultradian secretory pulsatility and diurnal variation. *Neurobiol Aging.* 18, 285-9.
- Hassani, O. K., et al., 1996. Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus. *Neuroscience.* 72, 105-15.
- Hassler, R., 1939. Zur pathologischen anatomie des senilen und des parkinsonistischen tremor *J Psychol Neurol* pp. 13–15.
- Hastings, M. H., et al., 1999. Differential regulation of mPER1 and mTIM proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei: new insights into a core clock mechanism. *J Neurosci.* 19, Rc11.
- Hatcher, J. M., et al., 2008. Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends Pharmacol Sci.* 29, 322-9.
- Hatton, G. I., 1982. Phasic bursting activity of rat paraventricular neurones in the absence of synaptic transmission. *J Physiol.* 327, 273-84.
- Hay-Schmidt, A., et al., 2003. Projections from the raphe nuclei to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *J Chem Neuroanat.* 25, 293-310.
- Hefti, F., et al., 1980. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res.* 195, 123-37.
- Hely, M. A., et al., 2005. Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Mov Disord.* 20, 190-9.
- Hely, M. A., et al., 2008. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Mov Disord.* 23, 837-44.
- Hendrickson, A. E., et al., 1972. An autoradiographic and electron microscopic study of retinohypothalamic connections. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 135, 1-26.
- Hermes, M. L., et al., 1996. GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from suprachiasmatic nucleus to hypothalamic paraventricular nucleus in rat. *J Physiol.* 496 (Pt 3), 749-57.
- Herrera-Marschitz, M., et al., 2010. The rotational model and microdialysis: Significance for dopamine signalling, clinical studies, and beyond. *Prog Neurobiol.* 90, 176-89.
- Hertzman, C., et al., 1990. Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors. *Am J Ind Med.* 17, 349-55.
- Hickey, T. L., Spear, P. D., 1976. Retinogeniculate projections in hooded and albino rats: an autoradiographic study. *Exp Brain Res.* 24, 523-9.
- Hill, M. P., Brotchie, J. M., 1999. The adrenergic receptor agonist, clonidine, potentiates the anti-parkinsonian action of the selective kappa-opioid receptor agonist, enadoline, in the monoamine-depleted rat. *Br J Pharmacol.* 128, 1577-85.

- Hillarp, N. A., et al., 1966. Demonstration and mapping of central neurons containing dopamine, noradrenaline, and 5-hydroxytryptamine and their reactions to psychopharmaca. *Pharmacol Rev.* 18, 727-41.
- Hirsh, J., et al., 2010. Roles of dopamine in circadian rhythmicity and extreme light sensitivity of circadian entrainment. *Curr Biol.* 20, 209-14.
- Hisano, S., et al., 1988. Suprachiasmatic nucleus neurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide have synaptic contacts with axons immunoreactive for neuropeptide Y: an immunoelectron microscopic study in the rat. *Neurosci Lett.* 88, 145-50.
- Hobson, J. A., et al., 1975. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science.* 189, 55-8.
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 117, 500-44.
- Holdorff, B., et al., 2013. Centenary of Lewy bodies (1912-2012). *J Neural Transm.* 120, 509-16.
- Honma, K., Honma, S., 2009. The SCN-independent clocks, methamphetamine and food restriction. *Eur J Neurosci.* 30, 1707-17.
- Hood, S., et al., 2010. Endogenous dopamine regulates the rhythm of expression of the clock protein PER2 in the rat dorsal striatum via daily activation of D2 dopamine receptors. *J Neurosci.* 30, 14046-58.
- Hoorneman, E. M., Buijs, R. M., 1982. Vasopressin fiber pathways in the rat brain following suprachiasmatic nucleus lesioning. *Brain Res.* 243, 235-41.
- Hornykiewicz, O., Kish, S. J., 1987. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv Neurol.* 45, 19-34.
- Horowitz, S. S., et al., 2004. Intergeniculate leaflet and ventral lateral geniculate nucleus afferent connections: An anatomical substrate for functional input from the vestibulo-visuomotor system. *J Comp Neurol.* 474, 227-45.
- Houben, T., et al., 2014. Regulation of circadian and acute activity levels by the murine suprachiasmatic nuclei. *PLoS One.* 9, e110172.
- Houben, T., et al., 2009. Correlation with behavioral activity and rest implies circadian regulation by SCN neuronal activity levels. *J Biol Rhythms.* 24, 477-87.
- Huang, S. K., Pan, J. T., 1993. Potentiating effects of serotonin and vasoactive intestinal peptide on the action of glutamate on suprachiasmatic neurons in brain slices. *Neurosci Lett.* 159, 1-4.
- Huerta-Ocampo, I., et al., 2014. Convergence of cortical and thalamic input to direct and indirect pathway medium spiny neurons in the striatum. *Brain Struct Funct.* 219, 1787-800.
- Huot, P., Fox, S. H., 2013. The serotonergic system in motor and non-motor manifestations of Parkinson's disease. *Exp Brain Res.* 230, 463-76.
- Hutchison, W. D., et al., 1998. Neurophysiological identification of the subthalamic nucleus in surgery for Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 44, 622-8.
- Ibata, Y., et al., 1989. Vasoactive intestinal peptide (VIP)-like immunoreactive neurons located in the rat suprachiasmatic nucleus receive a direct retinal projection. *Neurosci Lett.* 97, 1-5.
- Imai, H., et al., 1986. The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 243, 363-80.
- Imbesi, M., et al., 2009. Dopamine receptor-mediated regulation of neuronal "clock" gene expression. *Neuroscience.* 158, 537-44.
- Ingham, C. A., et al., 1989. Spine density on neostriatal neurones changes with 6-hydroxydopamine lesions and with age. *Brain Res.* 503, 334-8.
- Inouye, S.-i., Kawamura, H., 1982. Characteristics of a circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of comparative physiology.* 146, 153-160.
- Inouye, S. T., Kawamura, H., 1979. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76, 5962-6.
- Iranzo, A., 2011. Sleep-wake changes in the premotor stage of Parkinson disease. *J Neurol Sci.* 310, 283-5.

- Ironside, S., et al., 2010. Circadian motor activity affected by stimulant medication in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Sleep Res.* 19, 546-51.
- Ishida, Y., et al., 2002. Circadian rhythm of aromatic L-amino acid decarboxylase in the rat suprachiasmatic nucleus: gene expression and decarboxylating activity in clock oscillating cells. *Genes Cells.* 7, 447-59.
- Isobe, Y., Nishihara, K., 2002. Serotonin-stimulated glutamate release from an SCN explant culture was higher during light period. *Brain Res Bull.* 58, 401-4.
- Isobe, Y., Nishino, H., 1996. Vasoactive intestinal peptide and gastrin-releasing peptide play distinct roles in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Bull.* 40, 287-90.
- Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., 2007. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nat Protoc.* 2, 141-51.
- Jackson, C. R., et al., 2011. Dopamine D(4) receptor activation controls circadian timing of the adenylyl cyclase 1/cyclic AMP signaling system in mouse retina. *Eur J Neurosci.* 34, 57-64.
- Jackson, C. R., et al., 2012. Retinal dopamine mediates multiple dimensions of light-adapted vision. *J Neurosci.* 32, 9359-68.
- Jahanshahi, A., et al., 2013. Distribution of dopaminergic cell bodies in the median raphe nucleus of the rat brain. *J Chem Neuroanat.* 53, 60-3.
- Jain, S., 2011. Multi-organ autonomic dysfunction in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 17, 77-83.
- Jain, S., Goldstein, D. S., 2012. Cardiovascular dysautonomia in Parkinson disease: from pathophysiology to pathogenesis. *Neurobiol Dis.* 46, 572-80.
- Jankovic, J., 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 79, 368-76.
- Janssen, M. L., et al., 2012. Subthalamic neuronal responses to cortical stimulation. *Mov Disord.* 27, 435-8.
- Javitch, J. A., et al., 1985. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 2173-7.
- Jellinger, K. A., 2010. Critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 67, 550.
- Jenner, P., et al., 1984. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci Lett.* 50, 85-90.
- Jenner, P., et al., 1983. Noradrenaline and 5-hydroxytryptamine modulation of brain dopamine function: implications for the treatment of Parkinson's disease. *Br J Clin Pharmacol.* 15 Suppl 2, 277s-289s.
- Jeon, B. S., et al., 1995. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration.* 4, 131-7.
- Jiang, Z. G., et al., 1997. Membrane properties and synaptic inputs of suprachiasmatic nucleus neurons in rat brain slices. *J Physiol.* 499 (Pt 1), 141-59.
- Jiao, Y. Y., Rusak, B., 2003. Electrophysiology of optic nerve input to suprachiasmatic nucleus neurons in rats and degus. *Brain Res.* 960, 142-51.
- Johannessen, J. N., et al., 1985. Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects. *Life Sci.* 36, 219-24.
- Johnson, R. F., et al., 1988. Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res.* 462, 301-12.
- Jolkkonen, J., et al., 1988. Vasopressin levels in the cerebrospinal fluid of rats with lesions of the paraventricular and suprachiasmatic nuclei. *Neurosci Lett.* 86, 184-8.
- Jonsson, G., 1980. Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology. *Annu Rev Neurosci.* 3, 169-87.
- Kafka, M. S., et al., 1986. Circadian rhythms in catecholamine metabolites and cyclic nucleotide production. *Chronobiol Int.* 3, 101-15.
- Kalia, L. V., Lang, A. E., 2015. Parkinson's disease. *Lancet.* 386, 896-912.

- Kallio, M., et al., 2000. Heart rate variability in patients with untreated Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 7, 667-72.
- Kalsbeek, A., et al., 1995. In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 682, 75-82.
- Kalsbeek, A., et al., 2006. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J Biol Rhythms.* 21, 458-69.
- Kamel, F., et al., 2007. Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the agricultural health study. *Am J Epidemiol.* 165, 364-74.
- Kaneoke, Y., Vitek, J. L., 1996. Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *J Neurosci Methods.* 68, 211-23.
- Karlsen, K. H., et al., 1999. Influence of clinical and demographic variables on quality of life in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 66, 431-5.
- Kawaguchi, Y., et al., 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* 18, 527-35.
- Kawano, H., et al., 1996. Is there a direct retina-raphé-suprachiasmatic nucleus pathway in the rat? *Neurosci Lett.* 212, 143-6.
- Kelly, R. M., Strick, P. L., 2004. Macro-architecture of basal ganglia loops with the cerebral cortex: use of rabies virus to reveal multisynaptic circuits. *Prog Brain Res.* 143, 449-59.
- Kempster, P. A., et al., 2010. Relationships between age and late progression of Parkinson's disease: a clinico-pathological study. *Brain.* 133, 1755-62.
- Kerenyi, L., et al., 2003. Positron emission tomography of striatal serotonin transporters in Parkinson disease. *Arch Neurol.* 60, 1223-9.
- Khoo, T. K., et al., 2013. The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease. *Neurology.* 80, 276-81.
- Kim, Y. I., Dudek, F. E., 1993. Membrane properties of rat suprachiasmatic nucleus neurons receiving optic nerve input. *J Physiol.* 464, 229-43.
- Kish, S. J., et al., 2008. Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain.* 131, 120-31.
- Kiss, J., Halasz, B., 1996. Synaptic contacts between cholinergic afferents and suprachiasmatic neurones of the rat. *Neuroreport.* 7, 1961-4.
- Kiss, J., et al., 1984. Serotonergic endings on VIP-neurons in the suprachiasmatic nucleus and on ACTH-neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. A combination of high resolution autoradiography and electron microscopic immunocytochemistry. *Neurosci Lett.* 44, 119-24.
- Klawans, H. L., 1986. Individual manifestations of Parkinson's disease after ten or more years of levodopa. *Mov Disord.* 1, 187-92.
- Koike, N., et al., 2012. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science.* 338, 349-54.
- Kononenko, N. I., et al., 2008. Circadian difference in firing rate of isolated rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Neurosci Lett.* 436, 314-6.
- Kopin, I. J., 1968. Biosynthesis and metabolism of catecholamines. *Anesthesiology.* 29, 654-60.
- Kow, L. M., Pfaff, D. W., 1984. Suprachiasmatic neurons in tissue slices from ovariectomized rats: electrophysiological and neuropharmacological characterization and the effects of estrogen treatment. *Brain Res.* 297, 275-86.
- Krauchi, K., et al., 1984. Hypothalamic alpha 2- and beta-adrenoceptor rhythms are correlated with circadian feeding: evidence from chronic methamphetamine treatment and withdrawal. *Brain Res.* 321, 83-90.
- Kravitz, A. V., et al., 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature.* 466, 622-6.
- Kruisbrink, J., et al., 1987. Effects of enhanced cerebrospinal fluid levels of vasopressin, vasopressin antagonist or vasoactive intestinal polypeptide on circadian sleep-wake rhythm in the rat. *Brain Res.* 419, 76-86.

- Ku, Y. H., Wang, X. Q., 1991. Favored patterns in spontaneous spike trains. *Brain Res.* 559, 241-8.
- Kudo, T., et al., 2011. Circadian dysfunction in a mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 232, 66-75.
- Kuehl-Kovarik, M. C., et al., 2005. Spike-dependent depolarizing afterpotentials contribute to endogenous bursting in gonadotropin releasing hormone neurons. *Neuroscience.* 134, 295-300.
- Kunz, D., Mahlberg, R., 2010. A two-part, double-blind, placebo-controlled trial of exogenous melatonin in REM sleep behaviour disorder. *J Sleep Res.* 19, 591-6.
- Kuopio, A. M., et al., 2000. The quality of life in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 15, 216-23.
- Laemle, L. K., et al., 2002. Physiological and anatomical properties of the suprachiasmatic nucleus of an anophthalmic mouse. *Brain Res.* 953, 73-81.
- Laloux, C., et al., 2008. MPTP-treated mice: long-lasting loss of nigral TH-ir neurons but not paradoxical sleep alterations. *Exp Brain Res.* 186, 635-42.
- Langston, J. W., 2006. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann Neurol.* 59, 591-6.
- Langston, J. W., Ballard, P., 1984. Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci.* 11, 160-5.
- Langston, J. W., et al., 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 219, 979-80.
- Lavoie, B., Parent, A., 1990. Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey. *J Comp Neurol.* 299, 1-16.
- Leak, R. K., et al., 1999. Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Res.* 819, 23-32.
- Leander, P., et al., 1998. Neuronal projections from the mesencephalic raphe nuclear complex to the suprachiasmatic nucleus and the deep pineal gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Neurol.* 399, 73-93.
- Lee, J. I., et al., 2001. Increased burst firing in substantia nigra pars reticulata neurons and enhanced response to selective D2 agonist in hemiparkinsonian rats after repeated administration of apomorphine. *J Korean Med Sci.* 16, 636-42.
- Lee, T., et al., 1978. Receptor basis for dopaminergic supersensitivity in Parkinson's disease. *Nature.* 273, 59-61.
- Lees, A. J., et al., 2008. The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. *Mov Disord.* 23, 777-83.
- Lehman, M. N., et al., 1987. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci.* 7, 1626-38.
- Levesque, M., Parent, A., 2005. The striatofugal fiber system in primates: a reevaluation of its organization based on single-axon tracing studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 11888-93.
- Levy, R., et al., 2002. Synchronized neuronal discharge in the basal ganglia of parkinsonian patients is limited to oscillatory activity. *J Neurosci.* 22, 2855-61.
- Lewandowski, M. H., 2002. [Electrophysiologic examination of the circadian clock in mammals]. *Postepy Hig Med Dosw.* 56, 331-9.
- Lewandowski, M. H., Blasiak, T., 2004. Slow oscillation circuit of the intergeniculate leaflet. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 64, 277-88.
- Lewandowski, M. H., et al., 2000. Ultradian rhythmic neuronal oscillation in the intergeniculate leaflet. *Neuroreport.* 11, 317-21.
- Lewis, J. E., et al., 1992. Phase resetting and fixed-delay stimulation of a simple model of respiratory rhythm generation. *J Theor Biol.* 159, 491-506.
- Li, C., et al., 2007. Differences in spike train variability in rat vasopressin and oxytocin neurons and their relationship to synaptic activity. *J Physiol.* 581, 221-40.

