



Vulnérabilité des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson : rôle des afférences excitatrices des systèmes cholinergique pédonculopontin et orexinergique hypothalamique

Manale Bensaid

► To cite this version:

Manale Bensaid. Vulnérabilité des neurones dopaminergiques dans la maladie de Parkinson : rôle des afférences excitatrices des systèmes cholinergique pédonculopontin et orexinergique hypothalamique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066611 . tel-01165068

HAL Id: tel-01165068

<https://theses.hal.science/tel-01165068>

Submitted on 18 Jun 2015

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.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale n° 158 ED3C

*ICM - UPMC-P6 UMR S 1127 - Inserm U 1127 - CNRS UMR 7225 / Thérapeutique
expérimentale de la neurodégénérescence*

**Vulnérabilité des neurones dopaminergiques dans la
maladie de Parkinson :
Rôle des afférences excitatrices des systèmes cholinergique
pédonculopontin et orexinergique hypothalamique**

Par Manale Bensaïd

Thèse de doctorat en Neurosciences

Dirigée par Chantal François et co-dirigée par Patrick Pierre Michel

Présentée et soutenue publiquement le Vendredi 12 Décembre 2014

Devant un jury composé de :

Pr Philippe FAURE

Dr Lydia KERKERIAN-LE GOFF

Dr Brigitte PIALLAT

Dr Laurent VENANCE

Dr Chantal FRANCOIS

Dr Patrick Pierre MICHEL

Président

Rapporteuse

Rapporteuse

Examineur

Directrice de thèse

Co-Directeur de thèse



web

Remerciements

Mon travail de thèse a été effectué à l'Institut du Cerveau et de la Moelle, ICM - CNRS UMR 7225 - Inserm U 1127 - UPMC-P6 UMR S 1127, au sein de l'équipe de « thérapeutiques expérimentales de la neurodégénérescence » dirigée par Etienne HIRSCH, que je tiens à remercier pour m'avoir permis d'intégrer son équipe afin de réaliser ma thèse et pour m'avoir soutenu afin d'intégrer le programme doctoral « Sciences et Management ».

Je tiens à remercier vivement Chantal FRANCOIS, ma directrice de thèse, pour son encadrement lors de ce travail mais surtout pour sa grande disponibilité, ses précieux conseils, ses remarques toujours constructives, pour nos discussions scientifiques très dynamiques et intéressantes ainsi que pour son écoute.

Je tiens également à remercier Patrick MICHEL, mon co-directeur de thèse, pour son implication, ses conseils tout aussi précieux et ses critiques également constructives.

Je remercie mes rapporteuses, Lydia KERKERIAN- LE GOFF et Brigitte PIALLAT, mon examinateur, Laurent VENANCE et le président du jury, Philippe FAURE pour leur évaluation de mon travail de thèse.

Un grand merci à toute l'équipe HIRSCH mais aussi aux « non-HIRSCH ». Merci pour votre aide, votre gentillesse, votre humour, votre passion. Vous avez rendu le quotidien au labo bien plus agréable. Je tiens particulièrement à remercier « la team Hirsch » : à Vincent mais Romain pour tous ces moments de rigolade et de détente pendant la thèse et aussi en dehors ; à Serge pour tous tes conseils et bonnes idées ; à Anne-Laure pour ton écoute et ton humour que j'adore même si parfois nous sommes que deux à rire ; à Yann pour ton fort penchant pour la critique ; à Jaime pour ta bonne humeur permanente, à Jérémie toujours prêt à rire et à donner des conseils ; à Gaël pour tous les moments sportifs ou de détente, à Cécile, à Julia ; à Morgane ; Clélia mais aussi aux nouveaux de la team, Florence ; Sabah, Clémence, Laetitia, Déborah, François-Pierre... Et merci à ceux d'équipes voisines : Mélissa pour les moments « craquage » et libération du stress par une pause-café ; Morwenna pour ton soutien et les

bons délires ; Maria Belen, mon ancienne stagiaire de poche, pour ton côté toujours optimiste et fonceur, tu vas aller loin petite ; à Morgane, Tristan, Adrien...

Un remerciement de taille pour tous les BIP & CO, parce que même après le Master nous restons toujours important les uns pour les autres. Alors merci : à Basile parce que tu es bien plus qu'un ami et un coloc, tu fais partie de ma famille ; à Isabelle pour ton écoute et ton amitié sans faille ; à la génialissime Manutea mon éternel « wingwomen » ; à Renaud pour ton enthousiasme (nan je rigole) pour ton pragmatisme à toute épreuve, tes supers tours de magies et pour avoir permis aux BIP d'être grâce à tes Videlles ; à Marion pour toutes tes petites histoires croustillantes, les fou-rires et les Noël dans ta famille ; au pilier Laura pour tous ces moments agréables passés autour d'un verre permettant d'oublier un peu la galère ; à l'adorable insectophile Antoine ; à Justine pour ton écoute et tous les bons délires qu'on a eu ensemble ; à Romain pour ton endurance envers mes blagues foireuses sur les belges ; à Garthiga pour ta gentillesse et toutes tes attentions portées envers chacun des BIP ; à Nicolas pour tes discussions sur la géopolitique qui peuvent durer des heures ; à l'étonnant et adorable Samuel pour ton éternel humour ; à l'homme évolué, Quentin, pour tes discussions d'intellectuels à en faire mal au crâne ; à Pauline qui malgré la distance reste une amie hors pair ; à Nathalie et Joachim pour leur gentillesse et les super moments passés ensemble (d'ailleurs je suis toujours partante pour une session apprentissage de roller ou pour une partie de babyfoot) ; à Tristan pour son humour et son dynamisme très bien cachés ; à Marine pour ses incontournables blagues toujours très fines ; à l'ancien voisin fêtard Hugues ; à Gaëtan pour les bonnes soirées passées ensemble ; au piquant Vincent qui trouve toujours les bons mots pour me taquiner ; à la souriante Célia, à l'adorable Antoine, à la pétillante Clélia ; à Cléa pour ta gentillesse... et à tous les autres qui ont participé de près ou de loin à rendre le quotidien agréable.

Je tiens à remercier toute ma famille, et en particulier ma mère Chadia, mon beau-père Hilal, ma sœur Mounia, mon frère Adib, Mehdi, Ouidad et Antoine, Mouna et Najat et tous les autres, pour leur amour et leurs encouragements. Je souhaite tout particulièrement exprimer mon admiration à Amine pour son courage et sa force.

Merci à Evangéline, pour son soutien et toutes ses attentions qui ont rendu l'écriture de ma thèse bien plus agréable. Et surtout merci à toi Dimitra, tu as été la plus belle surprise de ma thèse, et aujourd'hui tout me semble évident quand tu es là.

Je dédie cette thèse à mon père,

Table des matières

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	8
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	9
I. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE DE PARKINSON	9
A. Aspects cliniques	9
B. Aspects thérapeutiques	10
C. Aspects anatomo-pathologiques	11
1. Corps de Lewy	11
2. Lésion DA	12
3. Lésions non-DA	12
II. MODELES EXPERIMENTAUX DE LA MP	14
A. La 6-OHDA	14
1. Mode d'action de la 6-OHDA	15
2. Différents modèles de lésion à la 6-OHDA chez le rat	16
B. Le MPTP	18
1. Mode d'action du MPTP	18
2. Le singe intoxiqué par le MPTP	20
III. SOUFFRANCE ET MORT NEURONALE DA	22
A. Activité électrique et mort neuronale	22
B. Nicotine, transmission cholinergique et maladie de Parkinson	24
C. Afférences excitatrices et mort neuronale	27
IV. LE NOYAU PEDONCULOPONTIN	28
A. Données anatomiques	28
1. Nomenclature et localisation anatomique	28
2. Composition neuronale	30
3. Connexions anatomiques	31
B. Rôles du PPN	36
1. Locomotion	36
2. Cycles veille/sommeil	38
V. MALADIE DE PARKINSON ET PPN	40
A. Perte des neurones cholinergiques	40
B. Activité électrique et métabolique des neurones du PPN	41
C. Troubles moteurs parkinsoniens et PPN	43
D. Stimulation du PPN à l'état parkinsonien	45
E. Impact d'une lésion du PPN sur la survie des neurones DA	47
VI. LE SYSTEME OREXINERGIQUE HYPOTHALAMIQUE	48
A. L'orexine	48
B. Données anatomiques	49
C. Rôles	52
VII. SYSTEME OREXINERGIQUE ET MALADIE DE PARKINSON	54
OBJECTIFS	55

AXE 1. SYSTEME CHOLINERGIQUE DU PPN ET VULNERABILITE DES NEURONES DA	56
I. Hypothèses et justifications de la méthodologie utilisée	56
II. Méthodologie	59
III. Résultats obtenus	64
A. Comparaison entre animaux contrôles et sham	64
B. Perte des neurones DA de la SNc de rats après lésion cholinergique bilatérale du PPN	64
C. Atrophie des neurones TH-positifs de la SNc de macaques après lésion cholinergique bilatérale	67
D. Perte des neurones cholinergiques du PPN après lésion DA chez le rat	68
E. Perte des neurones cholinergiques du PPN après lésion DA chez le macaque	71
F. Une double lésion, DA et cholinergique, induit une perte plus importante dans les deux systèmes chez le rat	71
G. Corrélation entre intensité de la perte DA dans la SNc et taux de dénervation cholinergique du PPN chez le rat	73
IV. Discussion	75
A. Une lésion cholinergique du PPN provoque une perte des neurones DA chez le rat et une atrophie des neurones DA chez le singe	75
B. Une lésion DA induit des modifications DA contralatérales	77
C. Mécanismes compensatoire dans le striatum pour palier la perte des fibres DA	77
D. Une lésion DA induit une perte des neurones cholinergiques du PPN	78
E. Une double lésion, cholinergique et DA, aggrave la perte neuronale dans les deux systèmes	82
V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	83
AXE 2. SYSTEME OREXINERGIQUE ET VULNERABILITE DES NEURONES DA....	87
I. Hypothèses et justifications de la méthodologie utilisée	87
II. Méthodologie	88
III. Principaux résultats obtenus	89
IV. Discussion et perspectives	90
Publication	92
REFERENCES	111
LISTE DES ABREVIATIONS	135
RESUME	137

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publication

Bensaid M, Tandé D, Fabre V, Michel PP, Hirsch EC, Francois C. Sparing of orexin-A and -B neurons in the hypothalamus and of orexin fibers in the substantia nigra of MPTP-treated macaques. *Eur J Neurosci*, 2014.

Publication en préparation

Bensaid M, Tandé D, Fabre V, Michel PP, Clark S, Hirsch EC, Francois C. Role of pedunculo pontine cholinergic neurons in the vulnerability of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease.

Communications

Bensaid M, Michel PP, Hirsch EC, Francois C. Role of pedunculo pontine cholinergic neurons in the vulnerability of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Society for Neurosciences, Washington, November 2014. Abstract

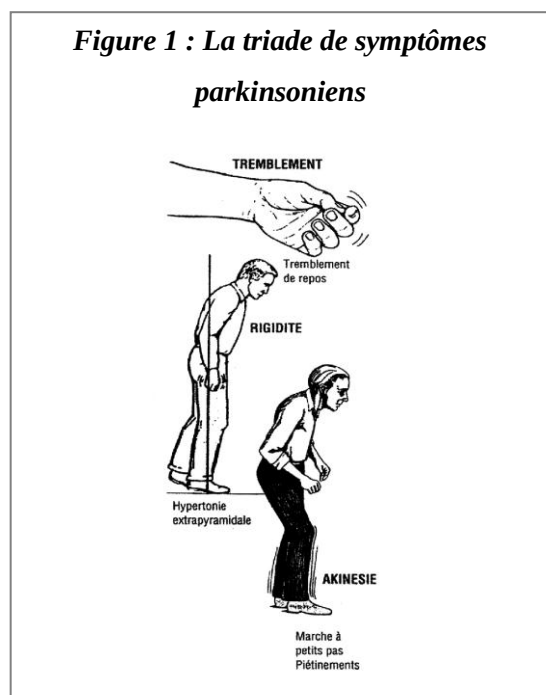
Bensaid M, Michel PP, Hirsch EC, Francois C. Role of pedunculo pontine cholinergic neurons in the vulnerability of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease. 9th *FENS* Forum of Neuroscience - *Milan* 2014 Abstract

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE DE PARKINSON

A. Aspects cliniques

La maladie de Parkinson (MP) est la seconde pathologie neurodégénérative liée à l'âge la plus répandue à travers le monde. Elle débute habituellement entre 45 et 70 ans. Sa prévalence, qui est de 0.3% de la population générale, augmente avec l'âge et atteint 1 à 2% chez les personnes de plus de 65 ans et 4 à 5% des plus de 85 ans. La majorité des cas sont sporadiques et 5% sont d'origines génétiques, généralement familiales. L'étiologie de la maladie reste obscure. Le mélange entre facteurs environnementaux, tels que l'exposition aux pesticides et/ou aux métaux lourds, et la prédisposition génétique sont des facteurs impliqués



dans le déclenchement de la maladie. Au niveau clinique, la MP se caractérise essentiellement par trois symptômes moteurs qui constituent ce qu'il est convenu d'appeler la triade parkinsonienne : l'akinésie, le tremblement de repos et la rigidité (Figure 1). D'autres atteintes motrices sont également présentes à un stade plus tardif de la maladie : l'instabilité posturale, les troubles de l'équilibre (Dubois 1993) amenant les patients à chuter (Koller et coll., 1989) ; ainsi que l'immobilisation soudaine, plus communément nommé « freezing » (Giladi et coll., 1992), qui est caractérisée par un piétinement apparaissant pendant la marche et plus particulièrement au

moment de son initiation.

La symptomatologie de la MP ne se résume pas à des troubles moteurs, des atteintes cognitives et psychiatriques sont également présentes (Charcot, 1872). Les patients parkinsoniens développent des changements d'humeur et des troubles de la personnalité (Huber et coll., 1990), des symptômes dépressifs (Fenelon 1997) et une démence. Un

dysfonctionnement cognitif a aussi été mis en évidence (Brown & Marsden 1988). Ces signes et symptômes en tant que tels ne sont pas spécifiques de la MP.

Les premiers signes cliniques moteurs n'apparaissent qu'après la perte d'une large part des neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire *pars compacta* (SNc) et après que la concentration en dopamine dans le striatum ait considérablement chuté (Agid & Blin 1987). Un des problèmes majeurs est la difficulté à déceler la maladie à un stade précoce. Il y a certes des symptômes prodromiques tels que l'anosmie (Doty et coll., 1988), les troubles de la digestion (Edwards et coll., 1991, Pfeiffer 2011) et les troubles du sommeil (Schrempf et coll., 2014). Malgré la recherche actuelle sur des marqueurs biologiques de la MP, ces symptômes prodromiques sont les seuls éléments reflétant un début de maladie neurodégénérative. Parmi les troubles du sommeil, les troubles du comportement en sommeil paradoxal (connus sous la dénomination de : Rapid Eye Movement Sleep (REM) Behavioral Disorders (RBD) en anglais) sont courants. Ils correspondent à une perte d'atonie musculaire pendant le sommeil paradoxal amenant les patients à avoir des comportements involontaires surprenants ou parfois violents pendant leurs rêves. Ce trouble se distingue du somnambulisme ou des terreurs nocturnes qui sont des troubles du sommeil lent profond tandis que les RBD se déclenchent spécifiquement pendant le sommeil paradoxal. Les patients souffrant de RBD ont un risque élevé de développer une maladie neurodégénérative, et en particulier la MP (Arnulf 2012).