- Li, X., et al., 2005. Neuroprotective effects of Polygonum multiflorum on nigrostriatal dopaminergic degeneration induced by paraquat and maneb in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 82, 345-52.
- Lima, M. M., et al., 2007. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. *PLoS One.* 2, e513.
- Lima, R. R., et al., 2012. Retinal projections and neurochemical characterization of the pregeniculate nucleus of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Chem Neuroanat.* 44, 34-44.
- Lindenbach, D., et al., 2015. Side effect profile of 5-HT treatments for Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia in rats. *Br J Pharmacol.* 172, 119-30.
- Ling, D. S., et al., 1990. Development of spontaneous electrical activity by rat hypothalamic neurons in dissociated culture. *Brain Res Dev Brain Res.* 53, 276-82.
- Liou, H. H., et al., 1996. Effects of paraquat on the substantia nigra of the wistar rats: neurochemical, histological, and behavioral studies. *Toxicol Appl Pharmacol.* 137, 34-41.
- Liou, H. H., et al., 1997. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology.* 48, 1583-8.
- Liou, S. Y., Albers, H. E., 1991. Single unit response of neurons within the hamster suprachiasmatic nucleus to neuropeptide Y. *Brain Res Bull.* 27, 825-8.
- Liou, S. Y., et al., 1986a. Optic nerve stimulation-induced increase of release of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res Bull.* 16, 527-31.
- Liou, S. Y., et al., 1986b. Effect of monoamines on field potentials in the suprachiasmatic nucleus of slices of hypothalamus of the rat evoked by stimulation of the optic nerve. *Neuropharmacology.* 25, 1009-14.
- Litteljohn, D., et al., 2008. Cyclooxygenase-2 deficiency modifies the neurochemical effects, motor impairment and co-morbid anxiety provoked by paraquat administration in mice. *Eur J Neurosci.* 28, 707-16.
- Liu, C., et al., 2007a. Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature.* 447, 477-81.
- Liu, C., Reppert, S. M., 2000. GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron.* 25, 123-8.
- Liu, C., et al., 1997. Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell.* 91, 855-60.
- Liu, J., et al., 2007b. 5,7-dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus alters neuronal activity of the subthalamic nucleus in normal and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res.* 1149, 216-22.
- Locke, J. C., et al., 2005. Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Mol Syst Biol.* 1, 2005.0013.
- Long, M. A., et al., 2005. Electrical synapses coordinate activity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Neurosci.* 8, 61-6.
- Lundkvist, G. B., et al., 2002. The suprachiasmatic nucleus exhibits diurnal variations in spontaneous excitatory postsynaptic activity. *J Biol Rhythms.* 17, 40-51.
- Luthman, J., et al., 1989. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res.* 33, 267-77.
- Magnin, M., et al., 2000. Single-unit analysis of the pallidum, thalamus and subthalamic nucleus in parkinsonian patients. *Neuroscience.* 96, 549-64.
- Mai, J. K., et al., 1991. Evidence for subdivisions in the human suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol.* 305, 508-25.
- Mallet, N., et al., 2005. Feedforward inhibition of projection neurons by fast-spiking GABA interneurons in the rat striatum in vivo. *J Neurosci.* 25, 3857-69.
- Malmfors, T., Sachs, C., 1968. Degeneration of adrenergic nerves produced by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol.* 3, 89-92.

- Mann, D. M., Yates, P. O., 1983. Pathological basis for neurotransmitter changes in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 9, 3-19.
- Manning-Bog, A. B., et al., 2002. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 277, 1641-4.
- Marie, R. M., et al., 1995. PET imaging of neocortical monoaminergic terminals in Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 9, 55-71.
- Marsden, C. D., 1982. The mysterious motor function of the basal ganglia: the Robert Wartenberg Lecture. *Neurology.* 32, 514-39.
- Marshall, J. F., et al., 1989. Decreased striatal D1 binding density following mesotelencephalic 6-hydroxydopamine injections: an autoradiographic analysis. *Brain Res.* 493, 247-57.
- Mason, R., 1986. Circadian variation in sensitivity of suprachiasmatic and lateral geniculate neurones to 5-hydroxytryptamine in the rat. *J Physiol.* 377, 1-13.
- Mason, R., et al., 1987. Electrophysiological responses of hamster suprachiasmatic neurones to neuropeptide Y in the hypothalamic slice preparation. *Neurosci Lett.* 80, 173-9.
- Mayer, G., et al., 2011. Insomnia in central neurologic diseases--occurrence and management. *Sleep Med Rev.* 15, 369-78.
- Maywood, E. S., et al., 2006. Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Curr Biol.* 16, 599-605.
- McClung, C. A., 2007. Circadian rhythms, the mesolimbic dopaminergic circuit, and drug addiction. *ScientificWorldJournal.* 7, 194-202.
- McCormack, A. L., et al., 2002. Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: Selective Degeneration of Nigral Dopaminergic Neurons Caused by the Herbicide Paraquat. *Neurobiology of Disease.* 10, 119-127.
- Meco, G., et al., 1994. Parkinsonism after chronic exposure to the fungicide maneb (manganese ethylene-bis-dithiocarbamate). *Scand J Work Environ Health.* 20, 301-5.
- Meijer, J. H., et al., 1986. Luminance coding in a circadian pacemaker: the suprachiasmatic nucleus of the rat and the hamster. *Brain Res.* 382, 109-18.
- Meijer, J. H., Rietveld, W. J., 1989. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev.* 69, 671-707.
- Meijer, J. H., et al., 1996. Circadian rhythm in light response in suprachiasmatic nucleus neurons of freely moving rats. *Brain Res.* 741, 352-5.
- Meyer-Bernstein, E. L., Morin, L. P., 1996. Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J Neurosci.* 16, 2097-111.
- Michel, S., et al., 2006. Regulation of glutamatergic signalling by PACAP in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *BMC Neurosci.* 7, 15.
- Middleton, F. A., Strick, P. L., 2000. Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res Brain Res Rev.* 31, 236-50.
- Mikkelsen, J. D., Larsen, P. J., 1993. Substance P in the suprachiasmatic nucleus of the rat: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Histochemistry.* 100, 3-16.
- Mikkelsen, J. D., et al., 1991. Gastrin releasing peptide in the rat suprachiasmatic nucleus: an immunohistochemical, chromatographic and radioimmunological study. *Neuroscience.* 40, 55-66.
- Miller, G. W., 2007. Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research. *Toxicol Sci.* 100, 1-2.
- Miller, J. D., Fuller, C. A., 1990. The response of suprachiasmatic neurons of the rat hypothalamus to photic and serotonergic stimulation. *Brain Res.* 515, 155-62.
- Miller, J. D., Fuller, C. A., 1992. Isoperiodic neuronal activity in suprachiasmatic nucleus of the rat. *Am J Physiol.* 263, R51-8.
- Miller, J. D., et al., 1987. The response of suprachiasmatic neurons of the rat hypothalamus to photic and nicotinic stimuli. *J Neurosci.* 7, 978-86.
- Miller, J. J., et al., 1975. Anatomical and electrophysiological identification of a projection from the mesencephalic raphe to the caudate-putamen in the rat. *Brain Res.* 97, 133-6.

- Mintz, E. M., et al., 1999. Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *J Neurosci.* 19, 5124-30.
- Missale, C., et al., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 78, 189-225.
- Mistlberger, R. E., et al., 1998. Serotonin and feedback effects of behavioral activity on circadian rhythms in mice. *Behav Brain Res.* 96, 93-9.
- Moga, M. M., Moore, R. Y., 1997. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 389, 508-34.
- Moore, R. Y., 1996. Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Prog Brain Res.* 111, 103-19.
- Moore, R. Y., Card, J. P., 1994. Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol.* 344, 403-30.
- Moore, R. Y., Eichler, V. B., 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42, 201-6.
- Moore, R. Y., et al., 1978. Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *J Comp Neurol.* 180, 417-38.
- Moore, R. Y., Lenn, N. J., 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol.* 146, 1-14.
- Moore, R. Y., Silver, R., 1998. Suprachiasmatic nucleus organization. *Chronobiol Int.* 15, 475-87.
- Moore, R. Y., Speh, J. C., 1993. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett.* 150, 112-6.
- Moore, R. Y., et al., 1995. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol.* 352, 351-66.
- Moore, R. Y., et al., 2002. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.* 309, 89-98.
- Morato, G. S., et al., 1989. Acute exposure to maneb alters some behavioral functions in the mouse. *Neurotoxicol Teratol.* 11, 421-5.
- Mori, S., et al., 1985. Immunohistochemical demonstration of serotonin nerve fibers in the subthalamic nucleus of the rat, cat and monkey. *Neurosci Lett.* 62, 305-9.
- Morin, L. P., 1994. The circadian visual system. *Brain Res Brain Res Rev.* 19, 102-27.
- Morin, L. P., 1999. Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med.* 31, 12-33.
- Morin, L. P., 2013. Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Exp Neurol.* 243, 4-20.
- Morin, L. P., Allen, C. N., 2006. The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev.* 51, 1-60.
- Morin, L. P., Blanchard, J. H., 1998. Interconnections among nuclei of the subcortical visual shell: the intergeniculate leaflet is a major constituent of the hamster subcortical visual system. *J Comp Neurol.* 396, 288-309.
- Morin, L. P., Blanchard, J. H., 1999. Forebrain connections of the hamster intergeniculate leaflet: comparison with those of ventral lateral geniculate nucleus and retina. *Vis Neurosci.* 16, 1037-54.
- Morin, L. P., Blanchard, J. H., 2001. Neuromodulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *J Comp Neurol.* 437, 79-90.
- Morin, L. P., Blanchard, J. H., 2005. Descending projections of the hamster intergeniculate leaflet: relationship to the sleep/arousal and visuomotor systems. *J Comp Neurol.* 487, 204-16.
- Morin, L. P., et al., 1994. Projections of the suprachiasmatic nuclei, subparaventricular zone and retrochiasmatic area in the golden hamster. *Neuroscience.* 61, 391-410.
- Morin, L. P., et al., 2006. Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.* 137, 1285-97.
- Moyer, R. W., Kennaway, D. J., 1999. Immunohistochemical localization of serotonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett.* 271, 147-50.
- Nakamura, W., et al., 2001. Regional pacemakers composed of multiple oscillator neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci.* 14, 666-74.
- Nakamura, W., et al., 2005. Differential response of Period 1 expression within the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci.* 25, 5481-7.

- Nandhagopal, R., et al., 2009. Longitudinal progression of sporadic Parkinson's disease: a multi-tracer positron emission tomography study. *Brain*. 132, 2970-9.
- Narabayashi, H., et al., 1991. [Analysis of L-threo-3, 4-dihydroxyphenylserine effect on motor and psychological symptoms in Parkinson's disease]. *No To Shinkei*. 43, 263-8.
- Nausieda, P. A., et al., 1982. Sleep disruption in the course of chronic levodopa therapy: an early feature of the levodopa psychosis. *Clin Neuropharmacol*. 5, 183-94.
- Nguyen-Legros, J., 1988. Functional neuroarchitecture of the retina: hypothesis on the dysfunction of retinal dopaminergic circuitry in Parkinson's disease. *Surg Radiol Anat*. 10, 137-44.
- Ni, Z., et al., 2000. Changes in the firing pattern of globus pallidus neurons after the degeneration of nigrostriatal pathway are mediated by the subthalamic nucleus in the rat. *Eur J Neurosci*. 12, 4338-44.
- Ni, Z., et al., 2001a. Intrasubthalamic injection of 6-hydroxydopamine induces changes in the firing rate and pattern of subthalamic nucleus neurons in the rat. *Synapse*. 40, 145-53.
- Ni, Z., et al., 2001b. Effect of microiontophoretic application of dopamine on subthalamic nucleus neuronal activity in normal rats and in rats with unilateral lesion of the nigrostriatal pathway. *Eur J Neurosci*. 14, 373-81.
- Nicholson, S. L., Brotchie, J. M., 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.
- Nicklas, W. J., et al., 1987. MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci*. 40, 721-9.
- Nishino, H., et al., 1976. The role of suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus in the production of circadian rhythm. *Brain Res*. 112, 45-59.
- Nishino, H., Koizumi, K., 1977. Responses of neurons in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus to putative transmitters. *Brain Res*. 120, 167-72.
- Ohama, E., Ikuta, F., 1976. Parkinson's disease: distribution of Lewy bodies and monoamine neuron system. *Acta Neuropathol*. 34, 311-9.
- Oliver, K. R., et al., 2000. Localization of 5-HT(5A) receptor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res*. 867, 131-42.
- Ossowska, K., et al., 2005. A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: an animal model of preclinical stages of Parkinson's disease? *Eur J Neurosci*. 22, 1294-304.
- Paille, V., et al., 2010. Distinct levels of dopamine denervation differentially alter striatal synaptic plasticity and NMDA receptor subunit composition. *J Neurosci*. 30, 14182-93.
- Panda, S., et al., 2002. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science*. 298, 2213-6.
- Papiris, S. A., et al., 1995. Pulmonary damage due to paraquat poisoning through skin absorption. *Respiration*. 62, 101-3.
- Papp, M., Bal, A., 1987. Separation of the motivational and motor consequences of 6-hydroxydopamine lesions of the mesolimbic or nigrostriatal system in rats. *Behav Brain Res*. 23, 221-9.
- Parent, A., et al., 1995. Single striatofugal axons arborizing in both pallidal segments and in the substantia nigra in primates. *Brain Res*. 698, 280-4.
- Parent, A., et al., 1981. Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [³H]5-hydroxytryptamine. *Neuroscience*. 6, 115-38.
- Parent, A., Hazrati, L. N., 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, L. N., 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, 128-54.
- Parkinson, J., 1817. An essay on the shaking palsy. 1817. monograph by Sherwood, Neely, and Jones (London, 1817).