Les symptômes non moteurs de la MP sont aujourd'hui de plus en plus étudiés et ils pourraient permettre une détection plus précoce de la pathologie. En effet, il existe un arsenal thérapeutique moins développé que pour le déficit DA.

B. Aspects thérapeutiques

Malgré l'absence de traitement curatif, les traitements symptomatiques actuels soulagent bien les troubles moteurs. La lévodopa (L-Dopa) reste le médicament de premier choix, son effet étant très rapide et spectaculaire. Cependant, la L-Dopa induit de nombreux effets secondaires à long terme, les patients souffrent alors de fluctuations motrices et de dyskinésies très invalidantes. De façon générale, d'autres traitements pharmacologiques sont combinés au traitement DA afin d'agir sur des systèmes non-dopaminergiques atteints dans la

MP. Les médecins ajustent la médication de chaque patient en fonction des symptômes (troubles du sommeil, somnolence diurne, dépression, démence, hyper- ou hypoactivité sexuelle, troubles de l'équilibre et de la posture...) afin d'obtenir la meilleure qualité de vie possible. D'autres approches thérapeutiques (*Figure 2*) sont maintenant utilisées, en complément ou non du traitement pharmacologique, telles que la stimulation cérébrale profonde, invasive mais efficace, ou encore la thérapie génique, également très invasive et dont les résultats préliminaires restent inconstants.

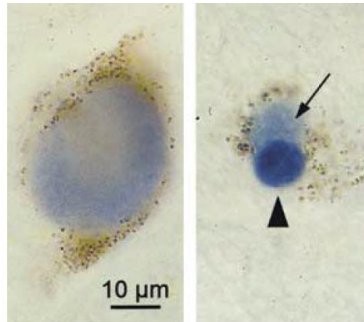
Il est aujourd'hui essentiel de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la mort de ces neurones pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

C. Aspects anatomo-pathologiques

1. Corps de Lewy

C'est en 1912 que Lewy décrit pour la première fois ces corps d'inclusion dans le *nucleus basalis* de Meynert de patients parkinsoniens. Ce même type d'inclusions observé dans la SNc de patients parkinsoniens fut nommé corps de Lewy par Tretiakoff (1919). Ce sont des inclusions neuronales éosinophiles avec un centre dense et un halo clair périphérique, composés de neurofilaments et de tubuline (*Figure 2*) (Gibb et coll., 1991). Ils sont observés dans des neurones de nombreuses structures dans tous les cas de MP, et leur présence est indispensable au diagnostic de la maladie. Cependant, jusqu'à ce jour leur implication dans les processus de neurodégénérescence n'a pas été clairement défini. Il a même été suggéré que les corps de Lewy ont un effet neuroprotecteur (Corti & Brice 2003).

Figure 2. Corps de Lewy, avec un centre dense (tête de flèche) et un halo clair périphérique (flèche). d'après Braak et coll., 2004.



2. Lésion DA

La certitude que le patient est effectivement atteint de la MP nécessite l'étude post-mortem de la SNc, structure la plus touchée dans la maladie. La perte de neurones DA y prédomine (atteignant jusqu'à 80%), induisant une diminution du taux de DA dans le striatum. La perte en DA est plus modérée au sein de l'aire tegmento-ventrale et de l'aire péri et rétro-rubrale (40 à 50%). Par contre, les neurones DA de la région périaqueducale (Hirsch et coll., 1988), de l'hypothalamus (Matzuk & Saper 1985) ainsi que les neurones DA qui projettent vers la moelle (Scatton et coll., 1986) semblent non affectés. Les symptômes moteurs de la maladie ne sont perceptibles que lorsque environ 50% des neurones DA ont dégénéré et lorsque la déplétion en dopamine dans le striatum est supérieure à 70-80% (Marsden 1990). Ce délai d'apparition des symptômes moteurs est dû, entre autre, à des mécanismes de compensation par les neurones DA sains restants (Reetz et coll., 2009).

3. Lésions non-DA

Il est désormais clairement établi que la MP ne se limite pas à l'atteinte des neurones DA de la SNc. De nombreux systèmes non-DA dans le cerveau et dans les organes

périphériques sont touchés par le processus pathologique de la maladie, mais moins sévèrement que les systèmes DA. Ainsi, les neurones noradrénergiques du *locus coeruleus* (Chan-Palay & Asan 1989, Gesi et coll., 2000, Mann et coll., 1983), les neurones adrénérgiques des régions C1 et C3 de la medulla oblongata (Gai et coll., 1993), les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé (Halliday et al., 1990), les neurones cholinergiques du *nucleus basalis* de Meynert (Arendt et coll., 1983, Mann et coll., 1983) et du noyau pédonculopontin (PPN) (Hirsch et coll., 1987, Zweig et coll., 1989b), les neurones orexinergiques de l'hypothalamus (Fronczek et coll., 2007, Thannickal et coll., 2007), les neurones glutamatergiques des noyaux parafasciculaire et centro-median du thalamus (Henderson et coll., 2000), mais aussi les neurones du cortex cérébral, du bulbe olfactif et des systèmes nerveux autonomes (Agid et coll., 1990) font partie des nombreux systèmes non-DA se retrouvant altérés dans cette pathologie.

Ces systèmes sont atteints de façon inconstante entre les patients et seraient responsables de la survenue des signes moteurs ou cognitifs associés au tableau clinique classique tels que les démences, la dépression, les troubles du sommeil et les dysfonctionnements du système nerveux autonome et seraient aussi responsable des symptômes moteurs résistants aux traitements DA que sont les troubles de marche et de la posture. Il est possible que ces pertes non-DA précèdent la perte DA mais la chronologie de dégénérescence n'est pas connue à ce jour. Braak et collaborateurs (2004) ont proposé une chronologie basée sur l'observation du stigmatisme histopathologique caractéristique de la MP que sont les corps de Lewy, et dont l'évolution serait caudo-rostrale (Braak et coll., 2004). Selon Braak, la MP évoluerait en 6 stades : les deux premiers, étant asymptomatiques et touchant particulièrement les noyaux olfactifs et le tronc cérébral inférieur (dont le *locus coeruleus* et la medulla oblongata), concordent avec les syndromes prodromiques que sont entre autres l'anosmie, les troubles du sommeil, les troubles digestifs et la dépression. A partir de l'étape 3 les symptômes moteurs apparaissent et les noyaux supérieurs du tronc (dont le PPN) sont affectés ainsi que le mésencéphale avec l'atteinte des neurones DA de la SNc. Au stade 4, d'autres structures sous-corticales, plus limbiques et associatives, telles que l'amygdale et l'hippocampe ainsi qu'une partie du cortex, sont atteintes. A ce stade les neurones DA de la SNc sont très sévèrement touchés et la triade des symptômes moteurs (akinésie, tremblement et rigidité) s'aggrave considérablement. Enfin dans les stades finaux 5 et 6, les lésions se propagent sur l'ensemble du cortex (cortex prémoteur, moteur, préfrontal...), toutes les structures cérébrales sont atteintes, et le tableau symptomatique clinique complet de la MP est visible.

II. MODELES EXPERIMENTAUX DE LA MP

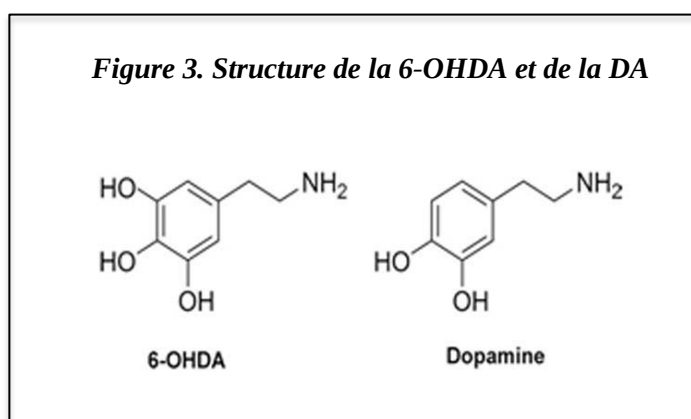
Aucune forme animale naturelle de maladie de Parkinson n'étant connue, le développement de modèles animaux de la maladie s'est avéré indispensable pour étudier les causes et conséquences de la maladie et pour mieux comprendre l'anatomie et la physiologie des systèmes impliqués dans la MP. Les modèles expérimentaux animaux de la MP idiopathique les plus utilisés et les mieux caractérisés sont : la souris et le singe intoxiqués par le 1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) et le rat lésé à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA). D'autres modèles ont été développés, à partir par exemple de mutations génétiques observées dans les formes familiales de MP. Aucun modèle n'est parfait, chacun présentant des avantages et des inconvénients, et il s'agira de choisir le modèle le mieux adapté selon les études (Beal 2001).

Nous ne détaillerons ici que les deux modèles animaux qui ont été développés afin de tester nos hypothèses de recherche, i) le rat avec une lésion unilatérale stéréotaxique intrastriatale de 6-OHDA et ii) le singe intoxiqué par le MPTP en systémique.

A. La 6-OHDA

La 6-OHDA est un analogue hydroxylé de la DA (*Figure 3*), captée spécifiquement par les transporteurs de la DA et de la noradrénaline. Une fois dans les neurones, la 6-OHDA, par un processus d'auto-oxydation, provoque des altérations structurales et fonctionnelles des protéines, lipides membranaires et acides nucléiques qui sont à l'origine d'un stress oxydatif.

La 6-OHDA a été le premier agent neurotoxique spécifique des neurones catécholaminergiques utilisé pour reproduire la MP chez l'animal (Ungerstedt 1968). La 6-OHDA ne passant pas la barrière hémato-encéphalique, la lésion doit être effectuée par injection intracérébrale.



1. Mode d'action de la 6-OHDA

La 6-OHDA est une toxine connue pour avoir un effet délétère sur les neurones catécholaminergiques par stress oxydatif (Abad et coll., 1995, Choi et coll., 1999, Decker et coll., 1993, Kumar et coll., 1995, Lotharius et coll., 1999, Perumal et coll., 1992, Perumal et coll., 1989) via une réaction non-enzymatique d'auto-oxydation (Heikkila & Cohen 1972a, Heikkila & Cohen 1972b, Soto-Otero et coll., 2000) qui génère des espèces très toxiques telles que le peroxyde d'hydrogène, des radicaux hydroxyles, des radicaux superoxydes (Cohen & Heikkila 1974) et des quinones (Saner & Thoenen 1971). D'ailleurs, les anti-oxydants ont des effets neuroprotecteurs vis à vis de la toxicité de la 6-OHDA (Blum et coll., 2000, Cadet et coll., 1989, Davison et coll., 1986, Mayo et coll., 1998, Yamada et coll., 1997). La production d'espèces réactives à l'oxygène (communément ROS, Reactive Oxygen Species en anglais) à partir de la 6-OHDA est issue de 2 principaux mécanismes i) la déamination par la monoamine oxydase (MAO) et ii) l'auto-oxydation. Ces réactions seraient initiées ou amplifiées par le fer qui catalyse la réaction de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^\circ + \text{Fe}^{3+}$). D'ailleurs, l'administration d'agents chélateurs du fer protégerait de la cytotoxicité de la 6-OHDA (Ben-Shachar et coll., 1991, Borisenko et coll., 2000). Il a été suggéré que la 6-OHDA aurait également un rôle délétère vis à vis des neurones DA via l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et que cet effet serait indépendant de la production de ROS (Glinka et coll., 1996, Glinka & Youdim 1995), mais ces résultats n'ont été obtenus que sur des mitochondries isolées de cellules nerveuses.

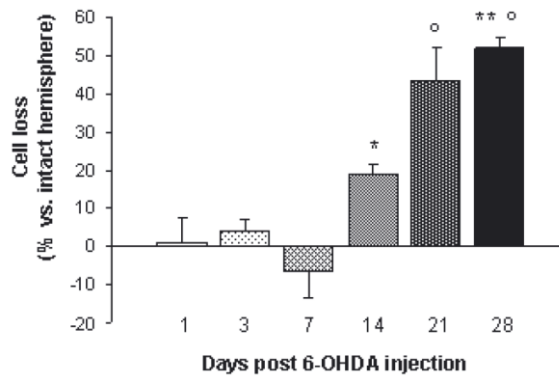
2. Différents modèles de lésion à la 6-OHDA chez le rat

La lésion des neurones DA nigraux est effectuée par injection intracérébrale stéréotaxique de 6-OHDA soit directement dans la SNc soit dans le faisceau basal (MFB, *medial forebrain bundle*), soit dans le striatum. L'injection de 6-OHDA dans la SNc ou dans le faisceau basal entraîne la destruction rapide (dès 24 heures) et durable des neurones DA. L'importance de la lésion dépend bien sûr de la quantité de 6-OHDA injectée mais dans la plupart des études, l'atteinte des neurones DA de la SNc est estimée à 80-95% après injection intranigrale, et atteint facilement 100% après injection dans le faisceau basal. Les neurones DA de l'aire tegmentale ventrale sont également touchés bien qu'à un moindre degré (environ 30%) (Deumens et coll., 2002). Les lésions à la 6-OHDA sont généralement effectuées de façon unilatérale car les lésions bilatérales entraînent une importante hypokinésie et un comportement aphagique qui nécessite le gavage des animaux (Ungerstedt 1968).

L'injection de 6-OHDA dans le striatum, en regard de nombreux critères physiopathologiques et comportementaux, semble être un meilleur modèle de la physiopathologie de la MP (Deumens et coll., 2002). En effet, une injection intrastriatale de 6-OHDA provoque une perte rétrograde progressive et modérée des neurones DA de la SNc (Ichitani et coll., 1991, Sauer & Oertel 1994) atteignant un pic de dégénérescence à 3 semaines post-injection (Blandini et coll., 2007) (*Figure 4*). La sévérité de la lésion dépend non seulement de la concentration et du volume de 6-OHDA injectée mais aussi de sa localisation (Kirik et coll., 1998).

Un autre avantage présenté par l'injection intrastriatale est de pouvoir réaliser une topographie lésionnelle des neurones nigrostriataux. C'est généralement la région dorso-latérale, sensorimotrice, du striatum qui est ciblée afin d'obtenir une perte DA nigrale sélective et davantage comparable à ce qui est observé chez les patients parkinsoniens. De plus, la lésion striatale, rétrograde et partielle, permet de réaliser plus facilement des lésions bilatérales que lorsque les injections ciblent la SNc ou le MFB. Du fait de sa facilité d'utilisation et de son faible coût, ce modèle permet de réaliser des études quantitatives nécessitant un grand nombre d'animaux.

Figure 4 : Perte progressive de neurones DA dans la SNc ipsilatérale à la lésion 6-OHDA striatale comparée à l'hémisphère intact. La perte est apparente après 14 jours et maximale après 28 jours. D'après Blandini et coll., 2007



Au niveau comportemental, les lésions unilatérales à la 6-OHDA provoquent chez les rats une asymétrie posturale (torsion de la tête) et une akinésie unilatérale. Ces troubles comportementaux sont perceptibles lorsque le taux de dopamine intrastriatal est diminué d'au moins 70% (Hefti et coll., 1980a, Zigmond & Stricker 1984). Les animaux présentent également des déficits de dextérité de leurs membres antérieurs lorsqu'ils doivent saisir des petits fragments de nourriture (Schwartz & Huston 1996). Un comportement de rotation par rapport au côté lésé peut être induit par administration d'amphétamine (Ungerstedt 1971) ou d'apomorphine (Ungerstedt 1968) afin d'estimer l'intensité de la lésion DA. L'apomorphine, agoniste DA direct, va se fixer en post-synaptique sur les récepteurs DA, surexprimés après lésion DA afin de compenser la perte en DA, et ainsi induire des rotations du côté controlatéral à la lésion DA. L'amphétamine, quant à elle, va agir en pré-synaptique sur les neurones DA en favorisant la libération de DA à partir des terminaisons du striatum, et induire la rotation des animaux du côté ipsilatéral à la lésion. L'amphétamine peut provoquer un comportement de rotation après une lésion DA modérée tandis que l'apomorphine induit une rotation des animaux que si la perte des neurones DA est massive (Hefti et coll., 1980b, Hudson et coll., 1993).

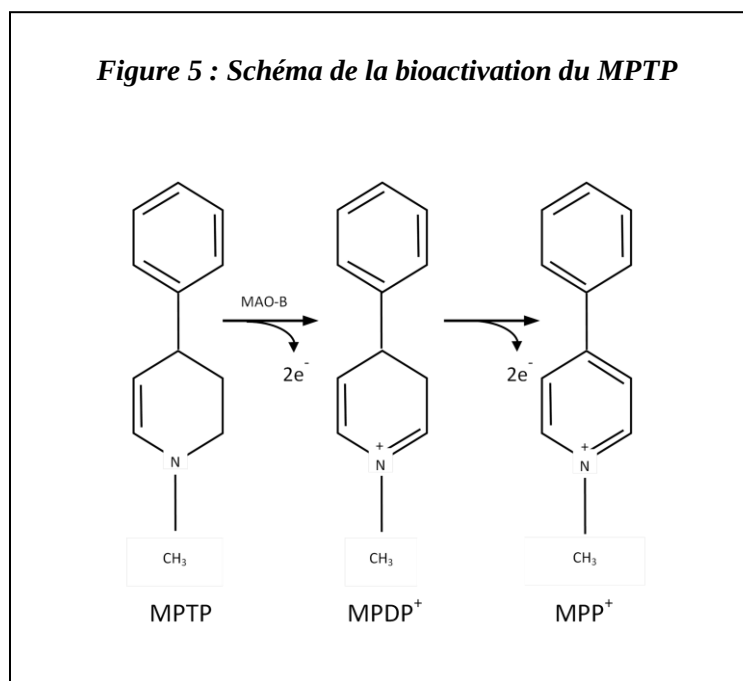
B. Le MPTP

La découverte du MPTP est une histoire intéressante et bien connue. En 1976, Un jeune étudiant californien de 23 ans voulant reproduire un opioïde similaire à l'héroïne et à la morphine synthétisa du MPPP (1-méthyl-4-phenyl-4-propionpiperidine). Lors du processus de synthèse du MPPP, du MPTP résiduel s'est formé accidentellement. En consommant cette drogue, l'étudiant et six camarades développèrent très rapidement les symptômes cardinaux de la MP (Davis et coll., 1979, Langston et coll., 1983, Langston & Ballard 1983). L'examen post-mortem de leurs cerveaux montra une perte des neurones DA de la SNc (Davis et coll., 1979, Langston et coll., 1999). Le MPTP fut alors utilisé afin d'obtenir chez l'animal un modèle de la MP (Langston & Ballard 1984, Langston et coll., 1984).

Le modèle d'intoxication par le MPTP est utilisé chez de nombreuses espèces telles que la souris, le singe, le chien, le chat, le mouton, le poisson, la grenouille, ou même le vers *C. elegans* (Kitamura et coll., 1998, Kopin 1987a, b). La sensibilité de ces différentes espèces vis-à-vis du MPTP varie. Les rongeurs sont moins sensibles que les primates, la quantité nécessaire pour intoxiquer une souris étant environ 30 fois supérieure à celle utilisée pour le singe. Le rat est, quant à lui, insensible au MPTP administré à la périphérie, probablement dû à l'activité importante de la monoamine oxydase de type B (MAO-B) dans l'endothélium des capillaires cérébraux qui métabolise le MPTP avant que celui-ci ne passe la barrière hémato-encéphalique (Schmidt & Ferger 2001). Chez le rat, le MPTP est généralement administré par voie intracérébrale directement dans le striatum. Le modèle d'intoxication par le MPTP est cependant plus souvent utilisé chez la souris et le singe.

1. Mode d'action du MPTP

Le MPTP n'est pas toxique en soit. Après avoir traversé la barrière hémato-encéphalique, il est converti en 1-méthyl-4-phenyl-1,2-dihydropyridinium (MPDP⁺) via la MAO-B (Chiba et coll., 1984, Markey et coll., 1984). La MAO-B est surtout présente dans les astrocytes (Di Monte et coll., 1991, Takada et coll., 1990) et les neurones sérotoninergiques (Levitt et coll., 1982) mais pas dans les neurones DA (Westlund et coll., 1985). Le MPDP⁺ s'oxyde ensuite spontanément en 1-méthyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) (Castagnoli et coll., 1985), qui est le composé neurotoxique (*Figure 5*).

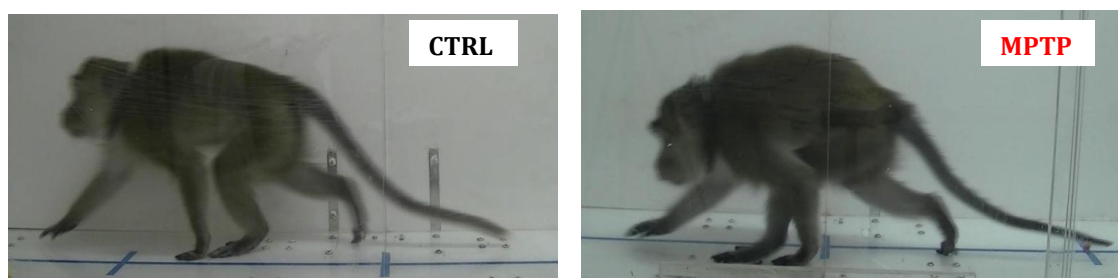
Figure 5 : Schéma de la bioactivation du MPTP

Différentes études ont montré que l'inhibition de la MAO-B prévenait la neurotoxicité due au MPTP (Cohen et coll., 1984, Markey et coll., 1984). Le MPP⁺ est ensuite libéré dans l'espace extracellulaire par l'intermédiaire de transporteurs des monoamines présents sur les cellules gliales (Russ et coll., 1996), puis capté au niveau des terminaisons DA via le transporteur membranaire de la dopamine (Javitch et coll., 1985). Le MPP⁺ peut ainsi être libéré lentement pour détruire les neurones DA (Schultz 1988). Une fois dans le cytosol, le MPP⁺ est soit : 1) séquestré dans des vésicules synaptique par l'intermédiaire du transporteur vésiculaire de la dopamine (VMAT, vesicular monoamine transporter) (Staal & Sonsalla 2000, Takahashi et coll., 1997) ; soit 2) complexé avec la neuromélanine retardant ainsi sa libération cytoplasmique (D'Amato et coll., 1987a, b, D'Amato et coll., 1987c, D'Amato et coll., 1986) ; soit 3) accumulé dans les mitochondries par transport actif (Ramsay & Singer 1986). C'est en bloquant le complexe I de la chaîne respiratoire de la mitochondrie et donc en diminuant les taux cellulaire d'ATP (Di Monte et coll., 1986) que le MPP⁺ induit sa neurotoxicité. Dans plusieurs études, il est suggéré que le MPTP pourrait produire des radicaux libres (Przedborski et coll., 2000, Rojas et coll., 2000, Zhang et coll., 2000) et que son effet serait plus complexe qu'un simple dysfonctionnement mitochondrial.

2. Le singe intoxiqué par le MPTP

Du fait de sa proximité phylogénétique avec l'homme, le singe est très utilisé dans les études anatomiques, physiologiques et comportementales. Sur le plan clinique, le singe intoxiqué par le MPTP présente tous les symptômes cardinaux de la maladie, que ce soit la rigidité, l'akinésie et la bradykinésie ainsi que les troubles posturaux avec une posture "voûtée" caractéristique (*Figure 6*), et des épisodes de "freezing" qui correspondent à des blocages en cours de mouvement. Le tremblement est plus inconstant et souvent qualifié d'attitude et d'action. Les animaux développent également des symptômes non-moteurs tels que des symptômes cognitifs (Schneider & Kovelowski 1990, Schneider & Pope-Coleman 1995) et des troubles du sommeil qui apparaissent, tout comme chez les patients parkinsoniens, en amont de l'apparition des symptômes moteurs (Barraud et coll., 2009, Belaid et coll., 2014). Les effets du MPTP dépendent de plusieurs paramètres dont le mode d'administration (intraveineux, intramusculaire, intrapéritonéale), le dosage, la fréquence des injections et l'âge des animaux (Porras et coll., 2012, Wichmann & DeLong 2003). Actuellement, de nombreuses équipes utilisent des protocoles d'intoxication « semi-chroniques » permettant d'obtenir un syndrome stable après 3 semaines à 2 mois d'intoxication.

Figure 6 : Position caractéristique d'un macaque après intoxication par le MPTP par rapport à l'état contrôle (Ctrl)



Le singe intoxiqué par le MPTP, dont les symptômes sont bien améliorés par les traitements actuels antiparkinsoniens tels que la L-Dopa (Burns et coll., 1983), reste le modèle de référence pour tester et développer les nouveaux traitements thérapeutiques. Au plan anatomopathologique, la perte DA du système nigro-striatal est très similaire à celle retrouvée chez les patients parkinsoniens, avec une atteinte préférentielle des neurones DA de la SNc (aire A9) et une atteinte moindre des aires tegmento-ventrale (aire A10) et péri-rétro-rubrale (aire A8) (German et coll., 1988, Varastet et coll., 1994). De plus, l'intoxication par le MPTP induit une neuroinflammation dans le cerveau de singes similaire à celle des patients parkinsoniens, avec une activation microgliale retrouvée 1 an après intoxication par le MPTP (Barcia et coll., 2013).

Le rat avec une lésion DA unilatérale striatale à la 6-OHDA et le singe intoxiqué par le MPTP sont de bons modèles de la MP et sont largement utilisés et documentés dans la littérature.

III. SOUFFRANCE ET MORT NEURONALE DA

A. Activité électrique et mort neuronale

De nombreuses études ont été réalisées pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la mort des neurones DA dans la MP. Ainsi, différents mécanismes ont été évoqués et en particulier le rôle de l'apoptose, d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, d'un stress oxydatif (probablement en lien avec le déficit mitochondrial) (Dauer & Przedborski 2003) et de mécanismes neuro-inflammatoires, entretenant le mécanisme neurodégénératif primaire (Hirsch & Hunot 2009). Il est d'ailleurs probable que certains de ces processus dégénératifs opèrent en synergie, aucune cause unique n'ayant pu être mise en évidence à ce jour. Toutefois, une autre hypothèse a vu le jour plus récemment, liant la mort neuronale DA à un dysfonctionnement électrique, entraînant lui-même une dys-homéostasie cellulaire d'installation progressive et délétère (Benabid et coll., 2003, Chan et coll., 2007, Michel et coll., 2007). En effet, les neurones DA de la SNc génèrent une activité électrique singulière, activité pacemaker autonome (c'est-à-dire non-dépendante d'afférences excitatrices) (Grace & Bunney 1984), qui pourrait les rendre spécifiquement vulnérables. Le rôle des afférences excitatrices est de convertir cette activité de base en un pattern de décharge en « bursts » afin d'optimiser la libération de DA au niveau des zones de projection striatales (Gonon & Buda 1985, Grillner & Mercuri 2002).

L'hypothèse dominante veut que le dysfonctionnement électrique résulte d'un excès d'activité ou d'excitabilité des neurones DA. Il pourrait s'agir, notamment, d'un phénomène d'excitotoxicité initié par une sur-stimulation des récepteurs NMDA au glutamate des neurones DA (Assous et coll., 2014). Cet excès de stimulation serait la conséquence d'une cascade de perturbations fonctionnelles au sein des ganglions de la base, notamment au niveau du noyau subthalamique qui devient hyperactif dans les conditions physiopathologiques de la MP (Benabid et coll., 2003, Charles et coll., 2008). L'emballement métabolique des neurones DA pourrait être également lié à leur activité pacemaker mettant en jeu un sous-type particulier de canal calcique voltage-dépendent de type L. En effet dans des conditions pathologiques, ce canal calcique va induire une augmentation du calcium

intracellulaire, entraînant ainsi un stress mitochondrial oxydant pouvant devenir progressivement délétère pour les neurones DA (Guzman et coll., 2010). Cette augmentation de calcium cytosolique aurait un effet d'autant plus néfaste que ces neurones ont une faible capacité de tamponnage du calcium intracellulaire (Gaspar et coll., 1994). L'un des arguments en faveur de cette hypothèse est que l'isradipine, bloqueur assez spécifique des canaux calciques voltage-dépendent, empêche le stress mitochondrial, induisant ainsi une protection des neurones DA dans certains modèles animaux de maladie de Parkinson (Surmeier et coll., 2012).

Toutefois, il a aussi été suggéré qu'un déficit d'activité pouvait être tout aussi délétère pour les neurones DA (Michel et coll., 2007, Salthun-Lassalle et coll., 2004). En effet, plusieurs études ont révélé qu'une dépolarisation modérée des neurones DA augmente leur survie dans des cultures primaires de mésencéphale de rat ou de souris (Salthun-Lassalle et coll., 2004, Toulorge et coll., 2011) ou dans des tranches de mésencéphale obtenues à partir de cerveaux de rongeurs nouveau-nés (Katsuki et coll., 2003, Katsuki et coll., 2001). Ainsi, l'activation modérée des canaux sodiques de type L, par élévation des concentrations de potassium extracellulaire, dépolarise et protège les neurones DA *in vitro* (Douhou et coll., 2001, Mourlevat et coll., 2003). D'autre part, différents agents dépolarisants tels que la vératridine, agoniste des canaux sodiques voltage-dépendants, ou des bloqueurs à spectre large des canaux potassiques, comme le TEA (tetraéthyl ammonium) et la 4-aminopyridine, ou des bloqueurs plus spécifiques comme l'apamine qui bloque les canaux SK canaux sensibles au calcium cytosolique, sont protecteurs vis-à-vis des neurones DA *in vitro* (Salthun-Lassalle et coll., 2004). Dans le cas de l'apamine, des effets protecteurs ont aussi été observés dans un modèle chronique de la MP par intoxication de souris au MPTP (Alvarez-Fischer et coll., 2013). D'autres études ont montré qu'un agent comme la nicotine est non seulement protecteur dans des modèles cellulaires (Toulorge et coll., 2011) mais aussi dans des modèles animaux de MP (Quik et coll., 2007, Quik et coll., 2014).