- Parkkinen, L., et al., 2008. Applicability of current staging/categorization of alpha-synuclein pathology and their clinical relevance. *Acta Neuropathol.* 115, 399-407.
- Paschos, G. K., 2015. Circadian clocks, feeding time, and metabolic homeostasis. *Front Pharmacol.* 6, 112.
- Pasik, T., Pasik, P., 1982. Serotonergic afferents in the monkey neostriatum. *Acta Biol Acad Sci Hung.* 33, 277-88.
- Paulus, W., Jellinger, K., 1991. The neuropathologic basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 50, 743-55.
- Pennartz, C. M., et al., 1997. Cellular mechanisms underlying spontaneous firing in rat suprachiasmatic nucleus: involvement of a slowly inactivating component of sodium current. *J Neurophysiol.* 78, 1811-25.
- Perez-Lloret, S., et al., 2010. Activity-rest rhythm abnormalities in Parkinson's disease patients are related to dopaminergic therapy. *Int J Neurosci.* 120, 11-6.
- Perreau-Lenz, S., et al., 2003. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci.* 17, 221-8.
- Pickard, G. E., 1985. Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neurosci Lett.* 55, 211-7.
- Pickard, G. E., Rea, M. A., 1997. Serotonergic innervation of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and photic regulation of circadian rhythms. *Biol Cell.* 89, 513-23.
- Pickard, G. E., et al., 1999. 5-HT_{1B} receptor-mediated presynaptic inhibition of retinal input to the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci.* 19, 4034-45.
- Pittendrigh, C. S., 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 25, 159-84.
- Pittendrigh, C. S., 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol.* 55, 16-54.
- Pitts, G. R., et al., 2001. Cycles of transcription and translation do not comprise the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in GT1 cells. *Endocrinology.* 142, 1858-64.
- Plenz, D., Kital, S. T., 1999. A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Nature.* 400, 677-82.
- Poceta, J. S., et al., 2009. Circadian rhythm of CSF monoamines and hypocretin-1 in restless legs syndrome and Parkinson's disease. *Sleep Med.* 10, 129-33.
- Pontone, G. M., et al., 2013. Screening for DSM-IV-TR cognitive disorder NOS in Parkinson's disease using the Mattis Dementia Rating Scale. *Int J Geriatr Psychiatry.* 28, 364-71.
- Porsolt, R. D., et al., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 47, 379-91.
- Porter, C. C., et al., 1965. The relationship between radioactivity and norepinephrine concentrations in the brains and hearts of mice following administration of labeled methyl dopa or 6-hydroxydopamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 150, 17-22.
- Porter, C. C., et al., 1963. Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 140, 308-16.
- Postuma, R. B., et al., 2012. Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 27, 617-26.
- Poulain, D. A., Wakerley, J. B., 1982. Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience.* 7, 773-808.
- Prosser, R. A., et al., 1993. Serotonin and the mammalian circadian system: I. In vitro phase shifts by serotonergic agonists and antagonists. *J Biol Rhythms.* 8, 1-16.
- Prosser, R. A., et al., 1990. A serotonin agonist phase-shifts the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res.* 534, 336-9.
- Provencio, I., et al., 1998. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 340-5.

- Przedborski, S., et al., 1995. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*. 67, 631-47.
- Pursiainen, V., et al., 2002. Circadian heart rate variability in Parkinson's disease. *J Neurol*. 249, 1535-40.
- Quintero, J. E., McMahon, D. G., 1999. Serotonin modulates glutamate responses in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurophysiol*. 82, 533-9.
- Ragab, M. M., Mohammed, E. S., 2011. Idiopathic Parkinson's disease patients at the urologic clinic. *Neurourol Urodyn*. 30, 1258-61.
- Raisman, R., et al., 1986. Parkinson's disease: decreased density of 3H-imipramine and 3H-paroxetine binding sites in putamen. *Neurology*. 36, 556-60.
- Ralph, M. R., et al., 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 247, 975-8.
- Rangel-Barajas, C., et al., 2015. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging Dis*. 6, 349-68.
- Raz, A., et al., 1996. Neuronal synchronization of tonically active neurons in the striatum of normal and parkinsonian primates. *J Neurophysiol*. 76, 2083-8.
- Rea, M. A., et al., 1994. Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci*. 14, 3635-42.
- Reid, K. J., Zee, P. C., 2009. Circadian rhythm disorders. *Semin Neurol*. 29, 393-405.
- Remy, P., et al., 2005. Depression in Parkinson's disease: loss of dopamine and noradrenaline innervation in the limbic system. *Brain*. 128, 1314-22.
- Reppert, S. M., et al., 1981. Vasopressin exhibits a rhythmic daily pattern in cerebrospinal fluid but not in blood. *Science*. 213, 1256-7.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 418, 935-41.
- Riachi, N. J., et al., 1989. Entry of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine into the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 249, 744-8.
- Ritz, B. R., et al., 2009. Dopamine transporter genetic variants and pesticides in Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*. 117, 964-9.
- Rojo, A. I., et al., 2007. Chronic inhalation of rotenone or paraquat does not induce Parkinson's disease symptoms in mice or rats. *Exp Neurol*. 208, 120-6.
- Rossoni, E., et al., 2008. Emergent synchronous bursting of oxytocin neuronal network. *PLoS Comput Biol*. 4, e1000123.
- Roybal, K., et al., 2007. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 6406-11.
- Rozas, G., et al., 1997. An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2, 75-84.
- Ruan, G. X., et al., 2008. An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biol*. 6, e249.
- Rye, D. B., 2004. The two faces of Eve: dopamine's modulation of wakefulness and sleep. *Neurology*. 63, S2-7.
- Saavedra, J. M., 1977. Distribution of serotonin and synthesizing enzymes in discrete areas of the brain. *Fed Proc*. 36, 2134-41.
- Sabatier, N., et al., 2004. Phasic spike patterning in rat supraoptic neurones in vivo and in vitro. *J Physiol*. 558, 161-80.
- Sabbar, M., et al., 2012. Lead intoxication induces noradrenaline depletion, motor nonmotor disabilities, and changes in the firing pattern of subthalamic nucleus neurons. *Neuroscience*. 210, 375-83.
- Saeb-Parsy, K., Dyball, R. E., 2003a. Defined cell groups in the rat suprachiasmatic nucleus have different day/night rhythms of single-unit activity in vivo. *J Biol Rhythms*. 18, 26-42.
- Saeb-Parsy, K., Dyball, R. E., 2003b. Responses of cells in the rat suprachiasmatic nucleus in vivo to stimulation of afferent pathways are different at different times of the light/dark cycle. *J Neuroendocrinol*. 15, 895-903.

- Saint-Pierre, M., et al., 2006. Temporal effects of paraquat/maneb on microglial activation and dopamine neuronal loss in older rats. *J Neurochem.* 98, 760-72.
- Sakai, K., 2014. Single unit activity of the suprachiasmatic nucleus and surrounding neurons during the wake-sleep cycle in mice. *Neuroscience.* 260, 249-64.
- Sakamoto, K., et al., 2005. Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci.* 22, 3129-36.
- Sakanaka, M., et al., 1990. Co-localization of arginine vasopressin- and enkephalin-like immunoreactivities in nerve cells of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 260, 549-54.
- Saner, A., Thoenen, H., 1971. Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Mol Pharmacol.* 7, 147-54.
- Sangoram, A. M., et al., 1998. Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron.* 21, 1101-13.
- Saper, C. B., et al., 1991. Medullary catecholaminergic neurons in the normal human brain and in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 29, 577-84.
- Sarre, S., et al., 2004. In vivo characterization of somatodendritic dopamine release in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurochem.* 90, 29-39.
- Sato, T., Kawamura, H., 1984. Circadian rhythms in multiple unit activity inside and outside the suprachiasmatic nucleus in the diurnal chipmunk (*Eutamias sibiricus*). *Neurosci Res.* 1, 45-52.
- Sato, T. K., et al., 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron.* 43, 527-37.
- Satomi, Y., et al., 2004. Gene expression analysis of the lung following paraquat administration in rats using DNA microarray. *J Toxicol Sci.* 29, 91-100.
- Sauer, H., Oertel, W. H., 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience.* 59, 401-15.
- Sawaguchi, T., The Role of Dopamine in Frontal Motor Cortical Functions of Monkeys. In: M. Kimura, A. Graybiel, (Eds.), *Functions of the Cortico-Basal Ganglia Loop*. Springer Japan, 1995, pp. 166-188.
- Sawaki, Y., 1977. Retinohypothalamic projection: electrophysiological evidence for the existence in female rats. *Brain Res.* 120, 336-41.
- Scatton, B., et al., 1983. Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res.* 275, 321-8.
- Schaap, J., Meijer, J. H., 2001. Opposing effects of behavioural activity and light on neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci.* 13, 1955-62.
- Schafer, D., Greulich, W., 2000. Effects of parkinsonian medication on sleep. *J Neurol.* 247 Suppl 4, Iv/24-7.
- Schmidt, C., et al., 2009. Loss of nocturnal blood pressure fall in various extrapyramidal syndromes. *Mov Disord.* 24, 2136-42.
- Schrag, A., et al., 2000. What contributes to quality of life in patients with Parkinson's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 69, 308-12.
- Schrag, A., et al., 2015. New clinical trials for nonmotor manifestations of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 30, 1490-504.
- Schulte, E. C., Winkelmann, J., 2011. When Parkinson's disease patients go to sleep: specific sleep disturbances related to Parkinson's disease. *J Neurol.* 258, S328-35.
- Schwartz, W. J., Gainer, H., 1977. Suprachiasmatic nucleus: use of ¹⁴C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science.* 197, 1089-91.
- Schwartz, W. J., et al., 1987. The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 1694-8.
- Seguela, P., et al., 1989. Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. *J Comp Neurol.* 289, 129-42.

- Senba, E., et al., 1993. Stress-induced c-fos expression in the rat brain: activation mechanism of sympathetic pathway. *Brain Res Bull.* 31, 329-44.
- Senoh, S., et al., 1959. Chemical, Enzymatic and Metabolic Studies on the Mechanism of Oxidation of Dopamine¹. *Journal of the American Chemical Society.* 81, 6236-6240.
- Senoh, S., Witkop, B., 1959. Non-enzymatic Conversions of Dopamine to Norepinephrine and Trihydroxyphenethylamines¹. *Journal of the American Chemical Society.* 81, 6222-6231.
- Shen, H., Semba, K., 1994. A direct retinal projection to the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res.* 635, 159-68.
- Shen, K. Z., Johnson, S. W., 2000. Presynaptic dopamine D2 and muscarine M3 receptors inhibit excitatory and inhibitory transmission to rat subthalamic neurones in vitro. *J Physiol.* 525 Pt 2, 331-41.
- Shen, K. Z., Johnson, S. W., 2005. Dopamine depletion alters responses to glutamate and GABA in the rat subthalamic nucleus. *Neuroreport.* 16, 171-4.
- Shibata, S., et al., 1983. Effect of amino acids and monoamines on the neuronal activity of suprachiasmatic nucleus in hypothalamic slice preparations. *Jpn J Pharmacol.* 33, 1225-31.
- Shibata, S., Moore, R. Y., 1988. Electrical and metabolic activity of suprachiasmatic nucleus neurons in hamster hypothalamic slices. *Brain Res.* 438, 374-8.
- Shibata, S., et al., 1982. Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res.* 247, 154-8.
- Shibata, S., et al., 1984. The role of calcium ions in circadian rhythm of suprachiasmatic nucleus neuron activity in rat hypothalamic slices. *Neurosci Lett.* 52, 181-4.
- Shibata, S., et al., 1992. Phase-resetting effect of 8-OH-DPAT, a serotonin_{1A} receptor agonist, on the circadian rhythm of firing rate in the rat suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res.* 582, 353-6.
- Shih, J. C., Chen, K., 2004. Regulation of MAO-A and MAO-B gene expression. *Curr Med Chem.* 11, 1995-2005.
- Shimizu, K., et al., 2001. Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res.* 906, 135-42.
- Shinohara, K., et al., 1998. Circadian release of amino acids in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neuroreport.* 9, 137-40.
- Shinohara, K., et al., 1993. Photic regulation of peptides located in the ventrolateral subdivision of the suprachiasmatic nucleus of the rat: daily variations of vasoactive intestinal polypeptide, gastrin-releasing peptide, and neuropeptide Y. *J Neurosci.* 13, 793-800.
- Shulman, L. M., et al., 2001. Comorbidity of the nonmotor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 16, 507-10.
- Siderowf, A., Lang, A. E., 2012. Premotor Parkinson's disease: concepts and definitions. *Mov Disord.* 27, 608-16.
- Silverman, A. J., Zimmerman, E. A., 1983. Magnocellular neurosecretory system. *Annu Rev Neurosci.* 6, 357-80.
- Sim, C. K., Forger, D. B., 2007. Modeling the electrophysiology of suprachiasmatic nucleus neurons. *J Biol Rhythms.* 22, 445-53.
- Sims, K. B., et al., 1980. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res.* 186, 165-83.
- Singewald, N., Philippu, A., 1998. Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Prog Neurobiol.* 56, 237-67.
- Sleipness, E. P., et al., 2007a. Diurnal differences in dopamine transporter and tyrosine hydroxylase levels in rat brain: dependence on the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 1129, 34-42.
- Sleipness, E. P., et al., 2007b. Contribution of the suprachiasmatic nucleus to day:night variation in cocaine-seeking behavior. *Physiol Behav.* 91, 523-30.
- Smale, L., et al., 1990. Destruction of the hamster serotonergic system by 5,7-DHT: effects on circadian rhythm phase, entrainment and response to triazolam. *Brain Res.* 515, 9-19.

- Smeets, W. J., Gonzalez, A., 2000. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Brain Res Rev.* 33, 308-79.
- Smith, B. N., et al., 2001. Serotonergic modulation of retinal input to the mouse suprachiasmatic nucleus mediated by 5-HT_{1B} and 5-HT₇ receptors. *J Biol Rhythms.* 16, 25-38.
- Smith, Y., et al., 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience.* 86, 353-87.
- Snyder, S. H., D'Amato, R. J., 1985. Predicting Parkinson's disease. *Nature.* 317, 198-9.
- Soares, J., et al., 2004. Role of external pallidal segment in primate parkinsonism: comparison of the effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism and lesions of the external pallidal segment. *J Neurosci.* 24, 6417-26.
- Somayajulu-Nitu, M., et al., 2009. Paraquat induces oxidative stress, neuronal loss in substantia nigra region and parkinsonism in adult rats: neuroprotection and amelioration of symptoms by water-soluble formulation of coenzyme Q10. *BMC Neurosci.* 10, 88.
- Sonsalla, P. K., Heikkila, R. E., 1988. Neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and methamphetamine in several strains of mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 12, 345-54.
- Sprouse, J., et al., 2004a. Serotonin-induced phase advances of SCN neuronal firing in vitro: a possible role for 5-HT_{5A} receptors? *Synapse.* 54, 111-8.
- Sprouse, J., et al., 2004b. 8-OH-DPAT as a 5-HT₇ agonist: phase shifts of the circadian biological clock through increases in cAMP production. *Neuropharmacology.* 46, 52-62.
- Steinbusch, H. W., et al., 1980. Serotonergic and non-serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the caudate-putamen complex in the rat, studied by a combined immunofluorescence and fluorescent retrograde axonal labeling technique. *Neurosci Lett.* 19, 137-42.
- Stelmashook, E. V., et al., 2014. Role of zinc and copper ions in the pathogenetic mechanisms of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Biochemistry (Mosc).* 79, 391-6.
- Stephan, F. K., Zucker, I., 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69, 1583-6.
- Stern, M., et al., 1968. The parkinsonian tremor in sleep. *J Nerv Ment Dis.* 147, 202-10.
- Stratford, T. R., Wirtshafter, D., 1990. Ascending dopaminergic projections from the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res.* 511, 173-6.
- Sujino, M., et al., 2003. Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr Biol.* 13, 664-8.
- Sun, Z. S., et al., 1997. RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell.* 90, 1003-11.
- Suter, K. J., et al., 2000. Whole-cell recordings from preoptic/hypothalamic slices reveal burst firing in gonadotropin-releasing hormone neurons identified with green fluorescent protein in transgenic mice. *Endocrinology.* 141, 3731-6.
- Swaab, D. F., et al., 1975. Immunofluorescence of vasopressin and oxytocin in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *J Neural Transm.* 36, 195-215.
- Tadaiesky, M. T., et al., 2008. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 156, 830-40.
- Takahashi, R. N., et al., 1989. Maneb enhances MPTP neurotoxicity in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 66, 167-70.
- Tamada, Y., et al., 1998. Neuron-glia interaction in the suprachiasmatic nucleus: a double labeling light and electron microscopic immunocytochemical study in the rat. *Brain Res Bull.* 45, 281-7.
- Tanaka, M., et al., 1993. The direct retinal projection to VIP neuronal elements in the rat SCN. *Brain Res Bull.* 31, 637-40.
- Tanner, C. M., 1989. The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 12, 49-54.