Le mécanisme commun qui lie tous ces agents pharmacologiques est leur action dépolarisante vis-à-vis des neurones DA et leur propension à augmenter les niveaux de base en calcium cytosolique.

B. Nicotine, transmission cholinergique et maladie de Parkinson

L'intérêt pour les effets protecteurs de la nicotine s'est développé, notamment au regard des résultats d'analyses épidémiologiques montrant que les fumeurs ont un risque diminué de 60% de développer la MP (Hernan et coll., 2002) et que les parkinsoniens fumeurs ont moins de complications motrices (De Reuck et coll., 2005). Certes, les fumeurs n'inhalent pas que de la nicotine, mais cet alcaloïde est le composant majoritaire de la cigarette. De manière intéressante, des effets neuroprotecteurs de la nicotine ont été mis en évidence chez des rats lésés à la 6-OHDA (Costa et coll., 2001, Huang et coll., 2009, Ryan et coll., 2001, Visanji et coll., 2006), des souris intoxiquées par le MPTP (Parain et coll., 2003, Parain et coll., 2001) ou encore chez des singes intoxiqués par le MPTP (Huang et coll., 2009, Quik et coll., 2006) confortant l'idée que la nicotine pourrait aussi exercer un effet de survie vis-à-vis des neurones DA chez l'homme.

Concernant les effets de la nicotine, ceux-ci semblent particulièrement dépendants du niveau d'excitabilité des neurones DA, et notamment des niveaux de calcium cytosolique (Toulorge et coll., 2011). En effet, la nicotine seule n'a pas d'effets neuroprotecteurs, mais son potentiel neuroprotecteur est révélé quand elle est combinée à un agent dépolarisant comme le TEA (*Figure 7*). D'ailleurs, dans des cultures primaires de mésencéphale, l'application d'antagonistes des récepteurs nicotiques et plus spécifiquement du sous-type $\alpha 7$ empêche la neuroprotection des neurones DA médiée par la nicotine (Toulorge et coll., 2011).

La dépolarisation des neurones va permettre l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant, ce qui augmente le calcium intracellulaire rendant ainsi les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine $\alpha 7$ sensibles à la nicotine. L'activation de ces récepteurs conduit à l'ouverture des canaux sodiques et calciques de type-T voltage dépendants, amplifiant ainsi l'augmentation de calcium intracellulaire. La combinaison de la dépolarisation et de la nicotine permet une augmentation optimale de calcium cytosolique qui pourrait activer la calmoduline kinase (CaM) qui, à son tour, active la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), cette dernière phosphorylant la protéine pro-survie Akt (*Figure 8*) (Toulorge et coll., 2011).

Figure 7. Effet neuroprotecteur de la nicotine (NIC) vis-à-vis des neurones DA, révélé par le TEA (tetraéthyl ammonium) (Toulorge et coll., 2011). Evolution du nombre de neurones TH au cours du temps (DIV : jours in vitro), suite aux différents traitements mentionnés dans la figure, et qui sont appliqués, de manière chronique, à des cultures primaires de mésencéphale de rat.

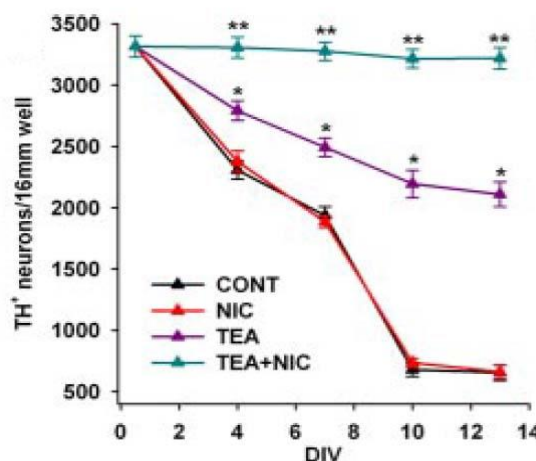


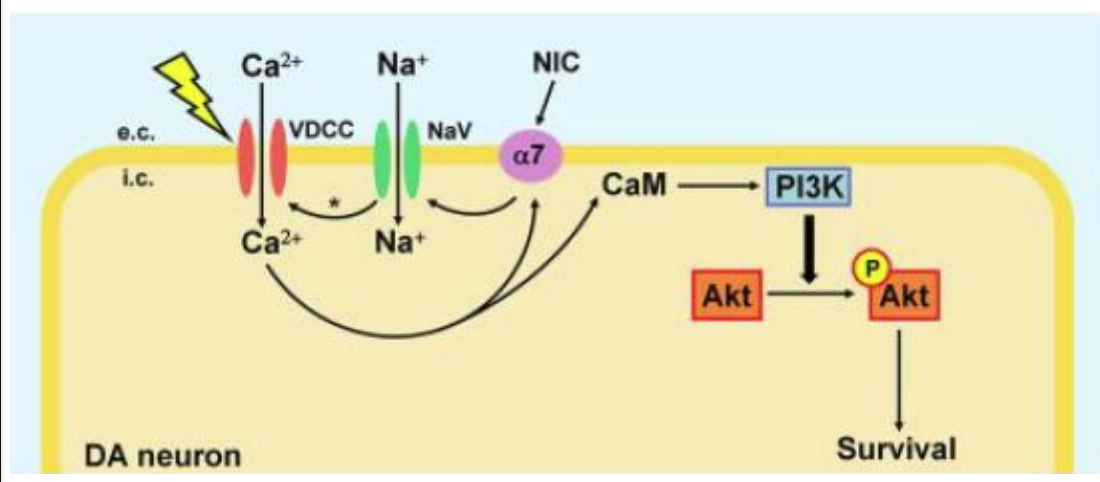
Figure 8. Mécanismes de survie qui pourraient être mis en jeu par la nicotine suite à une dépolarisation préalable des neurones DA de la SNc (Toulorge et coll., 2011)

Ca^{2+} : Calcium ; VDCC : Canaux calciques voltage dépendent ;

Na^{+} : Sodium ; NaV : canaux sodiques voltage dépendent ;

$\alpha 7$: récepteur nicotinique à l'acétylcholine $\alpha 7$; NIC : Nicotine ;

CaM : Calmoduline kinase ; PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase phosphatidylinositol-3-kinase ; Akt : protéine kinase B



La nicotine est l'agoniste préférentiel des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine. Ces récepteurs sont présents sur les neurones DA. Il s'agit notamment des récepteurs hétéropentamériques $\alpha 4\beta 2$ et homopentamériques $\alpha 7$ (Livingstone & Wonnacott 2009, Mameli-Engvall et coll., 2006). La stimulation des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine des neurones DA de la SNc par la nicotine augmente le taux de décharge ainsi que la libération de DA dans le striatum (Grenhoff et coll., 1986, Lichtensteiger et coll., 1982). De même, la stimulation électrique du PPN, l'afférence cholinergique excitatrice principale de la SNc, augmente la libération de DA dans le striatum (Forster & Blaha 2003). Dans cette même étude, lorsque la stimulation du PPN est combinée à l'administration intra-nigrale d'un antagoniste non spécifique des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine, la mécamylamine, l'augmentation en DA striatale est atténuée, confirmant la mise en jeu des récepteurs à la nicotine dans cet effet.

On peut alors imaginer que la nicotine exerce son effet protecteur chez le fumeur en mimant les effets dépolarisants physiologiques de l'acétylcholine (Michel et coll., 2013) qui disparaissent progressivement chez le sujet parkinsonien, du fait d'une lésion des neurones cholinergiques du noyau pédonculopontin, concomitante à celle des neurones DA de la SNc (Karachi et coll., 2010). Des essais cliniques sur des patients traités par des patchs, des injections transdermiques ou des "chewing-gum" de nicotine n'ont malheureusement pas été concluants (Clemens et coll., 1995, Ebersbach et coll., 1999, Fagerstrom et coll., 1994, Hanagasi et coll., 2007, Ishikawa & Miyatake 1993, Kelton et coll., 2000, Lemay et coll., 2004, Mitsuoka et coll., 2002, Vieregge et coll., 2001, Villafane et coll., 2007). Néanmoins, on peut imaginer que cette intervention est peut-être trop tardive, car les patients présentant les symptômes cliniques de la maladie ont déjà une perte neuronale importante rendant le traitement pharmacologique peu efficace.

L'ensemble de ces données expérimentales et cliniques nous amène à nous intéresser aux afférences excitatrices de la SNc provenant du tronc cérébral et tout particulièrement aux afférences cholinergiques.

C. Afférences excitatrices et mort neuronale

Les neurones DA reçoivent des afférences excitatrices en provenance de différentes régions cérébrales. La structure excitatrice majeure, cholinergique et glutamatergique, de la SNc est le PPN (les connexions anatomiques du PPN seront détaillées dans la partie suivante IV-A-3). Dans ce sens, les données de la littérature suggèrent un lien fort entre les systèmes cholinergique du PPN et DA de la SNc. Ainsi, une perte de neurones cholinergiques du PPN a été décrite sur des tissus humains de patients parkinsoniens (Hirsch et coll., 1987, Jellinger 1988), et leur degré de dégénérescence est corrélé à l'importance de la perte DA (Zweig et coll., 1989a).

Les neurones DA reçoivent aussi des afférences excitatrices en provenance du noyau subthalamique et du cortex (Parent & Hazrati 1995a, b). Pour notre étude, nous nous sommes intéressés à une autre afférence en provenance des neurones orexinergiques de l'hypothalamus. En effet, les neurones à orexine dégénèrent également dans la physiopathologie de la MP (Fronczek et coll., 2007, Thannickal et coll., 2007), et jouent un rôle dans la régulation des cycles veille/sommeil, perturbés à l'état parkinsonien.

Nous ne détaillerons ici que 2 afférences excitatrices des neurones DA de la SNc : l'afférence cholinergique en provenance du PPN et l'afférence orexinergique en provenance de l'hypothalamus.

IV. LE NOYAU PEDUNCULOPONTIN

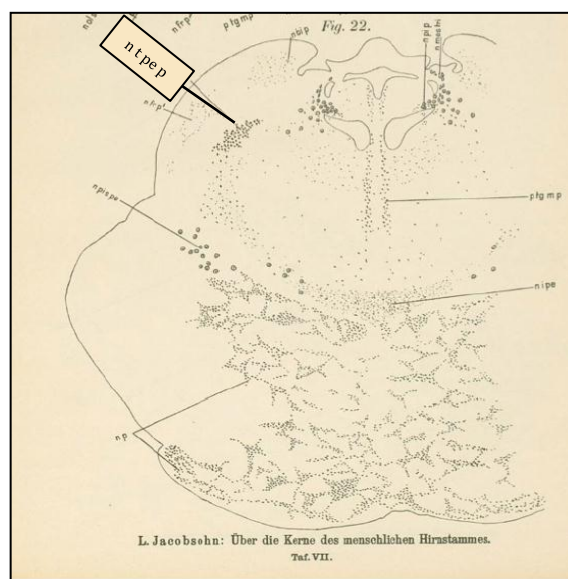
A. Données anatomiques

1. Nomenclature et localisation anatomique

En 1909 apparaît la première description du PPN par Jacobsohn. Dans son atlas Jacobsohn emploie la dénomination de *nucleus tegmenti pedunculopontinus* (Figure 9), repris ensuite en 1943 dans l'atlas de Riley. Plusieurs termes ont par la suite été utilisés pour décrire le PPN tels que *nucleus tegmenti pedunculopontinus* ou *nucleus tegmentosus pedunculopontinus* (Olszewski et Baxter, 1954, 1982 ; Schaltenbrand et Wahren, 1978) ou encore *pedunculopontine tegmental nucleus* (Paxinos et Huang, 1995), *nucleus reticularis pedunculopontinus* (Naidich et coll., 2007), *pedunculopontine nucleus* et *nucleus pedunculopontinus* (Nieuwenhuys et coll., 2007). Mais les termes les plus couramment utilisés restent *pedunculopontine nucleus* (PPN) et *pedunculopontine tegmental nucleus* (PPTg ou PPTn).

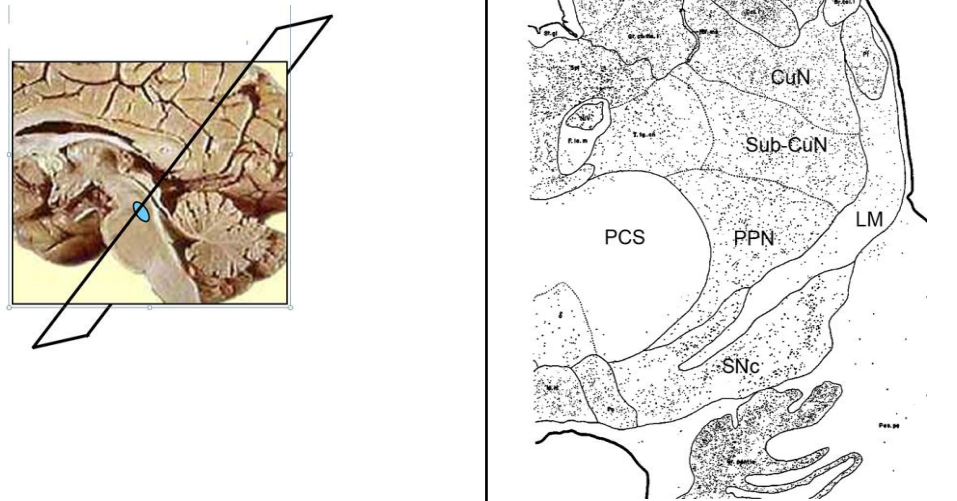
Figure 9 : Planche de l'atlas de L. Jacobsohn (1909).

Le PPN est identifié par “n t p e p - nucleus tegmenti pedunculopontinus



Anatomiquement, le PPN est une structure située dans le tronc cérébral faisant partie de la formation réticulée mésencéphalique, et dont la délimitation précise reste controversée (Alam et coll., 2011, Inglis & Winn 1995, Martinez-Gonzalez et coll., 2011, Mena-Segovia et coll., 2009, Rye et coll., 1987). Le PPN est délimité au niveau rostral par la substance noire et le noyau rouge, au niveau caudal par le locus coeruleus, au niveau dorsal par le noyau cunéiforme et au niveau ventral par les noyaux du pons. Latéralement le PPN est délimité par le lemnisque median et médialement par le pédoncule cérébelleux supérieur ou brachium conjonctivum (Edley & Graybiel 1983, Geula et coll., 1993, Lavoie & Parent 1994c) (Olszewski et Baxter, 1954, 1982) (*Figure 10*).

Figure 10. *Atlas du tronc cérébral humain d'après Olszewski et Baxter (1982). CuN : noyau cunéiforme; Sub-CuN : noyau sub-cunéiforme; PCS : pédoncule supérieur cérébelleux ; LM: medial lemniscus.*



2. Composition neuronale

Le PPN est composé de populations neuronales diverses qui se caractérisent par la présence de nombreux neurones cholinergiques, glutamatergiques mais également GABAergiques. Deux sous-structures ont été établies sur la base de la densité cellulaire : la *pars compacta* (PPNc) et la *pars dissipata* (PPNd) (Olszewski and Baxter, 1954), cette démarcation étant plus nette chez l'homme que dans d'autres espèces. Le PPNc est principalement composé de larges neurones cholinergiques (80-90%) (Mesulam et coll., 1989, Mesulam et coll., 1984) tandis que le PPNd est caractérisé par la présence des 3 sous-populations neuronales : cholinergiques (25-75%) glutamatergiques et GABAergiques (Clements & Grant 1990, Ford et coll., 1995, Lavoie & Parent 1994b, Mena-Segovia et coll., 2009, Mesulam et coll., 1989). Les neurones cholinergiques du PPN sont associés au groupe cholinergique CH5 (Mesulam et coll., 1984).