- Tanner, C. M., et al., 2011. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect.* 119, 866-72.
- Taquet, H., et al., 1982. Microtopography of methionine-enkephalin, dopamine and noradrenaline in the ventral mesencephalon of human control and Parkinsonian brains. *Brain Res.* 235, 303-14.
- Tei, H., et al., 1997. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature.* 389, 512-6.
- Thiruchelvam, M., et al., 2000b. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res.* 873, 225-34.
- Thiruchelvam, M., et al., 2003. Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. *Eur J Neurosci.* 18, 589-600.
- Thiruchelvam, M., et al., 2000a. The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci.* 20, 9207-14.
- Thiruchelvam, M., et al., 2002. Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype. *Neurotoxicology.* 23, 621-33.
- Thomson, A. M., et al., 1984. Regular firing patterns of suprachiasmatic neurons maintained in vitro. *Neurosci Lett.* 52, 329-34.
- Tieu, K., 2011. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1, a009316.
- Tinakoua, A., et al., 2015. The impact of combined administration of Paraquat and Maneb on motor and non-motor functions in the rat. *Neuroscience.*
- Tofighy, A., et al., 2003. Excitation by dopamine of rat subthalamic nucleus neurones in vitro—a direct action with unconventional pharmacology. *Neuroscience.* 116, 157-66.
- Trétiakoff, M. C., 1919. Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. PhD thesis, University of Paris; .
- Tritsch, N. X., Sabatini, B. L., 2012. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron.* 76, 33-50.
- Trudel, E., Bourque, C. W., 2010. Central clock excites vasopressin neurons by waking osmosensory afferents during late sleep. *Nat Neurosci.* 13, 467-74.
- Tsujino, N., Sakurai, T., 2009. Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev.* 61, 162-76.
- Twarog, B. M., Page, I. H., 1953. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol.* 175, 157-61.
- Uhl, G. R., Reppert, S. M., 1986. Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: circadian variation in normal and Brattleboro rats. *Science.* 232, 390-3.
- Ungerstedt, U., 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 5, 107-10.
- Ungerstedt, U., Arbuthnott, G. W., 1970. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 24, 485-93.
- Van den Pol, A. N., 1980. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol.* 191, 661-702.
- van den Pol, A. N., et al., 1996. Neuropeptide Y-mediated long-term depression of excitatory activity in suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci.* 16, 5883-95.
- van den Pol, A. N., Tsujimoto, K. L., 1985. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience.* 15, 1049-86.

- van der Gugten, J., et al., 1977. Regional hypothalamic catecholamine metabolism and food intake regulation in the rat. *Brain Res.* 135, 325-36.
- van der Kooy, D., Hattori, T., 1980. Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: a fluorescent retrograde double labeling study in the rat. *Brain Res.* 186, 1-7.
- van der Zee, E. A., et al., 1991. Colocalization of muscarinic and nicotinic receptors in cholinergic neurons of the suprachiasmatic region in young and aged rats. *Brain Res.* 542, 348-52.
- van Esseveldt, K. E., et al., 2000. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res Brain Res Rev.* 33, 34-77.
- van Hilten, J. J., et al., 1993. Sleep, excessive daytime sleepiness and fatigue in Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 5, 235-44.
- Vezoli, J., et al., 2011. Early presymptomatic and long-term changes of rest activity cycles and cognitive behavior in a MPTP-monkey model of Parkinson's disease. *PLoS One.* 6, e23952.
- Vicq D'Azyr F 1786. *Traite d' Anatomie et de Physiologie. Anatomie et Physiologie du Cerveau.* Paris: Paris. Tome Premier.
- Vila, M., et al., 2000. Evolution of changes in neuronal activity in the subthalamic nucleus of rats with unilateral lesion of the substantia nigra assessed by metabolic and electrophysiological measurements. *Eur J Neurosci.* 12, 337-44.
- Villalba, R. M., et al., 2009. Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. *Exp Neurol.* 215, 220-7.
- Viswanathan, N., et al., 1994. Entrainment of the fetal hamster circadian pacemaker by prenatal injections of the dopamine agonist SKF 38393. *J Neurosci.* 14, 5393-8.
- Wagner, S., et al., 1997. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature.* 387, 598-603.
- Wagner, S., et al., 2001. GABA-induced current and circadian regulation of chloride in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *J Physiol.* 537, 853-69.
- Wailke, S., et al., 2011. Effect of controlled-release levodopa on the microstructure of sleep in Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 18, 590-6.
- Walf, A. A., Frye, C. A., 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2, 322-8.
- Walsh, I. B., et al., 1992. Spontaneous and stimulated firing in cultured rat suprachiasmatic neurons. *Brain Res.* 588, 120-31.
- Watts, A. G., Swanson, L. W., 1987. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J Comp Neurol.* 258, 230-52.
- Weaver, D. R., et al., 1992. D1-dopamine receptors activate c-fos expression in the fetal suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 9201-4.
- Weinberger, M., et al., 2006. Beta oscillatory activity in the subthalamic nucleus and its relation to dopaminergic response in Parkinson's disease. *J Neurophysiol.* 96, 3248-56.
- Weisskopf, M. G., et al., 2010. Association of cumulative lead exposure with Parkinson's disease. *Environ Health Perspect.* 118, 1609-13.
- Welsh, D. K., et al., 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron.* 14, 697-706.
- Whitaker-Azmitia, P. M., 1999. The Discovery of Serotonin and its Role in Neuroscience. *Neuropsychopharmacology.* 21, 2S-8S.
- Wichmann, T., Soares, J., 2006. Neuronal firing before and after burst discharges in the monkey basal ganglia is predictably patterned in the normal state and altered in parkinsonism. *J Neurophysiol.* 95, 2120-33.
- Williams-Gray, C. H., et al., 2007. Evolution of cognitive dysfunction in an incident Parkinson's disease cohort. *Brain.* 130, 1787-98.

- Willison, L. D., et al., 2013. Circadian dysfunction may be a key component of the non-motor symptoms of Parkinson's disease: insights from a transgenic mouse model. *Exp Neurol.* 243, 57-66.
- Wilson, J. M., et al., 1996. Differential changes in neurochemical markers of striatal dopamine nerve terminals in idiopathic Parkinson's disease. *Neurology.* 47, 718-26.
- Wise, R. A., 2004. Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci.* 5, 483-494.
- Witkovsky, P., 2004. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol.* 108, 17-40.
- Wolters, E., Braak, H., 2006. Parkinson's disease: premotor clinico-pathological correlations. *J Neural Transm Suppl.* 309-19.
- Wulff, K., et al., 2010. Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci.* 11, 589-99.
- Wullner, U., et al., 1994. Dopamine terminal loss and onset of motor symptoms in MPTP-treated monkeys: a positron emission tomography study with ¹¹C-CFT. *Exp Neurol.* 126, 305-9.
- Xiangdong, J., et al., 2011. Role of growth factors in acute lung injury induced by paraquat in a rat model. *Hum Exp Toxicol.* 30, 460-9.
- Yamazaki, S., et al., 1998. Rhythmic properties of the hamster suprachiasmatic nucleus in vivo. *J Neurosci.* 18, 10709-23.
- Yan, L., Okamura, H., 2002. Gradients in the circadian expression of *Per1* and *Per2* genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci.* 15, 1153-62.
- Yang, G., et al., 2012. Systemic PPAR γ deletion impairs circadian rhythms of behavior and metabolism. *PLoS One.* 7, e38117.
- Yeo, L., et al., 2012. Urinary tract dysfunction in Parkinson's disease: a review. *Int Urol Nephrol.* 44, 415-24.
- Yin, H. H., Knowlton, B. J., 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci.* 7, 464-76.
- Ying, S. W., Rusak, B., 1994. Effects of serotonergic agonists on firing rates of photically responsive cells in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 651, 37-46.
- Ying, S. W., Rusak, B., 1997. 5-HT₇ receptors mediate serotonergic effects on light-sensitive suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res.* 755, 246-54.
- Yong, M. H., et al., 2011. Case control polysomnographic studies of sleep disorders in Parkinson's disease. *PLoS One.* 6, e22511.
- Zaja-Milatovic, S., et al., 2005. Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson disease. *Neurology.* 64, 545-7.
- Zeitler, J. M., 2013. Control of sleep and wakefulness in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 119, 137-54.
- Zhang, J., et al., 2003. Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction. *J Neurochem.* 84, 336-46.
- Zhang, L., et al., 1995. Rhythmic firing patterns in suprachiasmatic nucleus (SCN): the role of circuit interactions. *Int J Biomed Comput.* 38, 23-31.
- Zhang, Q. J., et al., 2007. Changes in the firing activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus in a rat model of Parkinson's disease. *Sheng Li Xue Bao.* 59, 183-9.
- Zhu, Z., et al., 2002. Excitatory effects of dopamine on subthalamic nucleus neurons: in vitro study of rats pretreated with 6-hydroxydopamine and levodopa. *Brain Res.* 945, 31-40.

ANNEXE:

The impact of combined administration of Paraquat and Maneb on motor and non-motor functions in the rat.

Titre de l'article : The impact of combined administration of paraquat and maneb on motor and non-motor functions in the rat.

Auteurs et affiliations :

Tinakoua A¹, Bouabid S¹, Faggiani E², De Deurwaerdère P², Lakhdar-Ghazal N³, Benazzouz A⁴.

¹Univ. de Bordeaux, Institut des maladies neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France; CNRS, Institut des maladies neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France; Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Equipe Rythmes Biologiques, Neurosciences et Environnement, Rabat, Morocco.

²Univ. de Bordeaux, Institut des maladies neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France; CNRS, Institut des maladies neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France.

³Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Equipe Rythmes Biologiques, Neurosciences et Environnement, Rabat, Morocco.

⁴Univ. de Bordeaux, Institut des maladies neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France; CNRS, Institut des maladies neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France. Electronic address: abdelhamid.benazzouz@u-bordeaux.fr.

Publié sur Neuroscience, 311:118-129. **doi:**10.1016/j.neuroscience.2015.10.021.

THE IMPACT OF COMBINED ADMINISTRATION OF PARAQUAT AND MANEB ON MOTOR AND NON-MOTOR FUNCTIONS IN THE RAT

A. TINAKOUA,^{a,b,c} S. BOUABID,^{a,b,c} E. FAGGIANI,^{a,b}
P. DE DEURWAERDÈRE,^{a,b} N. LAKHDAR-GHAZAL^c AND
A. BENAZZOUZ^{a,b*}

^a Univ. de Bordeaux, Institut des maladies neurodégénératives,
UMR 5293, Bordeaux, France

^b CNRS, Institut des maladies neurodégénératives, UMR
5293, Bordeaux, France

^c Université Mohammed V, Faculté des Sciences, Equipe
Rythmes Biologiques, Neurosciences et Environnement,
Rabat, Morocco

Abstract—Paraquat (PQ) and maneb (MB) are potential risk factors for Parkinson's disease. However, their impact on non-motor disorders, monoamine neurotransmission and basal ganglia function is not clearly determined. Here we investigated the effects of combined treatment with PQ/MB on motor behavior, anxiety and "depressive-like" disorders, tissue content of monoamines, and subthalamic nucleus (STN) neuronal activity. Male Sprague–Dawley rats were intoxicated by PQ (10 mg/kg) and MB (30 mg/kg) twice a week. Two weeks later, the majority of animals (group 1, 16/26) showed a severe loss of body weight with tremor and respiratory distress and others (group 2, 6/26) showed only tremor. Animals of group 2 received PQ/MB during four weeks before developing weight loss. A last group (group 3, 4/26) was insensitive to PQ/MB after 6 weeks of injections. Groups 1 and 2 displayed a failure of motor activity and motor coordination. Group 3 showed slight motor deficits only after the last injection of PQ/MB. Moreover, PQ/MB induced anxiety and "depressive-like" behaviors in animals of groups 2 and 3. Biochemical analysis showed that PQ/MB reduced striatal dopamine (DA) tissue content paralleled by changes in the activity of STN neurons without changing the content of norepinephrine and serotonin in the cortex. Our data provide evidence that individuals are not equally sensitive to PQ/MB and show that the motor deficits in vulnerable animals, are not only a result of DA neuron degeneration, but may also be a consequence of peripheral disabilities. Nevertheless, the parkinsonian-like non-motor

impairments may be a direct consequence of the bilateral DA depletion. © 2015 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: paraquat, maneb, Parkinson's disease, dopamine, norepinephrine, serotonin.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a neurological disorder, characterized by motor symptoms, such as rigidity, resting tremor, postural instability and bradykinesia. Non-motor disabilities (depression, anxiety, cognitive impairment, sleep disorder...) are also a hallmark of the disease. The motor and non-motor symptoms are supposed to be a result of the degeneration of dopaminergic (DAergic) neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc) (Ehringer and Hornykiewicz, 1960) and also of other monoaminergic neurons, including noradrenergic (Bertrand et al., 1997) and serotonergic (Kish, 2003) systems. The cause of sporadic cases of PD is still unknown, but recent epidemiological and experimental studies suggest the implication of environmental factors. In fact, this notion of association between environmental factors and PD is born from early observations by Davis and Colleagues (1979) who reported chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in young people. MPTP is a meperidine analog, which does not exist in nature, but its molecular structure presents similarities with other industrially and naturally occurring substances (Langston et al., 1983). In addition to heavy metals, elevated exposure to manganese has been suggested as a high risk factor for the development of PD, by altering neurobiological systems and producing neurological deficits in patients (Guilarte, 2013) and animal models (Sabbar et al., 2012; Bouabid et al., 2014). Indeed, cumulative exposure to lead and/or manganese induced motor and non-motor impairments paralleled by changes in the electrical and metabolic activities of subthalamic nucleus (STN) neurons in the rat (Sabbar et al., 2012; Bouabid et al., 2014). These studies provide solid arguments for the involvement of environmental toxicant in the induction of atypical PD-like deficits. Furthermore, several epidemiological studies suggested a link between pesticides and PD (Tanner, 1989; Ascherio et al., 2006; Dick et al., 2007; Hatcher et al., 2008). Among pesticides, Paraquat (PQ) is one of the most widely used herbicide in the developing

*Correspondence to: A. Benazzouz, Institut des maladies neurodégénératives, CNRS UMR 5293, Université de Bordeaux, 146 Rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. Tel: +33-557-574-625. E-mail address: abdelhamid.benazzouz@u-bordeaux.fr (A. Benazzouz).

Abbreviations: 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; 5-HT, serotonin; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; ANOVA, analysis of variance; CV, coefficient of variation; DA, dopamine; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; EPM, elevated plus maze; HPLC, high performance liquid chromatography; MB, maneb; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; NE, norepinephrine; PD, Parkinson's disease; PQ, Paraquat; SNc, substantia nigra pars compacta; STN, subthalamic nucleus.

countries. PQ is a possible candidate risk factor for PD, as it bears structural similarities with MPP⁺, the active component of MPTP (Snyder and D'Amato, 1985). It has been suggested that PQ penetrates the blood–brain barrier (Shimizu et al., 2001) causing the loss of nigro-striatal DAergic cells, which results in the induction of motor deficits (McCormack et al., 2002; Thiruchelvam et al., 2003). In addition to PQ, the fungicide Maneb (MB) is known to reduce locomotor activity (Morato et al., 1989) and already experienced as an enhancer of MPTP (Takahashi et al., 1989) and PQ (Thiruchelvam et al., 2000b; Kachroo et al., 2010) neurotoxicity. The fact that both PQ and MB share the ability to alter the DAergic system and their use in geographically overlapping areas, encouraged by lack of models using environmental neurotoxins, prompted numerous research teams to use the PQ/MB combination as an animal model of PD (Dauer and Przedborski, 2003; Xu et al., 2011; Blesa et al., 2012; Campos et al., 2013b). However, the relevance of the model has not been studied in detail, taking into account all aspects of PD, including motor and non-motor symptoms, the changes in basal ganglia neuronal activity and the impact of peripheral disabilities.

The present study aimed to investigate the effects of combined treatment with PQ and MB on: (1) locomotor activity and motor coordination, (2) anxiety behavior, (3) “depression-like” behavior, (4) tissue contents of dopamine (DA) in the striatum and norepinephrine (NE) and serotonin (5-HT) in the frontal cortex, (5) and the neuronal activity of subthalamic nucleus, which is a basal ganglia structure playing a key role in the pathophysiology of PD.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and PQ/MB treatment

All animal experiments were carried out in accordance with European Communities Council Directive 2010/63/UE, and all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. The study received approval from the local Ethics Committee (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale Bordeaux, France).

Two-month-old male Sprague–Dawley rats ($n = 34$) weighing 280 g in the beginning of the experiments were used. Animals were obtained from the “Centre d'Élevage Dépré” (Centre d'Élevage Dépré, Saint Doulchard, France), and maintained in a room with constant temperature (24 °C) and humidity (45%), exposed to a 12-h light/12-h dark cycle (light on at 7:00 A.M.) with access to food and water *ad libitum*. Animals were initially divided into two groups as follows: (i) 26 treated animals received intra-peritoneal (i.p.) injections of a solution containing PQ (10 mg/kg) and MB (30 mg/kg), dissolved in saline (0.9% NaCl), twice a week for two, four or six weeks depending on their vulnerability to treatment. (ii) 8 control animals received saline (0.9% NaCl) in the same conditions. The doses used were chosen on the basis of previous published protocols (Thiruchelvam et al., 2000a; Cicchetti et al., 2005). The animal's weight was monitored twice a week. The general

health of the animals was daily observed throughout the duration of the experiment. The tremor has not been quantified but its presence or absence was determined by careful observations of video recordings.

Evaluation of locomotor behaviors (Open Field)

Spontaneous horizontal and vertical (rearing) activities as well as stereotyped movements (movements with low amplitudes and independent of locomotor activity) were measured using a photoelectric actimeter (Actitrack, Panlab, Barcelona, Spain), as previously described (Belujon et al., 2007; Chetrit et al., 2009). Briefly, the apparatus consisted of a transparent cage that was connected to a photoelectric cell. Light beams detected movements and the total motor activity of each rat was recorded. All recordings in the actimeter were done in an isolated room between 8:0 A.M. and 2:00 P.M. The protocol consisted of two phases: (i) Habituation: spontaneous motor activity was recorded during four consecutive days in two consecutive sessions of 10 min before the beginning of injections. (ii) The test was made each week after two injections of PQ/MB or saline and consisted of two consecutive sessions of 10 min. Only the second session of 10 min was retained for data analysis to evaluate the motor behavior of the animals. Statistical analyses were done using Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Evaluation of motor coordination (rotarod)

To assess the effect of PQ/MB treatment on motor coordination, rats were trained to remain on a rotarod (BIOSEB, *in vivo* Research Instruments, Spain), as previously described (Papp and Bal, 1987; Rozas et al., 1997). All rats underwent a 3-day training program on a 7-cm diameter rotarod. During the training period, each rat was placed on a horizontal rod rotating at a gradually increasing speed from 4 to 20 rotations per minute (rpm) for a maximum of 15 min by which time a steady baseline level of performance was attained. The day after training, the motor coordination was recorded for each animal during five trials. The latency to fall off the rotarod was recorded and the time limit was fixed to 3 min.

Evaluation of anhedonia (sucrose preference test)

The sucrose preference test was used as previously described (Delaville et al., 2012). Rats were housed in individual cages with food and water *ad libitum*. Three days before the experiment onset, rats were housed in the presence of two bottles of water and the position of the bottles was randomly changed to prevent a place preference. On the test day, when the light turns off at 7:00 P.M., pre-weighted water and 1% sucrose-containing bottles were placed on the home cage and rats were allowed to drink for 2 h. During these 2 h, the position of the bottles was changed four times. Water or sucrose absorption was measured by weighing the bottles before and after the test. Sucrose preference was calculated using the following formula as previously reported (Delaville et al., 2012):

$100 \times [\text{sucrose intake(g)} / (\text{sucrose intake(g)} + \text{water intake(g)})]$.

This test was made only for animals that survived for 4 and 6 weeks of PQ/MB treatment.

Evaluation of “depression-like” behavior (forced swim test)

The forced swim test was conducted as previously described (Borsini and Meli, 1988). Briefly, this test was held in two days; it consists of placing the rat on a transparent Plexiglas cylinder (height = 50 cm; diameter = 20 cm) filled with $25 \pm 2^\circ\text{C}$ temperature water. Depth was 30 cm to prevent the rat from reaching the cylinder bottom. Animals were filmed in order to enable off-line analysis. Off-line analysis was performed as previously reported (Detke et al., 1995). A rat was judged to be immobile when it remained floating in the water without struggling and was making only those movements necessary to keep its head above water. This test was made only for animals that survived for 4 and 6 weeks of PQ/MB treatment.

Evaluation of anxiety (elevated plus maze (EPM))

Animals were tested in the EPM to assess the anxiety-related behavior. Published procedures were used (Delaville et al., 2012). The EPM consisted of two open arms (50 cm long \times 10 cm wide) and two walled arms (50 cm long \times 10 cm wide \times 38.5 cm high) with an open roof, arranged around a central platform (10 cm \times 10 cm), with the two arms of each type placed opposite to each other. Animals were placed onto the central platform, facing one of the open arms. The animal was allowed to explore the maze for 5 min. The following variables were measured: time (s) spent in the open and closed arms and number of entries into the open and closed arms (an entry was counted when the animal entered an arm with all four paws). This test was made only for animals that survived for 4 and 6 weeks of PQ/MB treatment.

Biochemical assessment of monoamines

Tissue content of DA and its metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) were measured in the striatum and NE, 5-HT and its metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) were measured in the frontal cortex. The choice of these brain structures was based on their extensive monoaminergic innervations (De Deurwaerdere et al., 1995; Delaville et al., 2012). Tissue concentrations were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection in these brain areas of PQ/MB-treated rats and controls, as previously described (De Deurwaerdere et al., 1995; Delaville et al., 2012). Rats were decapitated, and the brains quickly removed and frozen in cold isopentane. Striatum and frontal cortex were dissected at -20°C and stored at -80°C until their use in biochemical assays. The tissues were homogenized in 200 μl of 0.1 N HClO_4 and centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4°C . Aliquots of the supernatants were diluted in the mobile phase (\emptyset for the cortex

and \emptyset for the striatum) and injected into the HPLC column (Chromasyl C8, 150 \times 4.6 mm, 5 μm) protected by a Brownlee–Newgard precolumn (RP-8, 15 \times 3.2 mm, 7 μm) (CIL, Sainte-Foy la Grande, France). The mobile phase delivered at 1.2 ml/min; flow rate was as follows (in mM): 60 NaH_2PO_4 , 0.1 disodium EDTA, and 2 octane sulfonic acid plus 7% methanol, adjusted to pH 3.9 with orthophosphoric acid and filtered through a 0.22- μm Millipore filter. Detection of compounds was performed with a coulometer detector (Coulchem1, ESA, Paris, France) coupled to a dual-electrode analytic cell (model 5011, ESA). The potential of the electrodes was set at +350 and -270 mV. Results are expressed as ng/g of tissue, and each value is mean \pm SEM.

Extracellular single unit recordings

Extracellular single-unit recordings were made in control and intoxicated rats under urethane anesthesia (1.2 g/kg i.p.) as previously reported (Ni et al., 2001a; Belujon et al., 2007). A single glass micropipette electrode (impedance: 8–12 M Ω ; aperture 0.5 μm) was filled with 4% pontamine sky blue in 3 M NaCl and then lowered into the STN according to the stereotaxic coordinates of the rat brain atlas of Paxinos and Watson (Paxinos and Watson, 1996) (in mm relative to bregma, AP: -3.8 , L: -2.5 , D: 6.8–8.2). Extracellular neuronal activity was amplified, band-passfiltered (300–3000 Hz) using a preamplifier (Neurolog, Digitimer, UK) and transferred via a Powerlab interface (AD Instruments, Charlotte, NC, USA) to a computer equipped with Chart 5 software (AD Instruments). Only neuronal activity with a signal-to-noise ratio $> 3:1$ was recorded and used for further investigation. Basal firing of neurons was recorded for 10 min, and at the end of each session the recording site was marked by electrophoretic injection (Iso DAM80, World Precision Instruments, Hertfordshire, UK) of pontamine sky blue after recording the last neuron of the last trajectory through the micropipette at a negative current of 20 μA for 10 min. After completion of the experiments, animals were sacrificed, the brains removed, frozen in isopentane at -45°C and stored at -80°C . Fresh-frozen brains were cryostat cut into 20- μm coronal sections and acetylcholine esterase staining was used as previously described (Chetrit et al., 2009) to determine the location of the pontamine sky blue dots marking the recording site in the recorded structure. Only brains with clear blue dots in the STN were used for data analysis.

Data analysis

The activity of each neuron was analyzed with a spike discriminator using a spike histogram program (AD Instruments), and firing parameters were calculated using Neuroexplorer program (Alpha Omega, Nazareth, Israel). Firing rates were expressed as the averaged frequency of discharge calculated over the 10-min period of stabilization, and the value for each group is mean \pm SEM. Firing patterns were analyzed as previously described (Labarre et al., 2008) using the method of Kaneoke and Vitek (1996). Three patterns were determined: a regular pattern, with a discharge

density distribution of spike train that follows a near-normal distribution; an irregular pattern, which follows a Poisson distribution; and a bursty pattern, with a discharge density histogram that follows two different distributions. The number of cells discharging in each pattern was expressed as a percentage of the total number of neurons recorded.

Statistical analysis

Statistical analyses were done using Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Results of locomotor activity as well as motor coordination and body weight loss were compared using a Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test as a post-test method. Non-motor tests, electrophysiological and biochemical results were compared using a One-way ANOVA followed by Bonferroni test when Normality and Equal variance test were passed, otherwise Kruskal–Wallis followed by Dunn's was used. A p value < 0.05 was considered as significant.

RESULTS

Intoxicated animals manifested different responses to PQ/MB treatment

PQ/MB intoxicated animals induced different profiles of body weight. Two weeks after the beginning of PQ/MB treatment, animals manifested three different responses: (1) the majority of animals (group 1, $n = 16$) showed rapid and severe body weight loss (Two-way ANOVA, $F = 19.19$, $p < 0.001$) with resting tremor of all the body and signs of respiratory distress. Five of them died and 11 were sacrificed and their brains collected for biochemical analysis of monoamines. (2) Animals of group 2 ($n = 6$) showed only tremor with no significant weight loss after 2 weeks of treatment. We continued PQ/MB treatment until the fourth week during which they showed rapid and severe weight loss (Two-way ANOVA, $F = 11.32$, $p < 0.001$). We then decided to sacrifice them and their brains were collected. (3) At last, only four treated animals (group 3) remained resistant without body weight loss (Two-way ANOVA, $F = 0.82$, $p = 0.61$) until the end of the experiment, 6 weeks after the beginning of treatment (Fig. 1B).

PQ/MB treatment induced different effects on locomotor activity

The locomotor activity was assessed once a week in control and PQ/MB-treated animals. Compared to control rats, PQ/MB treatment affected horizontal and vertical movements over time in group 1 (Two-way ANOVA, $F = 7.611$, $p = 0.001$ and $F = 7.55$, $p = 0.001$ respectively, Fig. 2A, D) and group 2 (Two-way ANOVA, $F = 2.97$, $p < 0.05$ and $F = 3.89$, $p < 0.01$ respectively, Fig. 2B, E). In contrast to group 2 (Two-way ANOVA, $F = 1.69$, $p = 0.17$, Fig. 2H) stereotypic movements of group 1 were affected (Two-way ANOVA, $F = 5.32$, $p < 0.01$, Fig. 2G). Finally, PQ/MB treatment did not affect horizontal (Two-way ANOVA, $F = 0.22$, $p = 0.97$, Fig. 2C), and neither

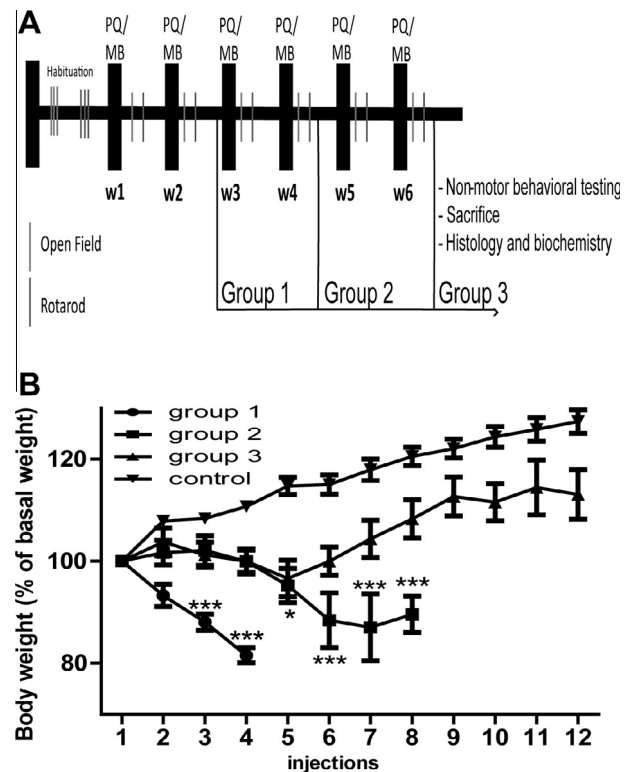


Fig. 1. (A) Schematic presentation of the experimental paradigm. (B) Effect of PQ/MB treatment on body weight gain. Data reported as mean \pm SEM from group 1 ($n = 16$), group 2 ($n = 6$), group 3 ($n = 4$) of PQ/MB-treated rats and controls ($n = 8$). Data were compared using a two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

vertical (Two-way ANOVA, $F = 1.28$, $p = 0.28$, Fig. 2F) or stereotypic (Two-way ANOVA, $F = 0.65$, $p = 0.69$, Fig. 2I) movements of group 3. Animals of group 1 showed a significant decrease of horizontal ($p < 0.001$), vertical ($p < 0.01$) and stereotypic ($p < 0.001$) activity after the first week of injection and continued to decrease much more for the second week ($p < 0.001$, $p < 0.001$ and $p < 0.01$ respectively). For group 2, the start of decrease of horizontal activity began after 2 weeks of treatment ($p < 0.05$), which continued during the third and fourth ($p < 0.01$) weeks. No significant decrease was observed in the vertical activity until the fourth week where a significant decrease of this parameter was observed ($p < 0.05$). Stereotypic activity was decreased after three weeks of injection ($p < 0.01$) and continued at the fourth week ($p < 0.05$). On the other hand, results of group 3 remained non significant during the 6 weeks of tests except for the vertical movements (Fig. 2).