La composition neuronale du PPN est en réalité plus complexe. En effet, 40% des neurones cholinergiques du PPN co-expriment le glutamate chez le singe écureuil (Lavoie & Parent 1994b) proportion qui semble plus faible chez le rongeur (Wang & Morales 2009). La co-expression de l'acétylcholine avec du GABA (Charara et coll., 1996) , de l'oxyde nitrique (Vincent et coll., 1986) ou encore de la substance P (Vincent et coll., 1983) a également été décrite.

Bien que les différentes populations neuronales semblent distribuées de manière hétérogène dans le PPNd, une topographie a pu être établie chez les rongeurs. Les neurones cholinergiques et glutamatergiques semblent distribués selon un gradient positif rostro-caudal. Inversement, les neurones GABAergiques sont plus concentrés dans la partie rostrale du noyau (Martinez-Gonzalez et coll., 2012, Mena-Segovia et coll., 2009). Cependant, les populations neuronales glutamatergiques et GABAergiques du PPN étant dispersées dans l'ensemble de la formation réticulée du mésencéphale, la délimitation du PPN reste une source de confusions et de controverses, malgré la présence bien délimitée de neurones cholinergiques (Lavoie & Parent 1994b).

En dehors de la diversité des neurones du PPN en fonction de leurs propriétés neurochimiques, il existe une variété de propriétés électrophysiologiques. Différentes classifications des neurones du PPN ont été établies, *in vitro*, en fonction de différents paramètres : selon leurs propriétés membranaires (Kamondi et coll., 1992, Kang & Kitai 1990), la largeur de leurs potentiels d'action (Takakusaki et coll., 1997), leurs patrons de

décharge en bouffées (bursting), sans bouffées et toniques (non-bursting) (Kang & Kitai 1990). D'autres études électrophysiologiques *in vivo*, chez le rat et le chat décérébré, ont identifié deux types de neurones, ceux qui déchargent à faible fréquence avec une longue durée des potentiels d'action et ceux qui déchargent à haute fréquence et dont la durée des potentiels d'action est courte (Garcia-Rill & Skinner 1988, Granata & Kitai 1991, Scarnati et coll., 1987). Chez le singe *in vivo*, Matsumura et coll., 1997 retrouvent également ces différentes propriétés électriques sans faire de classification (Matsumura et coll., 1997). De toutes ces études électrophysiologiques, *in vivo* et *in vitro*, en intra- ou extracellulaire, 3 profils principaux de neurones ressortent. Les neurones de types I ont des potentiels d'action rapides et étroits en bouffées. Ce sont les neurones dits « bursting » avec un patron de décharge phasique. Ces neurones sont dispersés dans tout le PPN et sont capables de décharger en bouffées en réponse à une afférence excitatrice, mais aussi juste après une stimulation inhibitrice ; ils correspondraient aux neurones non-cholinergiques (Takakusaki et coll., 1996). Les neurones de types II déchargent quant à eux de manière spontanée et régulière, avec de larges potentiels d'action. Ces neurones ont un patron de décharge tonique et sont principalement distribués dans la partie rostrale et médiale du PPN, associés principalement aux neurones cholinergiques (Takakusaki et coll., 1996). Enfin les neurones de type III possèdent les caractéristiques des deux autres types et possèdent un patron de décharge irrégulier.

Malgré la petite taille du PPN, il existe une diversité neuronale que ce soit via les propriétés neurochimiques ou via les propriétés électriques et membranaires, amplifiant ainsi les variétés de réponses et d'intégrations possible.

3. Connexions anatomiques

L'étude de la connectivité du PPN a été largement étudiée dans différentes espèces animales. Nous présenterons ici un résumé de ces connexions (*Figure 11*) et détaillerons plus spécifiquement la projection du PPN sur les neurones DA de la SNc.

a) Afférences

Il existe des interconnexions très fortes entre le système des ganglions de la base et le PPN, même si compte tenu de la difficulté à dessiner les limites du PPN, il est nécessaire d'observer certaines précautions dans l'interprétation de différentes études. Le PPN reçoit ainsi des projections inhibitrices GABAergiques du globus pallidus interne chez le primate, ou noyau entopendunculaire chez les rongeurs, et de la SN *pars reticulata* (Filion & Harnois 1978, Granata & Kitai 1991, Grofova & Zhou 1998, Harnois & Filion 1980, 1982, Noda & Oka 1984, 1986, Parent 1990, Parent & De Bellefeuille 1982, Spann & Grofova 1991, 1992, Steininger et coll., 1992), plus faiblement du striatum (Winn et coll., 1997) et des projections excitatrices glutamatergiques du noyau subthalamique (Granata & Kitai 1989, Hammond et coll., 1983, Jackson & Crossman 1983, Kita & Kitai 1987, Steininger et coll., 1992). Les terminaisons GABAergiques projettent préférentiellement sur les neurones non-cholinergiques du PPN (Edley & Graybiel 1983, Grofova & Zhou 1998, Shink et coll., 1997, Spann & Grofova 1991). Il existe également une innervation en provenance de la SNc mais elle est relativement faible (Rolland et coll., 2009).

Une autre source excitatrice des neurones du PPN provient des aires corticales motrices (primaires, aire motrice supplémentaire) qui convergent sur la région du PPN (Aravamuthan et coll., 2007, Edley & Graybiel 1983, Matsumura et coll., 2000, Monakow et coll., 1979). Citons également des afférences en provenance du cervelet (Hazrati & Parent 1992), des noyaux du raphé, du locus coeruleus (Martinez-Gonzalez et coll., 2011, Semba & Fibiger 1992), et de la moelle épinière (Craig 1995, Grunberg et coll., 1992, Hylden et coll., 1985). Enfin, le PPN reçoit des afférences orexinergiques en provenance de la partie postérieure et latérale de l'hypothalamus.

b) Efférences

Les efférences du PPN s'organisent selon des projections ascendantes et descendantes mais certaines de ces projections sont à la fois ascendantes et descendantes (Rye et coll., 1987, Spann & Grofova 1991). Les projections descendantes du PPN atteignent différents noyaux de la formation réticulée ponto-médullaire à l'origine du tractus réticulo-spinal (Sakai

et coll., 2009), mais également la moelle épinière (Garcia-Rill & Skinner 1987b, Rolland et coll., 2011).

La principale projection ascendante atteint les noyaux périthalamique et intralaminaires du thalamus, et tout particulièrement les noyaux intralaminaires postérieurs (centre-médian et parafasciculaire) (Hallanger et coll., 1987, Lavoie & Parent 1994c, Pare et coll., 1988, Rye et coll., 1987, Steriade et coll., 1988). Cette voie est principalement cholinergique et forme un des aspects majeurs du « système activateur réticulé ascendant » influençant le cortex via l'innervation au thalamus.

Figure 10. Principales afférences et efférences du PPN

Afférences excitatrices : Glu : Glutamate ; DA : Dopamine ; Orexine ;

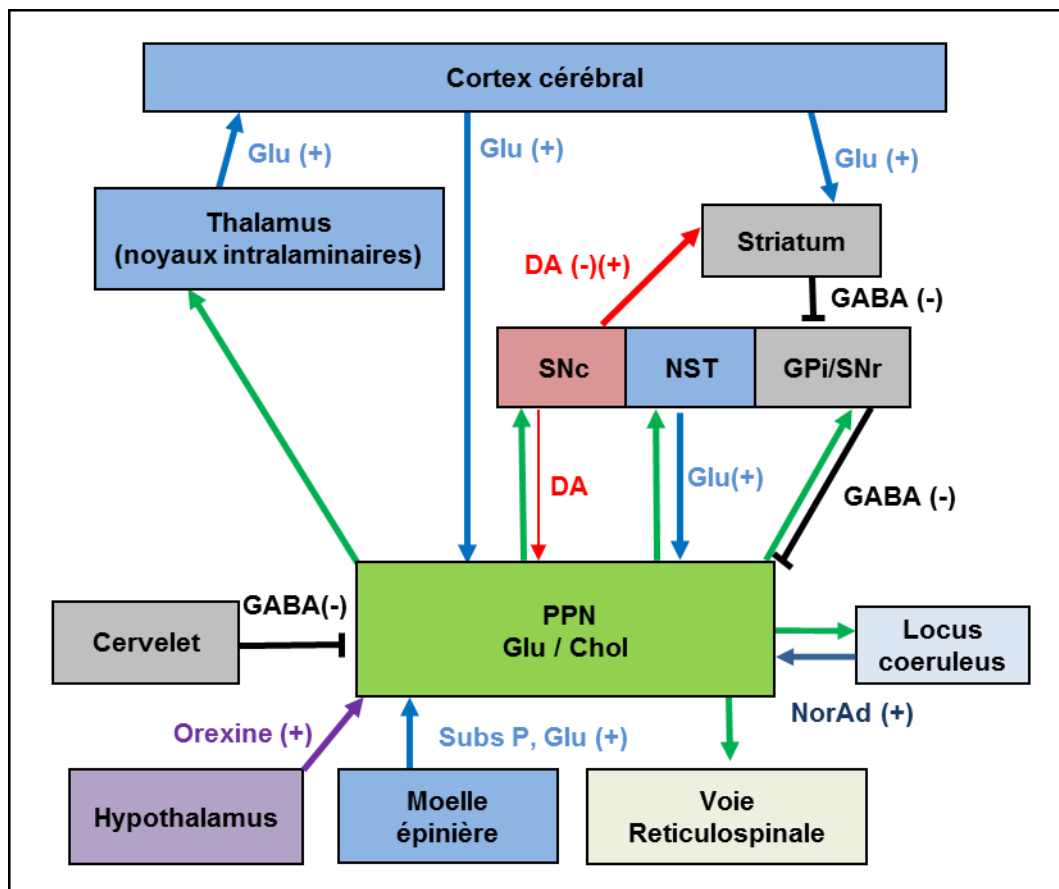
Subs P : Substance P ; NorAd : Noradrénaline

Afférences inhibitrices : GABA

Efférences : Chol : Acétylcholine ; Glutamate

SNc : Substance noire pars compacta ; NST : Noyau Subthalamique ;

GPi : Globus Pallidus interne ; SNr : Substance noire pars reticulata



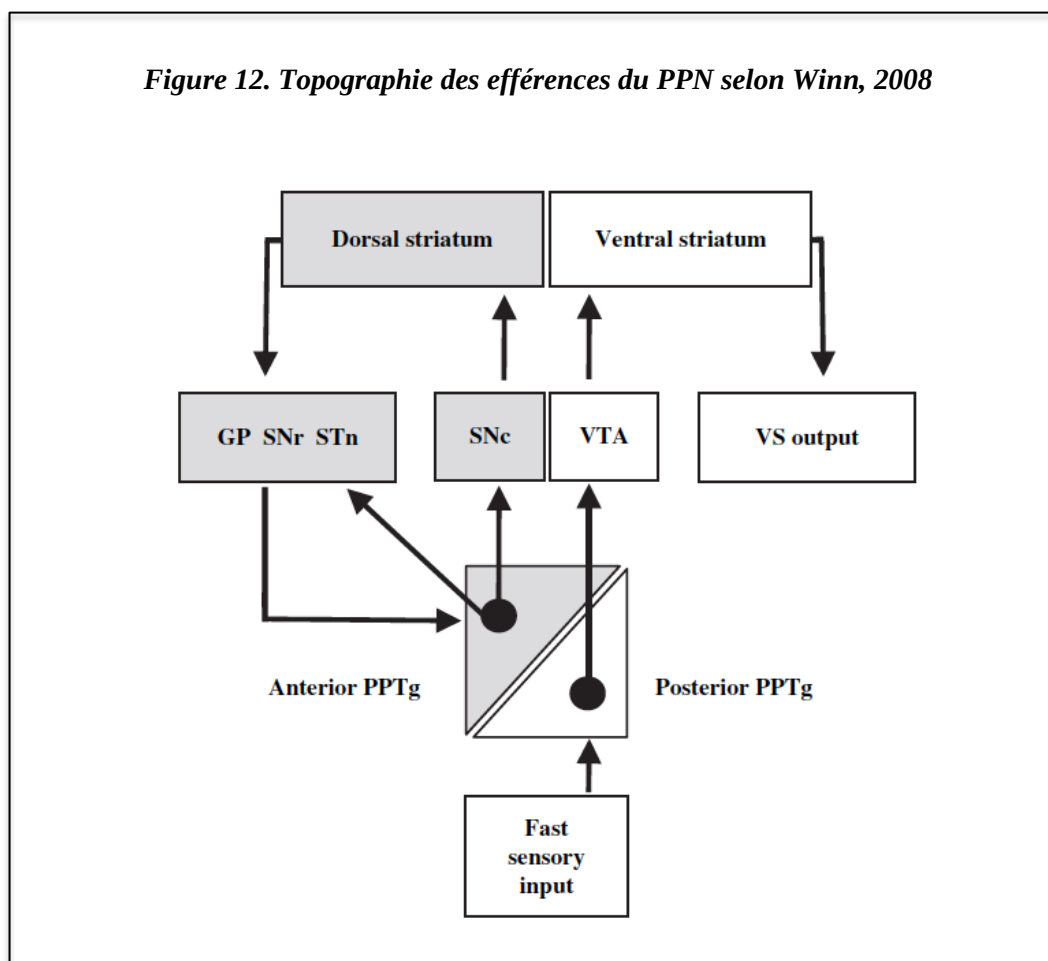
Le PPN innervé également l'ensemble des structures des ganglions de la base, incluant le noyau subthalamique (Bevan & Bolam 1995, Edley & Graybiel 1983, Lavoie & Parent 1994c, Woolf & Butcher 1986), le globus pallidus interne ou noyau entopédonculaire (Lavoie & Parent 1994c), la SNc (Charara et coll., 1996, Kitai et coll., 1999, Takakusaki et coll., 1996), la SN *pars reticulata* (Rohrbacher et coll., 2000), et dans une plus faible mesure le striatum (Dautan et coll., 2014).

Soulignons que les neurones du PPN projettent sur les structures controlatérales des ganglions de la base (Clarke et coll., 1996, Gerfen et coll., 1982, Lavoie & Parent 1994c). Ces projections bilatérales seraient moindres mais conséquentes sur le thalamus et la SNc, (Jackson & Crossman 1983, Lavoie & Parent 1994c, Steriade et coll., 1988). D'après les données électrophysiologiques obtenues chez le rat, Breit et coll., en 2008, suggèrent qu'une lésion du PPN induit un changement d'activité du noyau subthalamique et de la SN *pars reticulata* de l'hémisphère controlatéral à la lésion mais également du PPN controlatéral (Breit et coll., 2008). Lors d'un mouvement programmé d'un membre supérieur chez le singe, un changement d'activité des neurones du PPN ipsi- et controlatéraux au membre a été décrit (Matsumura et coll., 1997).