PQ/MB treatment induced different responses in motor coordination

The rotarod test was used to assess the effect of PQ/MB treatment on motor coordination. Compared to controls, PQ/MB treatment significantly affected the time spent on the rotating bar in animals of groups 1 and 2 (Two-way ANOVA, $F = 3.699$, $p < 0.05$ and $F = 6.042$, $p < 0.001$ respectively, Fig. 3A, B). In group 1, the

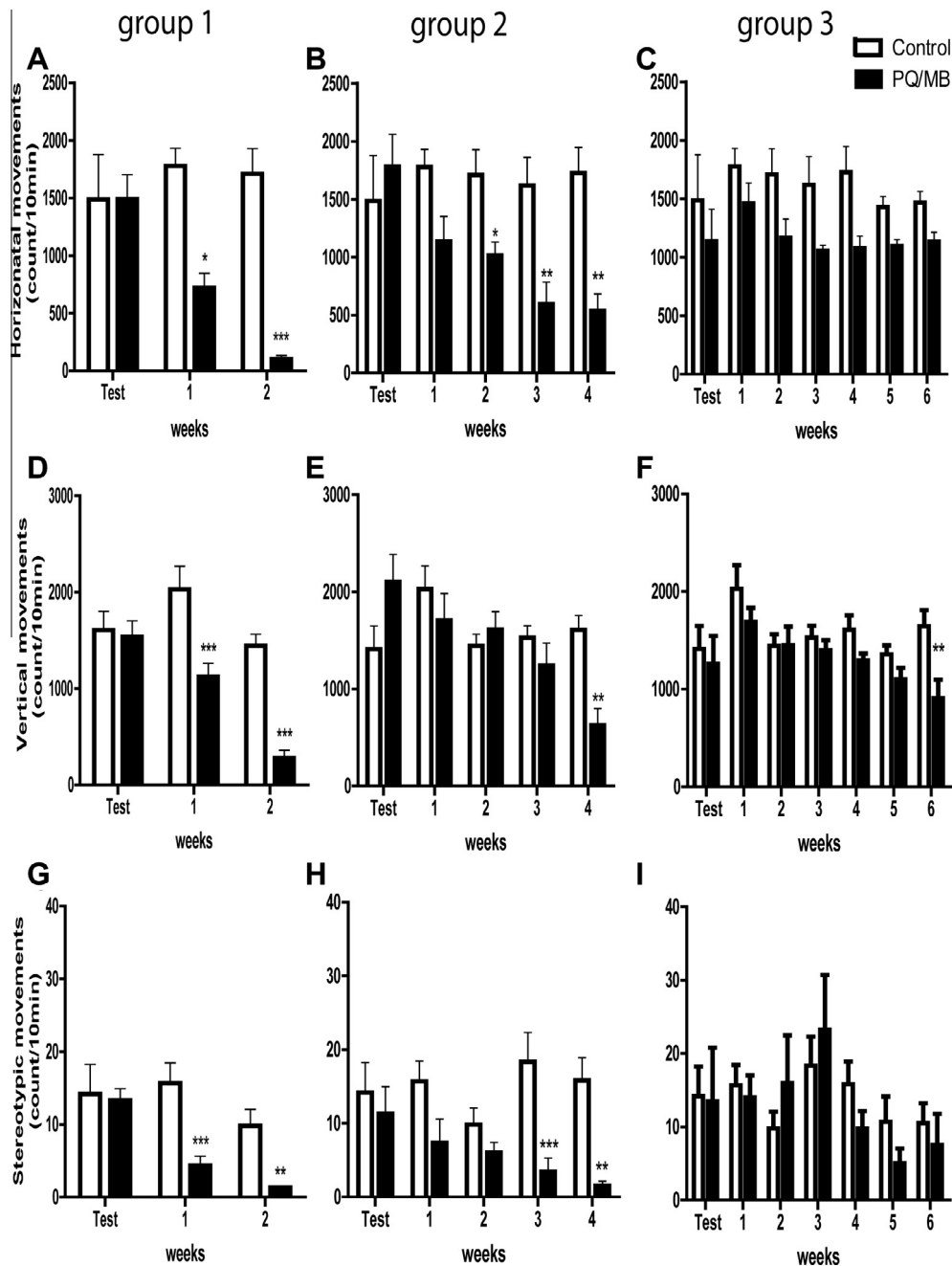


Fig. 2. PQ/MB treatment reduced locomotor activity measured in the “open field” actimeter in animals of group 1 and group 2 but had no change in group 3. Locomotor activity histograms represent the number of horizontal (A–C), vertical (D–F) and stereotypic (G–I) movements recorded during the second 10 min session, before and once a week after two injections of PQ/MB in the three groups of animals compared to controls. Data reported as mean \pm SEM from PQ/MB-treated animals of group 1 ($n = 16$), group 2 ($n = 6$), group 3 ($n = 4$) and controls ($n = 8$). Data were compared using a two-way ANOVA, followed by Bonferroni post hoc test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

decrease of time spent on the rotating bar was started just after the first week of injections ($p < 0.01$) and continued to decrease during the second week ($p < 0.001$). In group 2, the decrease of time spent on the rotating bar also started after the first week ($p < 0.001$) and continued after two ($p < 0.001$), three ($p < 0.001$) and four ($p < 0.001$) weeks of injections. In contrast to groups 1 and 2, motor coordination in animals of group 3 did not change even after 6 weeks of PQ/MB

treatments compared to controls (Two-way ANOVA, $F = 0.07850$, $p = 0.998$, Fig. 3C).

PQ/MB treatment induced anxiety behavior

Anxiety behavior was not assessed for group 1 as the animals showed rapid and severe body weight loss with respiratory distress. For groups 2 and 3, anxiety behavior in the EPM was tested at the end of PQ/MB

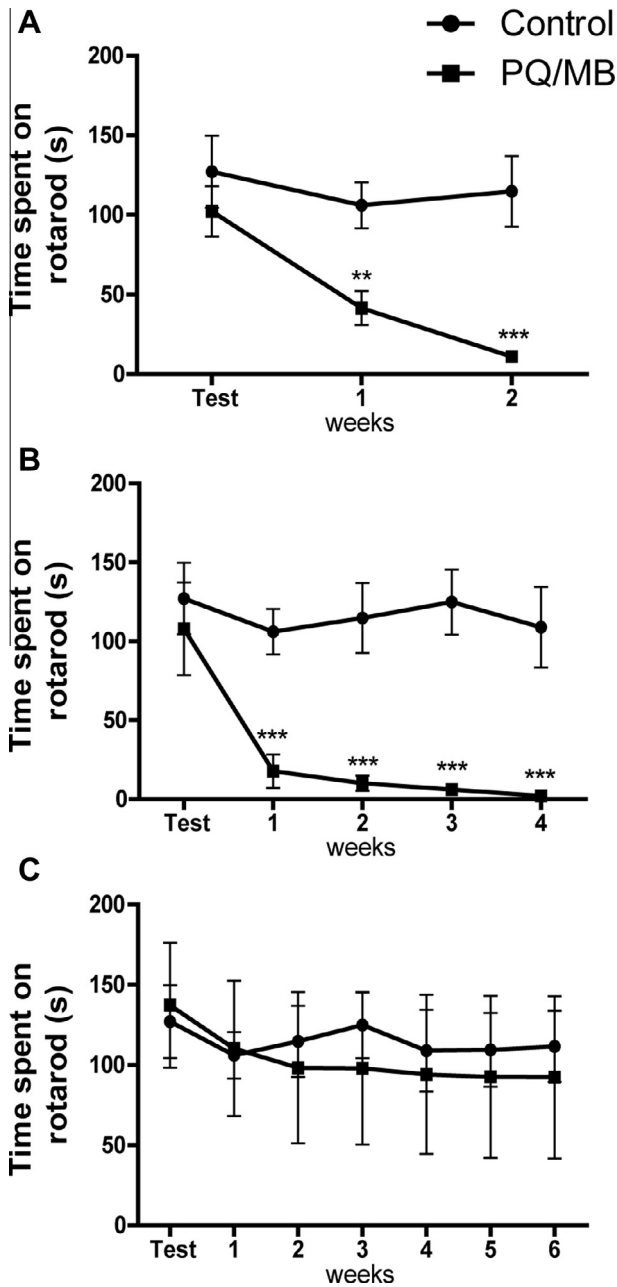


Fig. 3. PQ/MB treatment reduced motor coordination measured in the rotarod test, in animals of groups 1 and 2 but had no change in animals of group 3. Motor coordination histogram represents the time that the rat stay on the rotating bar before and once a week after two injections of PQ/MB for the three groups of animals compared to controls. Data reported as mean \pm SEM of PQ/MB-treated animals of group 1 ($n = 16$), group 2 ($n = 6$), group 3 ($n = 4$) and controls ($n = 8$). Data were compared using a two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

treatment. Compared to control rats, PQ/MB significantly affected the number of entries (Kruskal–Wallis test, $p < 0.01$, Fig. 4A) and the time spent in the open arms (Kruskal–Wallis test, $p < 0.01$, Fig. 4B). Indeed, PQ/MB dramatically decreased the number of entries by 95% in animals of group 2 ($p < 0.01$) and by 99% in animals of group 3. The time spent in the open arms also

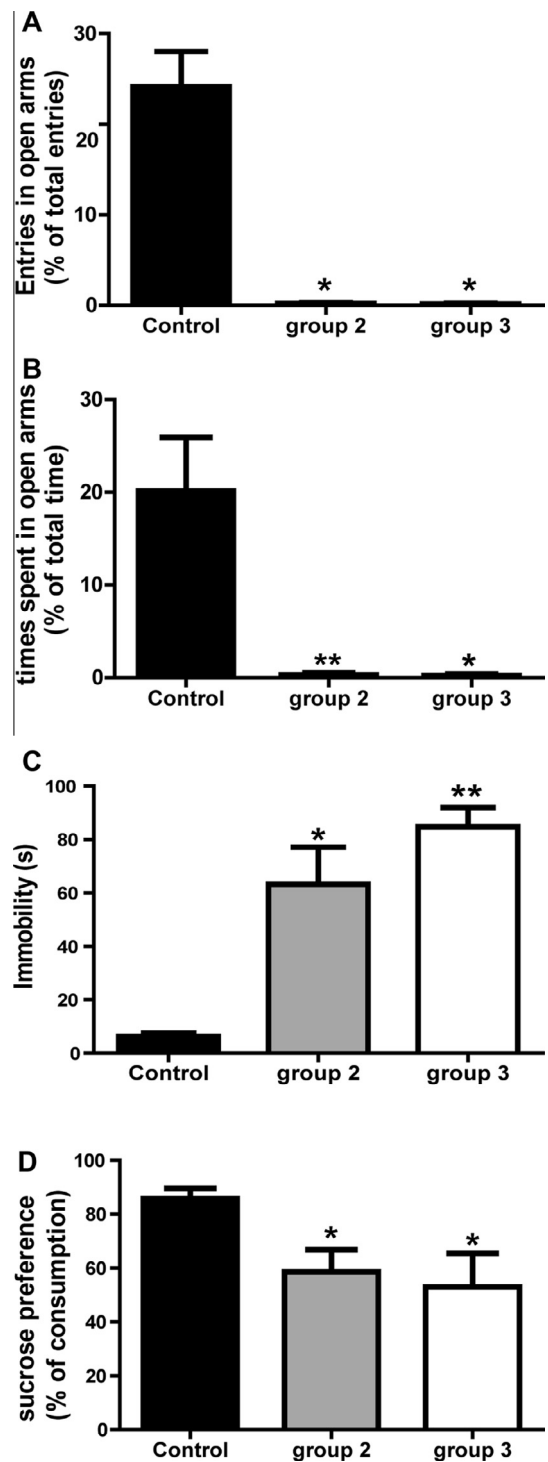


Fig. 4. PQ/MB induced anxiety (A, B), depressive like behavior (C) and anhedonia (D) in animals of groups 2 and 3. (A) Histogram showing the percentage of the number of entries in the open arms of elevated plus maze relative to the total number of entries into the four arms. (B) Histogram showing the percentage of time spent in the open arms relative to the total time spent in the four arms. (C) Histogram showing the immobility duration in the forced swim test. (D) Histogram showing the percentage of sucrose consumption relative to the total consumption. Data reported as mean \pm SEM from group 2 ($n = 5$) and group 3 ($n = 4$) of PQ/MB-treated rats and controls ($n = 8$). One-way ANOVA followed by Bonferroni post-test or Kruskal–Wallis one-way ANOVA followed by *Dunn's post-test* was performed; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ in comparison with controls.

significantly decreased in animals of groups 2 and 3 by 99% and by 92% respectively.

PQ/MB treatment induced depressive-like behavior

As for anxiety, depressive-like behavior was not assessed in animals of group 1 for the same reasons. For groups 2 and 3, depressive-like behavior was assessed using the forced swim test at the end of PQ/MB treatment. Compared to control rats, PQ/MB treatment significantly affected the immobility time in groups 2 and 3 (Kruskall–Wallis test, $p < 0.01$, Fig. 4C). Indeed, PQ/MB significantly increased the immobility time in animals of groups 2 and 3 (86.00 ± 23.58 s and 99.60 ± 4.85 s, respectively, versus 6.17 ± 1.49 s in controls). Anhedonia was assessed using the sucrose preference test. Compared to control animals, PQ/MB treatment significantly affected the sucrose consumption in groups 2 and 3 (Kruskall–Wallis test, $p < 0.01$, Fig. 4D). It significantly reduced the sucrose consumption by 31% in group 2 ($p < 0.01$) and by 34% in group 3 ($p < 0.01$).

PQ/MB intoxication affected DA and DOPAC tissue contents but not NE, 5-HT and 5-HIAA

As shown in Fig. 5, the systemic administration of PQ/MB produced a significant alteration of tissue content of DA (One-way ANOVA, $F = 6.10$, $p = 0.004$, Fig. 5A) and its metabolite DOPAC (Kruskall–Wallis, $p = 0.029$, Fig., 5B) in the striatum, but not that of NE (One-way ANOVA, $F = 0.490$, $p = 0.693$; Fig. 5C), nor 5-HT and 5-HIAA (Kruskall–Wallis One-way ANOVA, $p = 0.38$ and One-way ANOVA, $F = 0.49$, $p = 0.693$ and $F = 0.49$, $p = 0.69$, respectively, Fig. 5D, E) in the frontal cortex. Compared to control rats, PQ/MB significantly reduced striatal DA tissue level by 55% in group 1 ($p < 0.01$), by 46.6% in group 2 ($p < 0.05$) and by 50% in group 3 ($p < 0.05$, Fig. 5A). Concerning the DOPAC, PQ/MB significantly reduced its tissue level in the striatum of only group 1 by 48.89% ($p < 0.05$), but a high tendency for groups 2 and 3 was observed (Fig. 5B).

PQ/MB intoxication affected the neuronal activity of STN neurons

In control rats, the mean firing rate of STN neurons ($n = 43$) was 11.36 ± 1.25 spikes/s. Majority of these neurons discharged regularly (69.04%, Fig. 6A) and only few discharged irregularly (19.04%, Fig. 6B) or with bursts (11.90%, Fig. 6C). Compared to control rats, PQ/MB treatment significantly affected the firing rate (Kruskall–Wallis followed by *Dunn's post-test*, $p < 0.001$, Fig. 6D) in group 1 (4.21 ± 1.01 spikes/s, $p < 0.001$), group 2 (5.13 ± 0.79 spikes/s, $p < 0.001$) and group 3 (2.96 ± 0.5 spikes/s, $p < 0.001$). Moreover, examination of the coefficient of variation (CV) of the interspike interval distribution revealed changes in the firing pattern of cells in the STN of intoxicated rats. Indeed, PQ/MB treatment significantly increased the CV in group 1 (1.25 ± 0.15), group 2 (1.16 ± 0.18) and group 3 (1.3 ± 0.12) compared to control rats (0.61 ± 0.06) (Kruskall–Wallis one-way

ANOVA followed by *Dunn's post-test*, $p < 0.001$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ respectively, Fig. 6E). The percentage of STN neurons discharging regularly, was significantly reduced (14.7%, 27.02% and 8% in group 1, group 2 and group 3, respectively) and the percentage of cells discharging both irregularly (44.4%, 43.24% and 44% in group 1, group 2 and group 3, respectively) and in bursts (41.17%, 29.72% and 48% in group 1, group 2 and group 3, respectively) was significantly increased ($\chi^2 = 43.64$, $p < 0.002$, Fig. 6F). Likewise, the percentage of spikes in burst was increased in PQ/MB-treated animals (23.52 ± 4.6 , 22.31 ± 3.32 , $29.33 \pm 4.36\%$ in group 1, group 2 and group 3, respectively) compared to control rats (8.97 ± 2.05) (Kruskall–Wallis One-way ANOVA followed by *Dunn's post-test*, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, Fig. 6G).

DISCUSSION

Results of the present study showed that treated animals manifested different behavioral responses when exposed to PQ/MB intoxication: (i) one group of animals (group 1) developed early motor deficits and weight loss accompanied by severe tremor, (ii) another group of animals (group 2) developed motor and non-motor deficits with significant weight loss and slight tremor that appears at least four weeks after the beginning of PQ/MB treatment, (iii) animals of group 3 developed only very slight movement deficit that appears only after six weeks of treatment with no significant weight loss but accompanied by significant non-motor disorders. These abnormal behaviors were paralleled by a significant reduction of tissue contents of DA, as well as changes in the electrical activity of STN neurons. Nevertheless, tissue contents of NE and 5-HT were not affected by PQ/MB intoxication.

Our results showed that PQ/MB treatment induced in the majority of treated animals a loss of body weight, tremor and signs of respiratory distress; other rats intoxicated in the same conditions exhibited no significant body weight loss and no respiratory problems. The presence of dichotomous populations after PQ/MB intoxication has already been reported in rats and mice in which a group of animals suffers from systemic toxicity and another group recovers and displays no lung pathology (Satomi et al., 2004; Cicchetti et al., 2005; Saint-Pierre et al., 2006). These results demonstrate that PQ/MB combination induced different effects depending on the vulnerability of individuals and that this difference in vulnerability may be attributed the natural biological variety and/or to gene expression differences between animals as demonstrated by a DNA microarray study that showed that PQ induced differential expression of neurofibromatosis type 1 gene which is a marker of pulmonary fibrosis (Satomi et al., 2004). The body weight loss may be a consequence of lung pathology but has also been attributed to the fact that PQ is preferentially accumulated in the hypothalamus (Corasaniti and Nistico, 1993), which is involved in the food intake regulation and body weight control (van der Gugten et al., 1977; Krauchi et al., 1984).

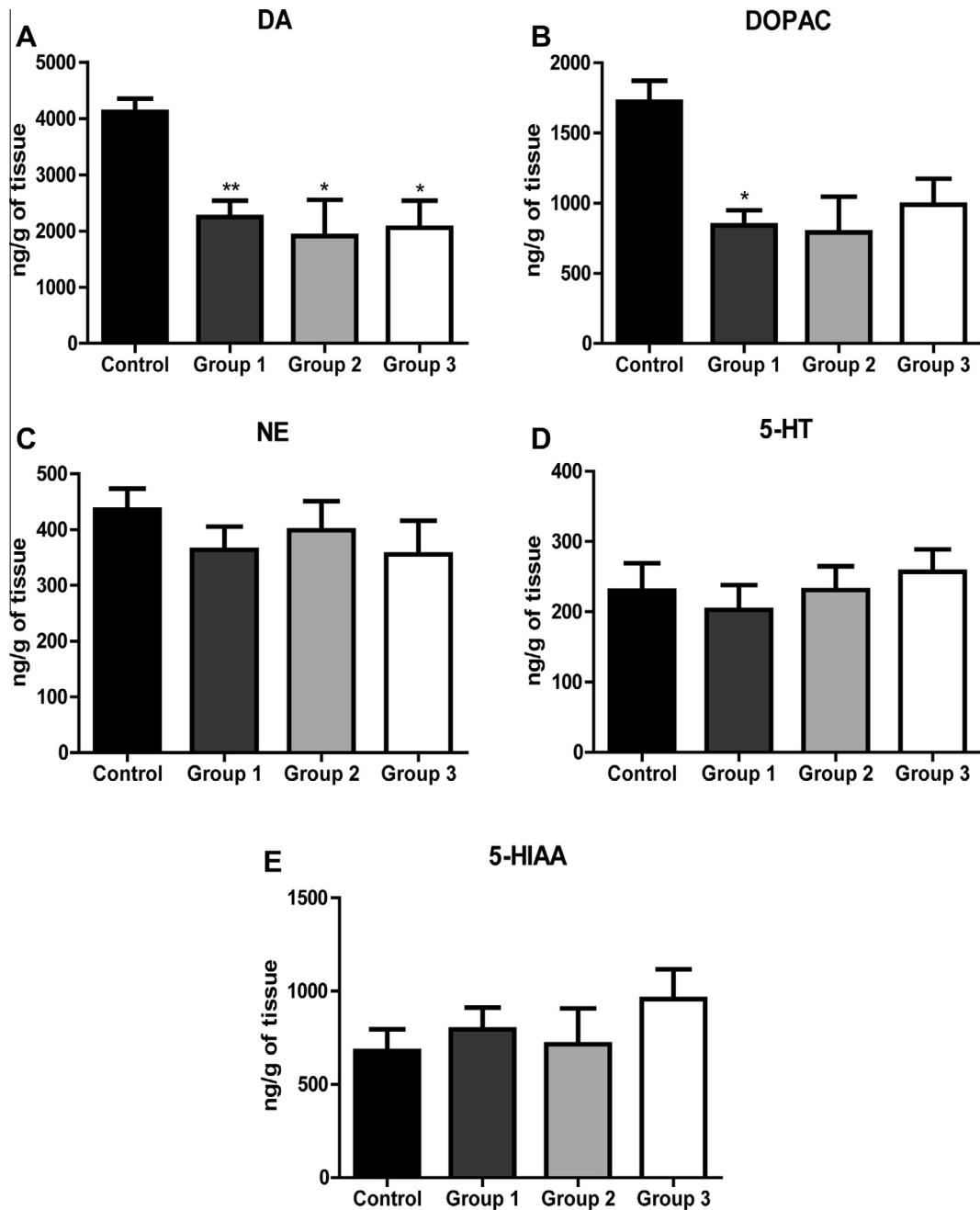


Fig. 5. Biochemical analysis of tissue contents of dopamine (DA, A) and its metabolite DOPAC (B) in the striatum and norepinephrine (NE, C), serotonin (5-HT, D) and its metabolite (5-HIAA, E) in the frontal cortex of rats treated with PQ/MB compared to controls. Data reported as mean \pm SEM of concentrations in ng/g of wet tissue. Statistical analysis using a One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test or Kruskal–Wallis followed by Dunn's post hoc test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ in comparison with controls.

The manifestation of motor impairments, assessed by the open field and the rotarod tests was also different in time course between animals. While a quick and sudden decrease in locomotor activity was developed in the animals of group 1, a progressive decrease in locomotor activity was observed in animals of group 2. Furthermore, PQ/MB treatment significantly and dramatically affected motor coordination in these two groups of animals just after the two first injections. Nevertheless, the animals of group 3 did not develop locomotor deficits and motor coordination even with

higher number of injections during a longer period of time. The motor deficits observed in animals of group 1 and group 2 are consistent with previous studies carried out in the rat and mice (Cicchetti et al., 2005) (Thiruchelvam et al., 2003) (Fahim et al., 2013). However, results of group 3, in which animals were insensitive to PQ/MB treatment, have not previously been described in the literature, suggesting that individuals are not equally and reproducibly vulnerable to pesticides.

In contrast to the motor behavior, which has been well studied in PQ/MB rat and mouse models, only few studies

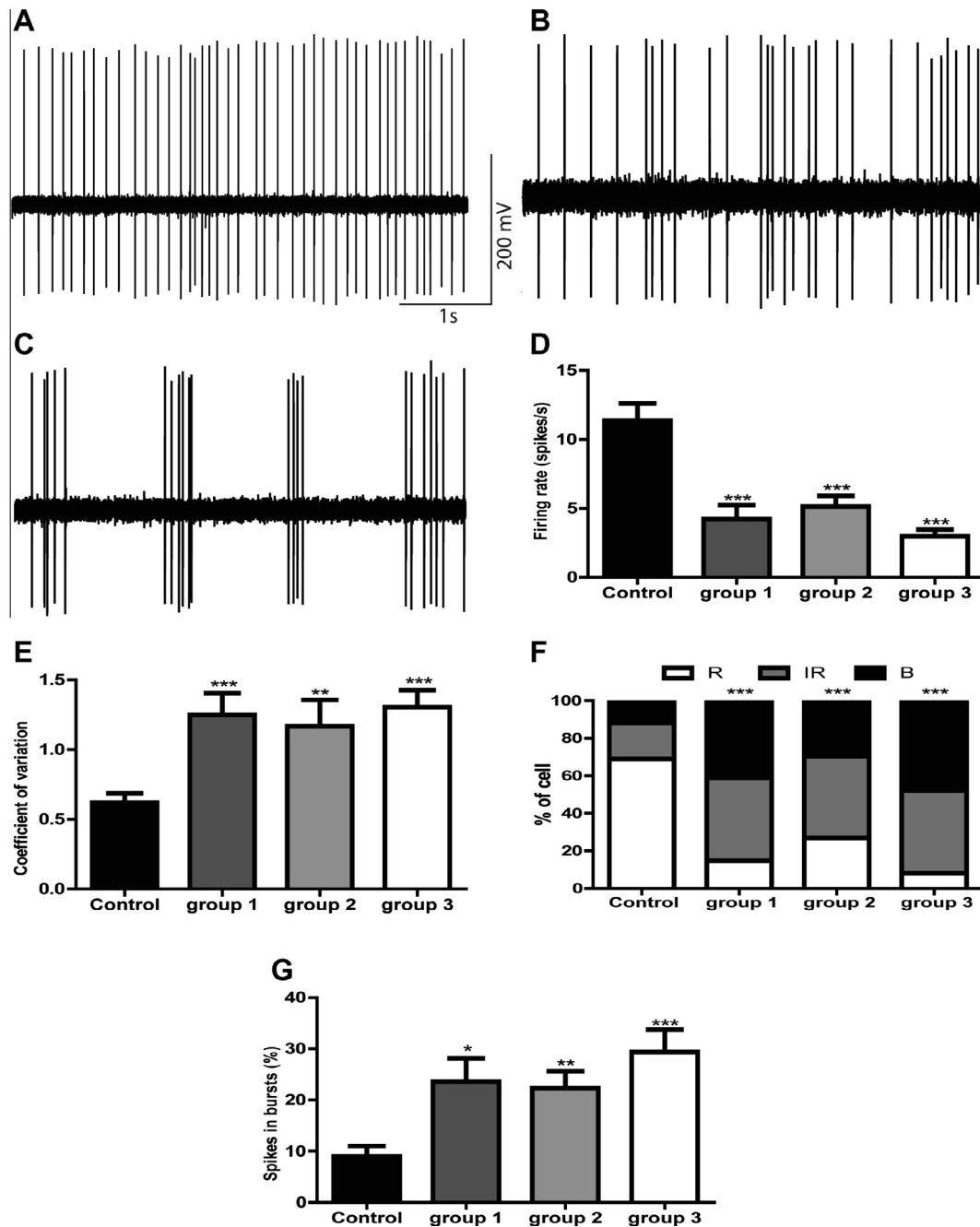


Fig. 6. PQ/MB treatment decreased the firing rate and induced a switch from regular pattern to burst pattern of discharge, in STN neurons. (A–C) Representative examples of spike trains recorded from (A) regular, (B) irregular (C) or burst firing cell in the STN. (D) Firing rate histogram. (E) Histogram showing the coefficient of variation. (F) Firing pattern histogram showing the proportion in percent of STN cells discharging regularly, irregularly or with bursts and (G) Histogram showing the pourcentage of spikes in burst. Data reported as mean \pm SEM from STN neurons of group 1, group 2 and group 3 of PQ/MB-treated rats and controls ($n = 8$). Statistical analysis using Kruskal–Wallis one-way ANOVA followed by *Dunn's post-test* for (D, E, G) and χ^2 test for firing pattern (F) were performed; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in comparison with controls.

have examined non-motors impairments induced by PQ alone (Litteljohn et al., 2008; Campos et al., 2013a), and to our knowledge, there are no studies exploring these disorders in the PQ/MB model. Herein, we show for the first time that PQ/MB treatment induced non-motor disorders in group 2, in which animals developed motor deficits, and also in group 3, in which motor performances were not affected. Indeed, our results showed that PQ/MB induced anxiety, as expressed by the dramatic reduction

in the number of entries and time spent in the plus maze open arms, and “depressive-like” behavior, as expressed by the increase in immobility time in the forced swim test. PQ/MB treatment induced also anhedonia, justified by a reduction in the sucrose preference. Considering data of non-motor impairments from only animals of group 2, we can assume that non-motor disorders can be a consequence of motor deficits. However, it is unlikely as the animals of group 3 did not show motor deficits and that

findings of anhedonic behavior assessed by the sucrose preference test, which is less dependent on locomotion, sustained the results of the forced swim test.