La principale source excitatrice des neurones DA de la SNc provient du PPN (Beninato & Spencer 1988, Gould et coll., 1989). La projection cholinergique a été très largement montrée chez de nombreuses espèces animales (Jackson & Crossman 1983, Lavoie & Parent 1994a, Parent & De Bellefeuille 1983, Saper & Loewy 1982, Scarnati et coll., 1984). Les projections sont aussi glutamatergiques (Di Loreto et coll., 1992, Futami et coll., 1995, Lavoie & Parent 1994a, Scarnati et coll., 1986, Sugimoto & Hattori 1984) et selon Charara et coll., 1996, le PPN est également source d'afférences inhibitrices GABAergiques sur la SNc de primate (Charara et coll., 1996). Les axones forment des contacts synaptiques asymétriques sur les dendrites proximales et les corps cellulaires des neurones DA (Charara et coll., 1996, Takakusaki et coll., 1996), certains axones co-exprimant glutamate et acétylcholine (Charara et coll., 1996, Lavoie & Parent 1994b). Les neurones DA de la SNc possèdent les récepteurs NMDA et AMPA au glutamate et les récepteurs nicotiniques et muscariniques à l'acétylcholine (Di Loreto et coll., 1992, Futami et coll., 1995, Livingstone & Wonnacott 2009, Sorenson et coll., 1998). La stimulation de ces afférences active les neurones DA avec une latence courte (Lokwan et coll., 1999, Scarnati et coll., 1984) et induit une libération de DA dans le striatum (Forster & Blaha 2003).

Le PPN projetterait également sur l'aire tegmentale ventrale (Alderson et coll., 2006, 2008, Winn 2008). Il a d'ailleurs été proposé par Winn, en 2008, une topographie du PPN dont la partie postérieure recevrait des afférences sensorielles et projetterait sur la l'aire tegmentale ventrale induisant la libération de DA dans la partie ventrale du striatum. La partie antérieure du PPN recevrait des afférences plus motrices provenant des ganglions de la base et projetterait sur la SNc activant ainsi la libération de DA dans le striatum dorsal (Winn 2008) (Figure 12).

Une grande partie des connexions du PPN a été confirmée par imagerie du tenseur de diffusion (DTI) et tractographie chez le macaque et chez l'homme (Aravamuthan et coll., 2009, Aravamuthan et coll., 2007).



En conclusion, le PPN se trouve ainsi à l'interface de contact entre le système nerveux périphérique, le cervelet et les ganglions de la base. Il est la zone de relais entre les afférences sensorielles de la moelle épinière et le thalamus. Le PPN exerce en particulier un contrôle excitateur majeur sur les neurones DA de la SNc.

B. Rôles du PPN

Le PPN est impliqué dans de nombreuses fonctions motrices, cognitives, ou émotionnelles / motivationnelles (Winn 2008). Nous ne détaillerons ici que le rôle du PPN dans le contrôle de la locomotion et des cycles veille/sommeil, fonctions perturbées à l'état parkinsonien.

1. Locomotion

Fonctionnellement, le PPN fait partie de la région locomotrice mésencéphalique (RLM). Cette région, décrite en 1966 par *Shik et coll.*, regroupe de par leur fonction un ensemble de noyaux du tronc cérébral qui, une fois stimulés, initient la locomotion et modulent la fréquence des pas en fonction de l'intensité de la stimulation dans différents modèles animaux (*Eidelberg et coll.*, 1981, *Garcia-Rill et coll.*, 1990, *Garcia-Rill & Skinner* 1987a, b, *Shik et coll.*, 1966). Ainsi, une stimulation répétitive de faible amplitude (10-100 μ A) et de longue durée (0.5-1 s) délivrée à une fréquence de 40-60 Hz au niveau de la région locomotrice mésencéphalique déclenche la locomotion chez le chat décérébré (*Shik et coll.*, 1966). Plus précisément, une stimulation électrique du PPN chez le rat (*Kelland & Asdourian* 1989) ou le chat (*Lai & Siegel* 1990), réduit ou augmente le tonus musculaire, en fonction de la fréquence de stimulation. Ainsi une stimulation continue à faible fréquence (20 à 60Hz) permet d'initier la locomotion chez le chat (*Garcia-Rill et coll.*, 2001)(*Garcia-Rill et Skinner*, 1991), tandis qu'une stimulation à haute fréquence (supérieure à 100 Hz), supprime le tonus musculaire (*Lai & Siegel* 1990). Selon *Garcia-Rill*, le site optimal pour initier la locomotion se trouve au niveau des neurones cholinergiques du PPN (*Garcia-Rill et coll.*, 1987). A ce niveau, 3 types de neurones ont été différenciés par enregistrements extracellulaires chez le chat pendant sa locomotion (*Garcia-Rill & Skinner* 1988) : 1) les neurones « on » qui déchargent de manière tonique, arrêtent leur fréquence de décharge à l'arrêt de la marche ; 2) les neurones « off » qui déchargent également de manière tonique mais augmentent leur fréquence de décharge avec la cessation de la locomotion et la diminuent lorsque la fréquence de la marche est accentuée. Ces neurones « on » et « off » sont probablement les neurones cholinergiques du PPN, et plus précisément les neurones dit de type II, c'est à dire les neurones ne déchargeant pas en bouffée (neurones « non-bursting »). Ces non-bursting neurones moduleraient la durée et la maintenance de la marche. Enfin 3) les neurones possédant un patron de décharge en bouffée

(les « bursters ») et qui moduleraient la fréquence et peut-être l'initiation de la marche (Garcia-Rill et Skinner, 1991). Ces neurones seraient les neurones non-cholinergiques du PPN, et correspondraient aux neurones de type I. En accord avec cette hypothèse, des enregistrements électrophysiologiques, réalisés chez le chat pendant l'exécution de mouvements programmés, montrent que les neurones de type II cholinergiques augmentent leur activité pendant le mouvement programmé et les neurones de type I sont activés juste avant le mouvement (Dormont et coll., 1998). Sans précision sur le type neuronal activé, Matsumura et coll., 1997 ont décrit, *in vivo* chez le singe, un changement du taux de décharge des neurones du PPN débutant avant le mouvement et continuant tout le long de l'exécution du mouvement, confirmant l'implication du PPN dans l'initiation et la maintenance de la motricité (Matsumura et coll., 1997). Cette étude a également montré que lors d'un mouvement programmé d'un seul membre supérieur, les neurones du PPN des deux hémisphères sont activés suggérant une implication du PPN non seulement dans la motricité mais également dans la coordination motrice. D'un point de vue comportemental, une lésion excitotoxique du PPN antérieur, mais pas postérieur, diminue l'activité locomotrice chez le rat (Alderson et coll., 2008). Ces données sont en accord avec la topographie de Winn, 2008, où la partie antérieure du PPN serait impliquée dans des fonctions motrices et projetterait sur la SNc et les ganglions de la base ; et la partie postérieure quant à elle serait sensorielle et projetterait sur l'aire tegmentale ventrale (*Figure 12*). Une lésion spécifique des neurones cholinergiques du PPN antérieur chez le rat ne provoque pas de déficit dans l'exécution de tâches motrices simples (comme la locomotion), mais dans l'exécution de tâches motrices complexes nécessitant une intégration rapide d'informations sensorielles (rotarod avec accélération par exemple) (MacLaren et coll., 2014). Enfin, en accord avec les données électrophysiologiques, il a été montré au laboratoire qu'une lésion spécifique des neurones cholinergiques du PPN induit des troubles de la marche et de la posture chez le primate non-humain (Grabli et coll., 2013, Karachi et coll., 2010).

L'ensemble de ces travaux suggère que l'activité des neurones du PPN joue un rôle prépondérant dans l'initiation et la maintenance de la locomotion ainsi que dans la stabilité posturale.

2. Cycles veille/sommeil

Les premières expériences démontrant l'implication de la formation réticulée du tronc cérébral dans le contrôle des cycles veilles-sommeil datent de 1949, par Moruzzi et Magoun (Moruzzi & Magoun 1949). Chez le chat anesthésié, le système réticulé activateur ascendant (SRAA) fut identifié par la stimulation électrique du tegmentum mésencéphalique induisant un éveil cortical, et par sa lésion induisant un coma. Les principaux systèmes impliqués dans le SRAA ont ensuite été définis d'un point de vue anatomique. Le SRAA a pour origine les neurones adrénergiques du locus coeruleus, sérotoninergiques des noyaux du raphé et cholinergiques du noyau latéro-dorsal du tegmentum et du PPN (Shute & Lewis 1967). On sait à l'heure actuelle qu'il existe une dizaine de structures, situées en cascade du tronc cérébral au cortex, qui sont organisées en réseau, et dont l'excitation pharmacologique de l'une étant suivie par l'activation de toutes les autres. Dans ce réseau, le PPN et le noyau latéro-dorsal du tegmentum communiquent avec le cortex via des projections principalement cholinergiques sur les noyaux intralaminaires postérieurs du thalamus (formés des noyaux parafasciculaire et centromédian) et sur le noyau périthalamique (Steriade et coll., 1991). Or, une lésion bilatérale des noyaux intralaminaires thalamiques provoque soit une léthargie soit une somnolence (Facon et coll., 1958, Steriade 1996). De plus, les neurones cholinergiques du PPN sont actifs pendant l'éveil et le sommeil paradoxal, et durant les phases de sommeil leur activité diminue (Garcia-Rill et coll., 2007, Steriade et coll., 1990, Vincent 2000). Des lésions stéréotaxiques dans la région du PPN chez le chat (Shouse & Siegel 1992, Webster & Jones 1988) ou des traitements pharmacologiques d'antagonistes de l'acétylcholine dans des régions de projections du PPN diminuent ou abolissent le sommeil paradoxal et réduisent l'éveil (Velazquez-Moctezuma et coll., 1989). De par le rôle du PPN sur le tonus musculaire, il a été proposé que le PPN soit impliqué dans l'atonie musculaire pendant le sommeil paradoxal (Garcia-Rill et coll., 2004, Takakusaki et coll., 2003).

Si l'ensemble de ces données convergent vers un rôle clé des neurones cholinergiques du PPN dans la régulation du sommeil paradoxal et de l'éveil, d'autres données plus récentes ne retrouvent pas ce rôle de « déclencheur » des transitions veilles-sommeil. Des études lésionnelles du PPN chez le rat (Deurveilher & Hennevin 2001) et plus spécifiquement des neurones cholinergiques du PPN chez le primate non-humain (Belaid et coll., 2014) montrent de profondes modifications du sommeil avec notamment une diminution des phases de sommeil paradoxal, mais ces perturbations ne sont que transitoires. Selon Winn, 2008, le PPN doit être considéré comme un composant d'un réseau de structures cérébrales contrôlant le

sommeil et non comme l'unique régulateur de l'état comportemental ou le signal déclencheur du sommeil paradoxal : « It is perhaps better to consider the PPTg as a component part of a distributed network of structures and neurons controlling sleep rather than as a unique regulator of behavioural state or “master switch” for REM sleep » (Winn 2008).

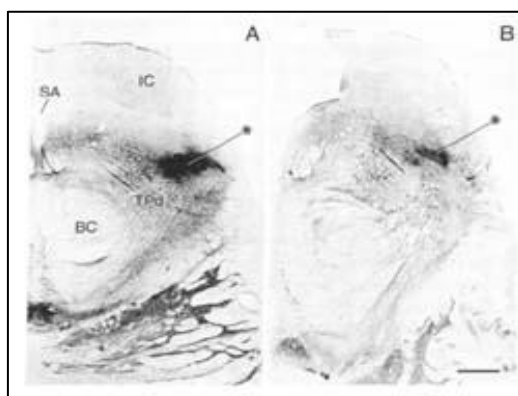
Le PPN est une structure importante dans la régulation des cycles de veille/sommeil ainsi que dans le maintien du tonus musculaire au cours de ces cycles.

V. MALADIE DE PARKINSON ET PPN

A. Perte des neurones cholinergiques

La dégénérescence des neurones cholinergiques du PPN a été mise en évidence sur des tissus humains de patients parkinsoniens en post-mortem (Hirsch et coll., 1987, Jellinger 1988) (*Figure 13*). Le taux de mort atteint 40 à 50% par rapport à des cerveaux contrôles, et le degré de dégénérescence est corrélé à l'importance de la perte DA (Karachi et coll., 2010, Zweig et coll., 1989a). Rinne et coll. (2008) ont confirmé la dégénérescence des neurones cholinergiques (36% en moyenne) et non-cholinergiques (23%) par rapport aux cerveaux contrôles et ont également mis en évidence une corrélation entre la dégénérescence des neurones cholinergiques du PPN et la sévérité des symptômes parkinsoniens (Rinne et coll., 2008). Enfin, une étude récente a mis en évidence une corrélation significative entre dégénérescence cholinergique du PPN et l'occurrence de chutes et d'épisodes de freezing chez le patient parkinsonien (Karachi et coll., 2010).

Figure 13. Dégénérescence des neurones cholinergiques du PPN à l'état parkinsonien. D'après E. Hirsh et coll (1987). Marquage par l'acétylcholine d'un tronc cérébral normal (A) et d'un patient parkinsonien (B). Les astérisques indiquent la pars compacta du PPN.



La déplétion de neurones cholinergiques du PPN n'a pas été retrouvée dans tous les modèles animaux de la MP. Ainsi, aucune perte de neurones cholinergiques du PPN n'a été

détectée chez le rat hémiparkinsonien, par lésion nigrale à la 6-OHDA (Heise et coll., 2005), et chez le macaque intoxiqué par le MPTP (Heise et coll., 2005, Herrero et coll., 1993a). Plus récemment, une perte des neurones a été retrouvée dans le PPN de rats lésés à la 6-OHDA dans la SNc, mais elle ne concernait que les neurones non-cholinergiques (glutamatergiques et GABAergiques) (Pienaar & van de Berg 2013). Cependant, dans notre équipe, une perte d'environ 30% de neurones cholinergiques a été récemment rapportée chez le macaque âgé intoxiqué par le MPTP (Grabli et coll., 2013, Karachi et coll., 2010). Récemment, un nouveau modèle rongeur de la MP a été développé en utilisant la lactacystine. Cette molécule est un inhibiteur du système ubiquitine-protéasome induisant la mort des neurones, *in vitro* (Rideout et coll., 2001) et *in vivo* (McNaught et coll., 2002, Niu et coll., 2009), accompagnée par la formation d'inclusions cytoplasmiques contenant de l'alpha-synucléine et de l'ubiquitine (Lorenc-Koci et coll., 2011, Niu et coll., 2009, Vernon et coll., 2010). Le potentiel de ce nouveau modèle rongeur a été exploré par Pienaar et coll. (2013) en injectant la lactacystine par stéréotaxie dans la SNc de rat et en évaluant la perte DA et cholinergique du PPN. Cette étude rapporte une perte modérée de 48% des neurones DA de la SNc ainsi qu'une perte importante de 61% des neurones cholinergiques du PPN avec une hypotrophie des corps cellulaires restants ; retrouvant ainsi chez le rat la perte cholinergique observée chez l'humain (Pienaar et coll., 2013). Cependant cette toxine n'étant pas spécifique des neurones DA, il n'est pas possible d'affirmer que la perte DA seule est à l'origine de la dégénérescence cholinergique.