The non-motor disorders developed in our animals can be due to the bilateral depletion of DA as biochemical results showed that the nigro-striatal DAergic system is a preferential target of PQ/MB intoxication. Indeed, repeated injections of PQ/MB significantly decreased DA tissue level in the striatum by 54% paralleled by a significant decrease of its principal metabolite DOPAC, without any effect on tissue contents of NE, 5-HT and 5-HIAA. These results are in line with a subsequent study utilizing the same scheme of twice a week PQ/MB intoxication, in which the authors showed partial DA damage, decrease in TH protein levels, as well as nigral DA loss in mice (Thiruchelvam et al., 2000a,b; Li et al., 2005). They are also in line with those of Drui and Colleagues (Drui et al., 2014) who showed that bilateral partial lesion of DA neurons in the SNc, after stereotaxic injection of low dose of 6-hydroxydopamine (6-OHDA), induced anxiety and depressive-like behaviors without the manifestation of motor deficits. Together, our results and those of others support the assumption that anxiety, depression and PD could share some underlying biological mechanisms, such as dopaminergic transmission abnormalities. In our previous work (Delaville et al., 2012), we have shown that unilateral DA depletion alone was necessary, but not sufficient alone, to induce anxiety-like disorder. It required the additional depletion of NE and/or 5-HT. This is not the case in the present study as the bilateral DA depletion alone was able to induce this abnormal behavior, which is in line with a recent study of our team showing that bilateral DA depletion was able to induce anxiety behavior (Faggiani et al., 2015). Accordingly, anxiety and depressive-like behaviors are both dependent on DA depletion.

Based on the link between motor deficit and the damage of SNc DAergic neurons in PD patients and in the classical animal models of the disease (6-OHDA rat model and MPTP-treated non-human primate), it is clear that the emergence of motor deficits requires the damage of 70% of DA neurons in the SNc, which results in around 80% depletion of DA in the striatum (Dauer and Przedborski, 2003). This was not the case in the present study as the maximum of DA depletion was 54%. Considering the body weight loss, lung pathology and lack of an important effect of PQ/MB treatment on striatal DA depletion, it is difficult to assume that the observed motor deficits are only due to DA damage caused by PQ/MB. It is likely that the motor perturbations can be due, at least in part, to peripheral problems linked to lung pathology, as only ill animals showed motor deficits. In animals of group 3, which did not show respiratory distress, the partial depletion of DA was not sufficient to result in motor deficit as shown by the absence of changes in the parameters of locomotor activity and motor coordination.

In addition to the behavioral and biochemical studies, we investigated the impact of PQ/MB intoxication on the neuronal activity of STN neurons in the three groups of animals. Our results showed for the first time that

PQ/MB induced dramatic changes in the firing rate and patterns of STN neurons in a similar manner in the three groups of animals. Surprisingly, STN neurons did not exhibit the suspected increase in their firing rate as consequence of DA cell lesion but a significant decrease was observed. This result is not in total disagreement with the literature as previous studies have reported contrasting data in 6-OHDA rat model of PD. Some have shown an increase (Hassani et al., 1996; Breit et al., 2007), others no change (Belujon et al., 2007; Delaville et al., 2012; Chetrit et al., 2013), and others a decrease during the first two weeks post-6-OHDA lesion (Ni et al., 2001c). However, the main and consistent effect was the change in firing patterns. The tonic regular firing characteristic of the normal situation became bursty and irregular, which are the pathological signature of STN neurons in PD (Benazzouz et al., 2002). What is surprising is the presence of bursty and irregular patterns in animals of group 3 who showed a partial depletion of DA without developing motor deficits. These results are in line with those of a recent study, which investigated the link between the levels of DA depletion, motor symptoms and STN burst activity in rats with different levels of DAergic denervation induced by the stereotaxic injection of 6-OHDA (Janssen et al., 2012). These authors have shown that in animals with a mild lesion and no locomotor abnormalities, the firing pattern of their STN neurons shifted from a regular firing to a burst mode in a similar manner compared to animals with a substantial or severe lesion. Interestingly, the amount of STN bursty neurons found in a previous study from our team was also similar in partial and severe 6-OHDA lesioned rats (Breit et al., 2007). The early occurrence of a bursty phenotype might be a result of DA inputs from the SNc to the STN (Ni et al., 2001b; Janssen et al., 2012; Chetrit et al., 2013), contributing to compensatory mechanism to drive the remaining SNc neurons to enhance the DA release through the nigrostriatal pathway (Bezard et al., 1999).

CONCLUSION

The present study provides evidence that male Sprague–Dawley rats are not reproducibly and equally sensitive to PQ/MB and shows that the observed motor deficits in some intoxicated animals, are not only a result of DAergic neuron degeneration, but may also be a consequence of peripheral disabilities including respiratory distress. Nevertheless, the parkinsonian-like non-motor impairments, such as anxiety and depression reported in PD patients, may be a direct consequence of the bilateral DA depletion.

Acknowledgments—This study was supported by the “Université de Bordeaux”, exchange grants of the “Groupement de Recherche International” (GDRI N198, CNRS & INSERM France, and CNRST Morocco) and the “Institut Français du Maroc, Ambassade de France”. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We wish to thank Dr. Omar Mamad, Dr. Mélanie Lagière and Frédéric Naudet for their technical help and assistance.

REFERENCES

- Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, O'Reilly E, McCullough ML, Calle EE, Schwarzschild MA, Thun MJ (2006) Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 60:197–203.
- Belujon P, Bezard E, Taupignon A, Bioulac B, Benazzouz A (2007) Noradrenergic modulation of subthalamic nucleus activity: behavioral and electrophysiological evidence in intact and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci* 27:9595–9606.
- Benazzouz A, Breit S, Koudsie A, Pollak P, Krack P, Benabid AL (2002) Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Mov Disord* 17(Suppl. 3):S145–149.
- Bertrand E, Lechowicz W, Szpak GM, Dymecki J (1997) Qualitative and quantitative analysis of locus coeruleus neurons in Parkinson's disease. *Folia Neuropathol* 35:80–86.
- Bezard E, Boraud T, Bioulac B, Gross CE (1999) Involvement of the subthalamic nucleus in glutamatergic compensatory mechanisms. *Eur J Neurosci* 11:2167–2170.
- Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S (2012) Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol* 2012:845618.
- Borsini F, Meli A (1988) Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology* 94:147–160.
- Bouabid S, Delaville C, De Deurwaerdere P, Lakhdar-Ghazal N, Benazzouz A (2014) Manganese-induced atypical parkinsonism is associated with altered Basal Ganglia activity and changes in tissue levels of monoamines in the rat. *PLoS One* 9:e98952.
- Breit S, Bouali-Benazzouz R, Popa RC, Gasser T, Benabid AL, Benazzouz A (2007) Effects of 6-hydroxydopamine-induced severe or partial lesion of the nigrostriatal pathway on the neuronal activity of pallido-subthalamic network in the rat. *Exp Neurol* 205:36–47.
- Campos FL, Carvalho MM, Cristovao AC, Je G, Baltazar G, Salgado AJ, Kim YS, Sousa N (2013a) Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Front Behav Neurosci* 7:175.
- Campos FL, Carvalho MM, Cristovao AC, Je G, Baltazar G, Salgado AJ, Kim YS, Sousa N (2013b) Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Front Behav Neurosci* 7.
- Chetrit J, Ballion B, Laquitaine S, Belujon P, Morin S, Taupignon A, Bioulac B, Gross CE, Benazzouz A (2009) Involvement of Basal Ganglia network in motor disabilities induced by typical antipsychotics. *PLoS One* 4:e6208.
- Chetrit J, Taupignon A, Froux L, Morin S, Bouali-Benazzouz R, Naudet F, Kadiri N, Gross CE, Bioulac B, Benazzouz A (2013) Inhibiting subthalamic D5 receptor constitutive activity alleviates abnormal electrical activity and reverses motor impairment in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 33:14840–14849.
- Cicchetti F, Lapointe N, Roberge-Tremblay A, Saint-Pierre M, Jimenez L, Ficke BW, Gross RE (2005) Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. *Neurobiol Dis* 20:360–371.
- Corasaniti MT, Nistico G (1993) Determination of paraquat in rat brain by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 643:419–425.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889–909.
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ (1979) Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1:249–254.
- De Deurwaerdere P, Bonhomme N, Le Moal M, Spampinato U (1995) D-fenfluramine increases striatal extracellular dopamine in vivo independently of serotonergic terminals or dopamine uptake sites. *J Neurochem* 65:1100–1108.
- Delaville C, Chetrit J, Abdallah K, Morin S, Cardeit L, De Deurwaerdere P, Benazzouz A (2012) Emerging dysfunctions consequent to combined monoaminergic depletions in Parkinsonism. *Neurobiol Dis* 45:763–773.
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995) Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 121:66–72.
- Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, Scott NW, Prescott GJ, Bennett J, Semple S, Dick S, Counsell C, Mozzoni P, Haites N, Wettinger SB, Mutti A, Otelea M, Seaton A, Soderkvist P, Felice A (2007) Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med* 64:666–672.
- Druj 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.
- Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klinische Wochenschr* 38:1236–1239.
- Faggiani E, Delaville C, Benazzouz A (2015) The combined depletion of monoamines alters the effectiveness of subthalamic deep brain stimulation. *Neurobiol Dis* 82:342–348.
- Fahim MA, Shehab S, Nemmar A, Adem A, Dhanasekaran S, Hasan MY (2013) Daily subacute paraquat exposure decreases muscle function and substantia nigra dopamine level. *Physiol Res* 62:313–321.
- Guilarte TR (2013) Manganese neurotoxicity: new perspectives from behavioral, neuroimaging, and neuropathological studies in humans and non-human primates. *Front Aging Neurosci* 5:23.
- Hassani OK, Mouroux M, Feger J (1996) Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus. *Neuroscience* 72:105–115.
- Hatcher JM, Pennell KD, Miller GW (2008) Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends Pharmacol. Sci.* 29:322–329.
- Janssen ML, Zwartjes DG, Temel Y, van Kranen-Mastenbroek V, Duits A, Bour LJ, Veltink PH, Heida T, Visser-Vandewalle V (2012) Subthalamic neuronal responses to cortical stimulation. *Mov Disord* 27:435–438.
- Kachroo A, Irizarry MC, Schwarzschild MA (2010) Caffeine protects against combined paraquat and maneb-induced dopaminergic neuron degeneration. *Exp Neurol* 223:657–661.
- Kaneoke Y, Vitek JL (1996) Burst and oscillation as disparate neuronal properties. *J Neurosci Methods* 68:211–223.
- Kish SJ (2003) Biochemistry of Parkinson's disease: is a brain serotonergic deficiency a characteristic of idiopathic Parkinson's disease? *Adv Neurol* 91:39–49.
- Krauchi K, Wirz-Justice A, Morimasa T, Willener R, Feer H (1984) Hypothalamic alpha 2- and beta-adrenoceptor rhythms are correlated with circadian feeding: evidence from chronic methamphetamine treatment and withdrawal. *Brain Res* 321:83–90.
- Labarre D, Meissner W, Boraud T (2008) Measure of the regularity of events in stochastic point processes, application to neuron activity analysis. In: 33rd IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing, pp. 489–492. Las Vegas, NV.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science (New York, NY)* 219:979–980.
- Li X, Matsumoto K, Murakami Y, Tezuka Y, Wu Y, Kadota S (2005) Neuroprotective effects of *Polygonum multiflorum* on nigrostriatal dopaminergic degeneration induced by paraquat and maneb in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 82:345–352.
- Litteljohn D, Mangano EN, Hayley S (2008) Cyclooxygenase-2 deficiency modifies the neurochemical effects, motor impairment and co-morbid anxiety provoked by paraquat administration in mice. *Eur J Neurosci* 28:707–716.
- McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA (2002) Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis* 10:119–127.

- Morato GS, Lemos T, Takahashi RN (1989) Acute exposure to maneb alters some behavioral functions in the mouse. *Neurotoxicol Teratol* 11:421–425.
- Ni Z, Bouali-Benazzouz R, Gao D, Benabid AL, Benazzouz A (2001a) Intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine induces changes in the firing rate and pattern of subthalamic nucleus neurons in the rat. *Synapse* (New York, NY) 40:145–153.
- Ni Z, Gao D, Bouali-Benazzouz R, Benabid AL, Benazzouz A (2001b) Effect of microiontophoretic application of dopamine on subthalamic nucleus neuronal activity in normal rats and in rats with unilateral lesion of the nigrostriatal pathway. *Eur J Neurosci* 14:373–381.
- Ni ZG, Bouali-Benazzouz R, Gao DM, Benabid AL, Benazzouz A (2001c) Time-course of changes in firing rates and firing patterns of subthalamic nucleus neuronal activity after 6-OHDA-induced dopamine depletion in rats. *Brain Res* 899:142–147.
- Papp M, Bal A (1987) Separation of the motivational and motor consequences of 6-hydroxydopamine lesions of the mesolimbic or nigrostriatal system in rats. *Behav Brain Res* 23:221–229.
- Paxinos G, Watson C (1996) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Rozas G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (1997) An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res Brain Res Protoc* 2:75–84.
- Sabbar M, Delaville C, De Deurwaerdere P, Benazzouz A, Lakhdar-Ghazal N (2012) Lead intoxication induces noradrenaline depletion, motor nonmotor disabilities, and changes in the firing pattern of subthalamic nucleus neurons. *Neuroscience* 210:375–383.
- Saint-Pierre M, Tremblay ME, Sik A, Gross RE, Cicchetti F (2006) Temporal effects of paraquat/maneb on microglial activation and dopamine neuronal loss in older rats. *J Neurochem* 98:760–772.
- Satomi Y, Tsuchiya W, Mihara K, Ota M, Kasahara Y, Akahori F (2004) Gene expression analysis of the lung following paraquat administration in rats using DNA microarray. *J Toxicol Sci* 29:91–100.
- Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, Suno M, Ogawa K, Hayase N, Kimura K, Shiono H (2001) Carrier-mediated processes in blood–brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Res* 906:135–142.
- Snyder SH, D'Amato RJ (1985) Predicting Parkinson's disease. *Nature* 317:198–199.
- Takahashi RN, Rogerio R, Zanin M (1989) Maneb enhances MPTP neurotoxicity in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 66:167–170.
- Tanner CM (1989) The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 12:49–54.
- Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA (2000a) The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci* 20:9207–9214.
- Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB, Cory-Slechta DA (2000b) Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res* 873:225–234.
- Thiruchelvam M, McCormack A, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Di Monte DA, Cory-Slechta DA (2003) Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. *Eur J Neurosci* 18:589–600.
- van der Gugten J, de Kloet ER, Versteeg HG, Slangen JL (1977) Regional hypothalamic catecholamine metabolism and food intake regulation in the rat. *Brain Res* 135:325–336.
- Xu H, Chen R, Cai X, He D (2011) Differential effects of activating D1 and D2 receptors on electrophysiology of neostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease induced by paraquat and maneb. *Neurosci Res* 71:411–420.

(Accepted 12 October 2015)
(Available online 20 October 2015)