L'ensemble de ces données expérimentales ne permettent donc pas de conclure qu'une lésion purement DA provoque une souffrance, voire une mort neuronale cholinergique du PPN.

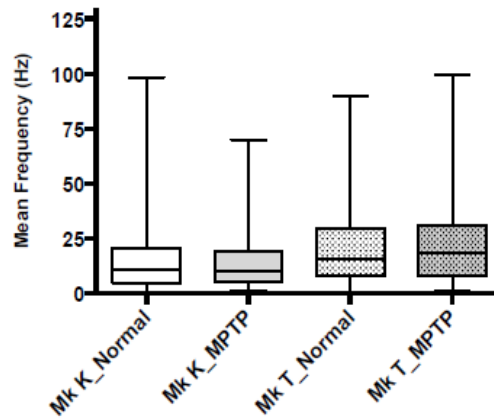
B. Activité électrique et métabolique des neurones du PPN

Bien qu'aucune mort neuronale n'ait été détectée dans les modèles animaux de la MP, un changement d'activité métabolique et électrique a été mis en évidence. Les études réalisées sur l'activité métabolique montrent des résultats contradictoires. Une augmentation de l'activité métabolique, par hybridation *in situ* de l'ARNm de la sous-unité I de la cytochrome oxydase (COI), a été décrite chez le rat 6-OHDA (Orieux et coll., 2000), tandis qu'une

diminution est reportée, par la même technique chez le singe intoxiqué par le MPTP (Gomez-Gallego et coll., 2007). Une augmentation de l'activité métabolique des afférences du PPN a également été observée chez le rat 6-OHDA (Carlson et coll., 1999, Mitchell et coll., 1989, Palombo et coll., 1990) mais cette activité a été mesurée par le métabolisme du glucose qui ne discrimine pas entre afférences excitatrices et inhibitrices.

Une augmentation du taux de décharge des neurones cholinergiques a été décrite par enregistrements extracellulaires *in vivo* chez le rat hémiparkinsonien mais aucune modification du patron de décharge n'est observée (Zhang et coll., 2008). D'autres études similaires sur le même modèle décrivent une augmentation de l'activité des neurones du PPN ainsi qu'un important changement de patron de décharge avec une plus grande proportion de neurones déchargeant de manière irrégulière (Breit et coll., 2001, Jeon et coll., 2003). De plus, une lésion du noyau subthalamique chez des rats contrôles diminue l'activité électrique des neurones du PPN et change considérablement le patron de décharge des neurones du PPN. La lésion du noyau subthalamique réalisée chez des animaux hémiparkinsoniens induit un retour à la normale de l'activité des neurones du PPN mais le patron de décharge reste anormal. Ces études ont ainsi mis en avant l'importance des afférences excitatrices du noyau subthalamique sur l'activité du PPN, contrastant avec les hypothèses d'une hypoactivation du PPN due au contrôle majeur des voies de sorties GABAergiques inhibitrices des ganglions de la base. Chez des macaques intoxiqués par le MPTP, Laurent Goetz (dans sa thèse publiée en 2013) n'observe pas de modifications de l'activité électrique des neurones du PPN, mais observe surtout un changement du patron de décharge (*Figure 14*). L'hyperactivité des afférences inhibitrices GABAergiques en provenance des voies de sortie des ganglions de la base, mais aussi celle des afférences excitatrices glutamatergiques en provenance du noyau subthalamique à l'état parkinsonien, peut expliquer les données contradictoires de la littérature sur le niveau d'activité du PPN.

Figure 14. Taux de décharge moyen des neurones du PPN à l'état contrôle puis après MPTP chez 2 singes. D'après les résultats publiés dans la thèse de Laurent Goetz 2013

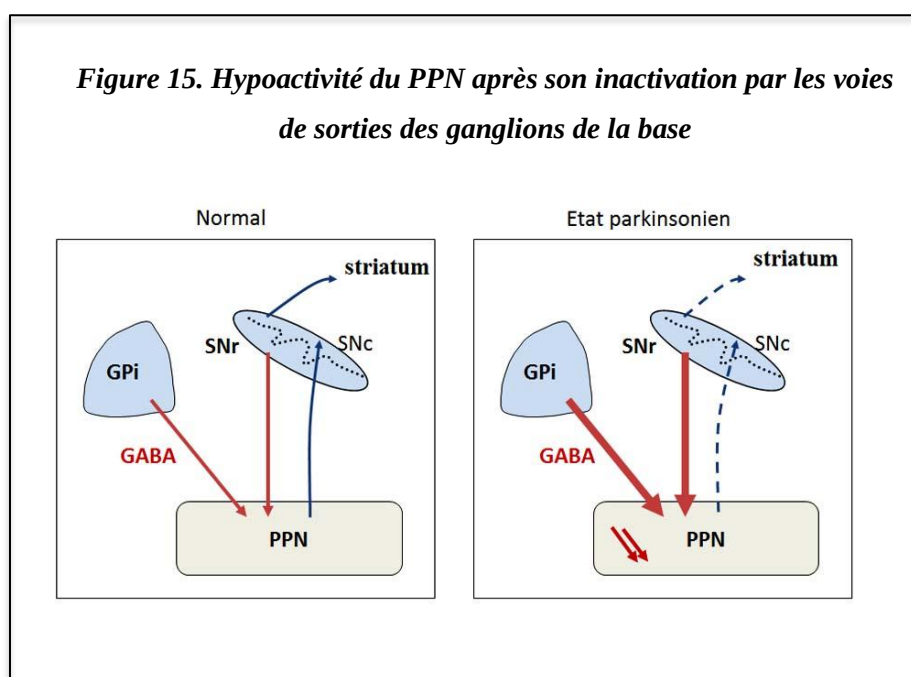


L'ensemble de ces données suggèrent qu'à l'état parkinsonien les afférences hyperactives, excitatrices et inhibitrices, sur le PPN modifient le patron de décharge des neurones, aboutissant alors à une transmission pathologique de l'information aux autres structures.

C. Troubles moteurs parkinsoniens et PPN

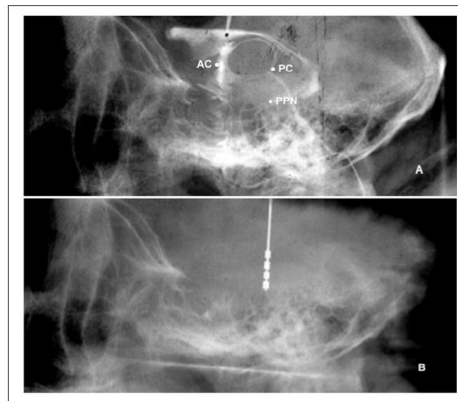
Les principales études portant sur l'implication du PPN dans les troubles moteurs ont été menées sur le primate. Le but de ces études était de tester l'hypothèse du contrôle inhibiteur des structures de sortie des ganglions de la base (SN *pars reticulata* et globus pallidus interne) sur le PPN, puis d'évaluer l'effet d'une sur-inhibition GABAergique dans le contexte parkinsonien. Selon cette hypothèse, une inhibition / lésion du PPN devrait entraîner une moindre excitation de la voie DA nigrostriatale et provoquer un syndrome parkinsonien (Figure 15).

Figure 15. Hypoactivité du PPN après son inactivation par les voies de sorties des ganglions de la base



Effectivement, diverses équipes de recherche ont montré que des lésions unilatérales du PPN chez le primate-non humain, qu'elles soient réalisées par radiofréquence, à l'acide kaïnique, par injections de muscimol (agoniste GABAergique) ou par stimulation haute fréquence, induisent une hypokinésie des membres contralatéraux et une diminution de l'activité motrice ; la sévérité des symptômes étant significativement corrélée à la taille de la lésion du PPN ainsi qu'à la déplétion striatale en DA (Aziz et coll., 1998, Jenkinson et coll., 2004, Kojima et coll., 1997, Matsumura 2001, 2005, Matsumura & Kojima 2001, Munro-Davies et coll., 2001, Munro-Davies et coll., 1999, Nandi et coll., 2002a, Nandi et coll., 2002b) (*Figure 16*). Lorsque les lésions du PPN sont bilatérales, les symptômes sont plus prononcés et l'état parkinsonien des singes est plus persistant. En comparaison, la stimulation à haute fréquence du PPN chez le singe parkinsonien aggrave l'état akinétique, alors que celle à basse fréquence améliore les symptômes moteurs (Jenkinson et coll., 2004). Lorsqu'une stimulation à basse fréquence du PPN est combinée à un traitement DA, les effets sur les symptômes sont additifs confirmant l'implication du PPN dans la MP (Jenkinson et coll., 2006).

Figure 16. Implantation d'électrodes dans le PPN chez le macaque. En haut : Ventriculographie (vue latérale) permettant de calculer la position du PPN chez le singe. En bas : vue latérale (rayons X) après implantation d'électrodes de stimulation cérébrale profonde. D'après Nandi et coll. (2002)



Une lésion large, non spécifique des neurones cholinergiques du PPN reproduit les troubles moteurs caractéristiques de la MP.

D. Stimulation du PPN à l'état parkinsonien

En 1987, Benabid et collaborateurs ont introduit la technique de stimulation cérébrale profonde à haute fréquence chez l'Homme (Benabid et coll., 1987). Cette technique a montré son effet thérapeutique sur différentes cibles (thalamus, pallidum interne, noyau subthalamique) lorsque la prise en charge de la maladie par voie médicamenteuse n'est plus optimale. A ce jour, la cible la plus utilisée reste le noyau subthalamique pour traiter les patients parkinsoniens ayant une bonne sensibilité à la L-dopa. Les mécanismes précis d'action de la stimulation cérébrale profonde ne sont pas encore totalement élucidés (Benazzouz & Hallett 2000). Bien qu'efficace, la stimulation cérébrale à haute fréquence du

noyau subthalamique n'arrive pas à soulager les patients des symptômes apparaissant plus tardivement, tels que les troubles de la posture et les troubles de l'équilibre. Il est même suggéré que la stimulation du noyau subthalamique pourrait aggraver les troubles de la marche et les chutes (Ferraye et coll., 2008, Krack et coll., 2003). De nombreux travaux se sont donc intéressés à d'autres structures comme nouvelles cibles potentielles pouvant améliorer également les troubles posturaux.

Grâce aux études lésionnelles sur le singe montrant qu'une lésion du PPN provoque un état akinétique et qu'une stimulation basse fréquence améliore les symptômes moteurs (*Figure 15*) mais également compte tenu de l'implication du PPN dans la locomotion et la posture, plusieurs équipes ont proposé de stimuler à basse fréquence le PPN de patients parkinsoniens ayant des troubles de la marche non améliorés par la stimulation du noyau subthalamique (Mazzone et coll., 2005, Plaha & Gill 2005). Après la présentation de ces résultats prometteurs présentant la faisabilité de cette nouvelle approche chirurgicale, d'autres équipes ont ensuite évalué l'efficacité de la stimulation du PPN pour traiter les patients (Ferraye et coll., 2010, Ferraye et coll., 2011, Moro et coll., 2010, Pereira et coll., 2008, Thevathasan et coll., 2011). Les effets cliniques obtenus sont variables et d'interprétation difficile et les auteurs concluent que cette nouvelle approche thérapeutique pour traiter les troubles de la marche, même si elle semble prometteuse, doit encore être validée. L'une des difficultés majeures de la stimulation du PPN reste sans doute de trouver les meilleurs paramètres de stimulation ainsi que le bon site d'implantation. Le PPN reste une structure impliquée dans de nombreuses fonctions et sa stimulation peut donc induire des effets indésirables (Ferraye et coll., 2010). Il a ainsi été récemment montré que la stimulation à basse fréquence du PPN induit un état de vigilance chez les patients parkinsoniens, suivi, dès l'arrêt de la stimulation, de l'endormissement des patients en sommeil paradoxal ; *a contrario*, la stimulation haute fréquence du PPN induit un endormissement instantané des patients en sommeil profond (Arnulf et coll., 2010).

La stimulation cérébrale profonde de la région du PPN semble être une thérapie d'avenir pour soulager, entre autres, les troubles posturaux et d'équilibre ne répondant ni au traitement DA ni à la stimulation du noyau subthalamique. Cependant, les résultats apparaissent toutefois décevants et pourraient être améliorés grâce à l'optimisation de la sélection des patients, le ciblage et le réglage des paramètres de stimulation.

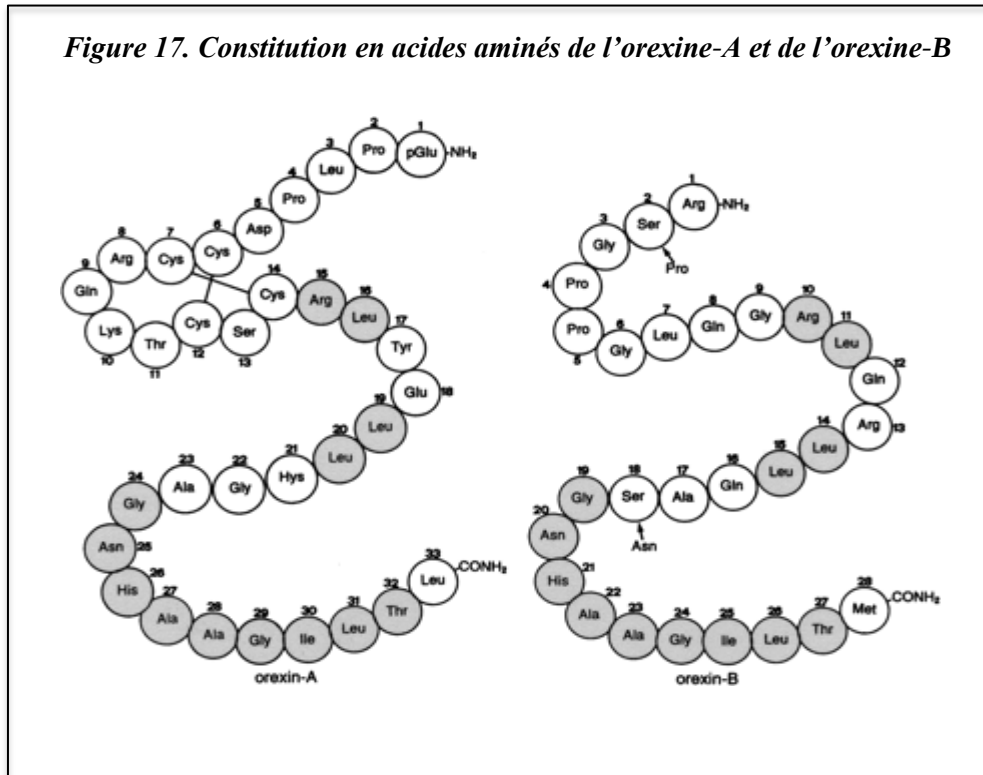
E. Impact d'une lésion du PPN sur la survie des neurones DA

Une des rares études lésionnelles s'intéressant à l'impact d'une lésion du PPN sur la survie des neurones DA de la SNc a été réalisée en 1984 par McGeer et McGeer chez le rat. Une perte des neurones DA de la SNc et GABAergiques de la SN *pars reticulata* a été observée après l'injection d'acide kainique dans le PPN de rat (McGeer & McGeer 1984). Cependant, la mort de neurones DA observée ne peut être attribuée à la mort des neurones du PPN seule car selon la figure publiée, la toxine utilisée a provoqué de larges lésions touchant de nombreuses structures de la formation réticulée du mésencéphale. Aucun résultat comportemental n'a été reporté dans cette étude.

VI. LE SYSTEME OREXINERGIQUE HYPOTHALAMIQUE

A. L'orexine

L'orexine-A et l'orexine-B sont issues d'un précurseur commun, la prépro-orexine, qui par clivage protéolytique va produire les deux peptides. Ces peptides sont également nommés hypocréatine 1 et hypocréatine 2 respectivement car leur récente découverte est concomitante, Sakurai et coll. (1998) donnant le terme d'orexine tandis que De Lecea et coll. (1998) utilisent le terme d'hypocréatine (de Lecea et coll., 1998, Sakurai et coll., 1998). Tout au long de cette thèse pour une raison de cohérence, la dénomination d'orexine sera utilisée. L'orexine-A et l'orexine-B sont 2 protéines distinctes, l'orexine-A étant un peptide formé de 33 acides aminés tandis que 28 acides aminés constituent l'orexine-B avec une structure conformationnelle différente puisque l'orexine-A possède deux ponts disulfures, même s'il existe une similitude entre les chaînes C-terminales (*Figure 17*).



Les deux peptides sont co-exprimés dans les mêmes neurones dans différentes espèces animales (Date et coll., 1999, Zhang et coll., 2001), ce qui semble cohérent avec leur synthèse issue du clivage d'un précurseur. Les données de la littérature concernant la distribution des fibres orexinergiques ne sont pas aussi évidentes. Une distribution différente des deux peptides a été rapportée chez le rat, avec une plus faible et moins dense distribution de l'orexine-B (Cutler et coll., 1999) que de l'orexine-A; toutefois une distribution similaire des deux neuropeptides est décrite chez le chat (Zhang et coll., 2001) et le rat (Date et coll., 1999). Les données de la littérature concernent principalement l'orexine-A ou la prépro-orexine, l'orexine-B ayant fait l'objet de très peu d'études. L'orexine-A et l'orexine-B dépolarisent leurs neurones cibles par stimulation de deux récepteurs OX_1R et OX_2R couplés à des protéines G. Le récepteur OX_1R est couplé à la protéine $G_{\alpha 11}$ alors que le récepteur OX_2R est également couplé à la protéine $G_{\alpha 11}$ mais aussi à la protéine G inhibitrice G_i (Sakurai et coll., 1998). La conséquence d'une activation de ces récepteurs est d'augmenter le calcium cytosolique (Ishibashi et coll., 2005, Nakamura et coll., 2010) par une mobilisation des pools calciques du réticulum endoplasmique (Zawilska et coll., 2013). L'orexine-A et l'orexine-B se lient au récepteur OX_2R avec la même affinité tandis que le récepteur OX_1R a une meilleure affinité pour l'orexine-A. Les deux récepteurs sont distribués selon une cartographie bien spécifique dans le cerveau, suggérant des rôles physiologiques distincts pour ces deux peptides (Marcus et coll., 2001).

L'orexine-A et l'orexine-B sont deux peptides différents co-exprimés dans les mêmes corps cellulaires. Les effets de l'orexine-A ou de l'orexine-B dépendraient principalement du sous-type de récepteur mis en jeu.

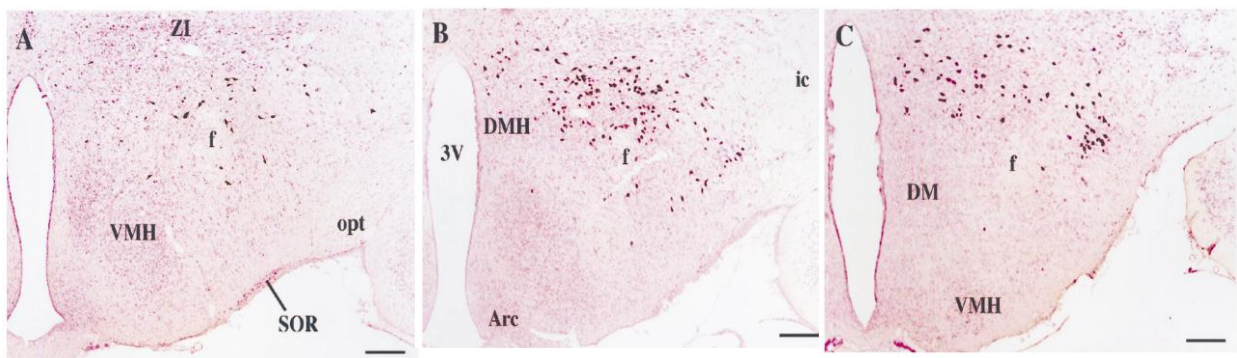
B. Données anatomiques

Les neurones orexinergiques sont exclusivement restreints dans l'hypothalamus et plus précisément au niveau du l'hypothalamus latéral et postérieur et de l'aire périfornicale. Cette localisation est décrite dans différentes espèces animales dont l'humain et semble donc conservée (*Figure 18, A, B, C*) (Date et coll., 1999, de Lecea et coll., 1998, Downs et coll., 2007, Peyron et coll., 1998, Thannickal et coll., 2007). Les projections des neurones à orexine

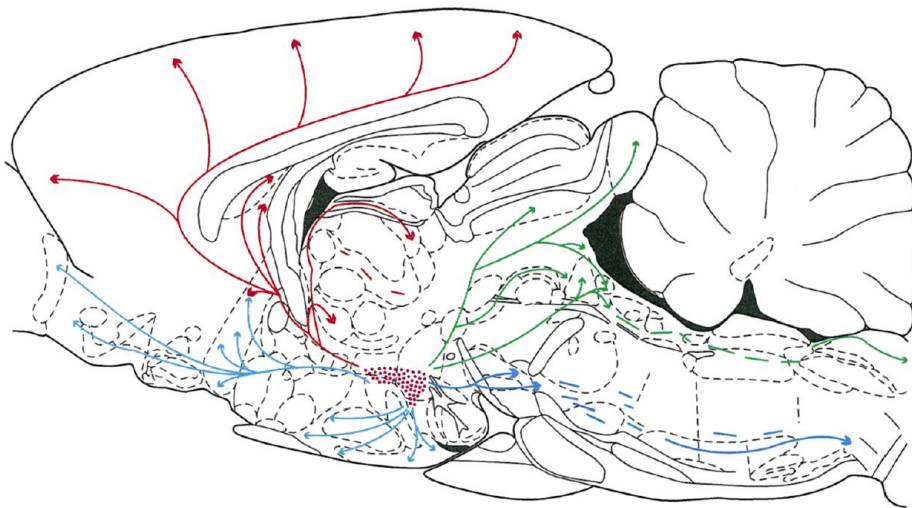
diffusent dans tout le cerveau, allant du cortex au tronc cérébral (*Figure 18, D*) (Nambu et coll., 1999, Peyron et coll., 1998) et dont le locus coeruleus étant la structure recevant la plus dense innervation.

Figure 18. A, B, C, Localisation des neurones à orexine sur 3 coupes selon l'axe rostro-caudal de l'hypothalamus chez le rat (D'après Peyron et coll., 1998).

**DMH ou DM : noyau hypothalamique dorso-medial ; f : fornix ; Arc : noyau arcuate ;
3V : troisième ventricule ; ZI : zona incerta ; VMH : noyau hypothalamique ventro-medial**



D. Représentation des projections diffuses des neurones à orexine chez le rat (D'après Peyron et coll., 1998)



Concernant les structures mésencéphaliques DA, la SNc et la VTA, la littérature n'est pas en parfait accord. En effet, des études, chez le rat et l'humain, ont mis en évidence la présence de denses fibres orexinergique au sein de la VTA et la SNc et révèlent que ces fibres sont en appositions sur les neurones DA et que ces appositions sont majoritairement axo-dendritiques (Hrabovszky et coll., 2013, Peyron et coll., 1998). Une autre étude décrit une faible densité des fibres orexinergiques dans ces structures chez le rat (Nambu et coll., 1999). De récentes données montrent que les neurones DA de la SNc et la VTA possèdent les deux types de récepteurs à l'orexine. De plus, l'application intracérébrale d'orexine-A et d'orexine-B augmente l'activité des neurones DA et non-DA de la VTA (Korotkova et coll., 2003). Cependant, aucun effet n'est observé lorsque l'orexine-A ou l'orexine-B est injectée dans la SNc (Korotkova et coll., 2002). De nombreuses études ont été réalisées sur les effets du système orexinergique sur les neurones de la VTA et son incidence dans différentes fonction dont entres autres l'attention, l'addiction, le sommeil et la cataplexie. Mais les études concernant l'influence du système orexinergique sur les neurones DA de la SNc manquent dans la littérature actuelle.

Des études électrophysiologiques ont identifié les neurotransmetteurs et modulateurs qui activent ou inhibent l'activité des neurones orexinergiques de l'hypothalamus. De façon générale, ce sont les régions cérébrales impliquées dans les cycles veille/sommeil qui interagissent avec les neurones orexinergiques. Ainsi, les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé, noradrénergiques du locus coeruleus, DA de l'aire tegmentale ventrale, GABAergiques de l'aire préoptique ventrolatérale (centre hypnogène) influencent l'activité des neurones orexinergiques (Sakurai 2007).

Malgré le confinement des neurones à orexine dans une petite région, ces derniers possèdent de nombreuses efférences et par conséquent sont impliqués dans diverses fonctions et semblent être en position de moduler l'activité DA des neurones du mésencéphale.

C. Rôles

Le système orexinergique hypothalamique fut tout d'abord étudié pour son rôle dans la prise alimentaire (Edwards et coll., 1999, Haynes et coll., 2002, Haynes et coll., 2000, Sakurai et coll., 1998). Mais il est également impliqué dans de nombreuses fonctions telles que la régulation de l'homéostasie énergétique, l'attention (Yamanaka et coll., 2003), la récompense (Harris et coll., 2005) et l'addiction (Boutrel et coll., 2005). C'est son rôle dans la régulation des cycles veille-sommeil que nous allons détailler.

En 1999, deux études ont révélé l'importance du système orexinergique dans la régulation des cycles veille/sommeil. Une d'entre elles a découvert que des souris transgéniques ne possédant pas le gène codant pour la prépro-orexine présentent un phénotype ressemblant fortement à la narcolepsie humaine (Chemelli et coll., 1999). La narcolepsie est une pathologie caractérisée par l'incapacité à maintenir un état de vigilance avec des déclenchements soudains de sommeil paradoxal (REM-sleep) et/ou de sommeil profond (non-REM sleep), accompagné par une somnolence diurne excessive. L'autre étude, réalisée sur des chiens, rapporte qu'une mutation perte de fonction du récepteur OX₂R induit un phénotype narcoleptique-cataplexique (Lin et coll., 1999), la cataplexie correspondant à une perte brutale du tonus musculaire sans altération de la conscience. Peu après, des données issues de tissus post-mortem de patients narcoleptiques-cataplexiques ont révélé une perte drastique des neurones à orexine (Peyron et coll., 2000, Thannickal et coll., 2000), ainsi qu'une diminution d'au moins 95%, voire une perte totale, du taux d'orexine-A dans le liquide céphalo-rachidien (Nishino et coll., 2000). L'administration d'orexine-A chez des souris transgéniques narcoleptiques, ne possédant plus de neurones à orexine, supprime le phénotype narcoleptique (Mieda et coll., 2004). De plus, l'administration orale d'un antagoniste de l'orexine, bloquant spécifiquement les deux types de récepteurs, a un effet somnifère chez le rat, le chien mais également l'humain (Brisbare-Roch et coll., 2007). D'un point de vue électrophysiologique, les neurones orexinergiques ont un faible taux de décharge pendant le sommeil paradoxal ainsi que le sommeil profond. Pendant l'éveil, le taux de décharge est élevé mettant ainsi en évidence l'importance du système orexinergique dans la maintenance de l'éveil (Lee et coll., 2005).

Le système orexinergique n'a été que récemment découvert et a provoqué un engouement important dans la recherche. Aujourd'hui les études visant à explorer le rôle de l'orexine dans le contrôle de l'activité de différentes structures cérébrales se multiplient. Il est maintenant clairement établi que le système orexinergique joue un rôle prépondérant dans la régulation des cycles de veille/sommeil et tout particulièrement dans le maintien de l'éveil.

VII. SYSTEME OREXINERGIQUE ET MALADIE DE PARKINSON

Les patients parkinsoniens souffrent de différents troubles du sommeil tels que la somnolence diurne, la fragmentation des phases du sommeil, ainsi qu'une diminution du sommeil paradoxal, qui sont similaires à ceux de la narcolepsie (Tandberg et coll., 1998). Tout comme les patients narcoleptiques, certains patients parkinsoniens présentent une perte des neurones à orexine (Fronczek et coll., 2007, 2008, Thannickal et coll., 2007) ainsi qu'une diminution du taux d'orexine-A dans le liquide céphalo-rachidien (Drouot et coll., 2003). Cette réduction d'orexine-A est corrélée négativement avec la sévérité des symptômes (Drouot et coll., 2003) ainsi qu'avec la perte d'atonie musculaire pendant le sommeil paradoxal chez des patients atteints de la MP (Bridoux et coll., 2013). Ces données suggèrent que les troubles du sommeil du patient parkinsonien ont pour origine le dysfonctionnement du système orexinergique. De plus, les fibres orexinergiques étant présentes au niveau des neurones DA de la SNc et ces derniers possédant les récepteurs à l'orexine, les neurones à orexine semblent en position pour réguler l'activité des neurones DA. D'après les arguments présentés précédemment démontrant que la survie des neurones DA dépend, entre autres, de leur niveau d'activité électrique (Michel et coll., 2013), un déficit des projections excitatrices orexinergiques vers les neurones DA de la SNc, pourrait avoir un impact sur la survie de ces neurones.

Le système orexinergique pourrait jouer un rôle clé dans les troubles du sommeil de la MP et semble être en mesure d'influer sur l'activité électrique des neurones DA de la SNc.

OBJECTIFS

Les données de la littérature montrent que les afférences excitatrices sur les neurones DA pourraient jouer un rôle fondamental dans leur survie. La perte de ces afférences à l'état parkinsonien devrait contribuer au dysfonctionnement des neurones DA de la SNc, voire à leur mort. Nous nous sommes intéressés à l'influence de deux projections excitatrices sur les neurones DA: l'afférence cholinergique du PPN d'une part, et l'afférence orexinergique de l'hypothalamus d'autre part.

La première partie de ma thèse porte sur le rôle du système cholinergique pédonculopontin sur la survie des neurones DA de la SNc dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. L'ensemble du travail réalisé dans cette partie fait l'objet d'un article en préparation. Il sera soumis pour publication d'ici la fin de l'année 2014.

La deuxième partie de ma thèse porte sur l'étude du système orexinergique hypothalamique dans un modèle primate non-humain de la maladie de Parkinson. Les résultats obtenus ont été publiés (Bensaid et coll., Eur J Neurosci, 2014). Nous avons choisi de présenter un résumé de ce travail et d'inclure l'article tel qu'il a été présenté pour publication.

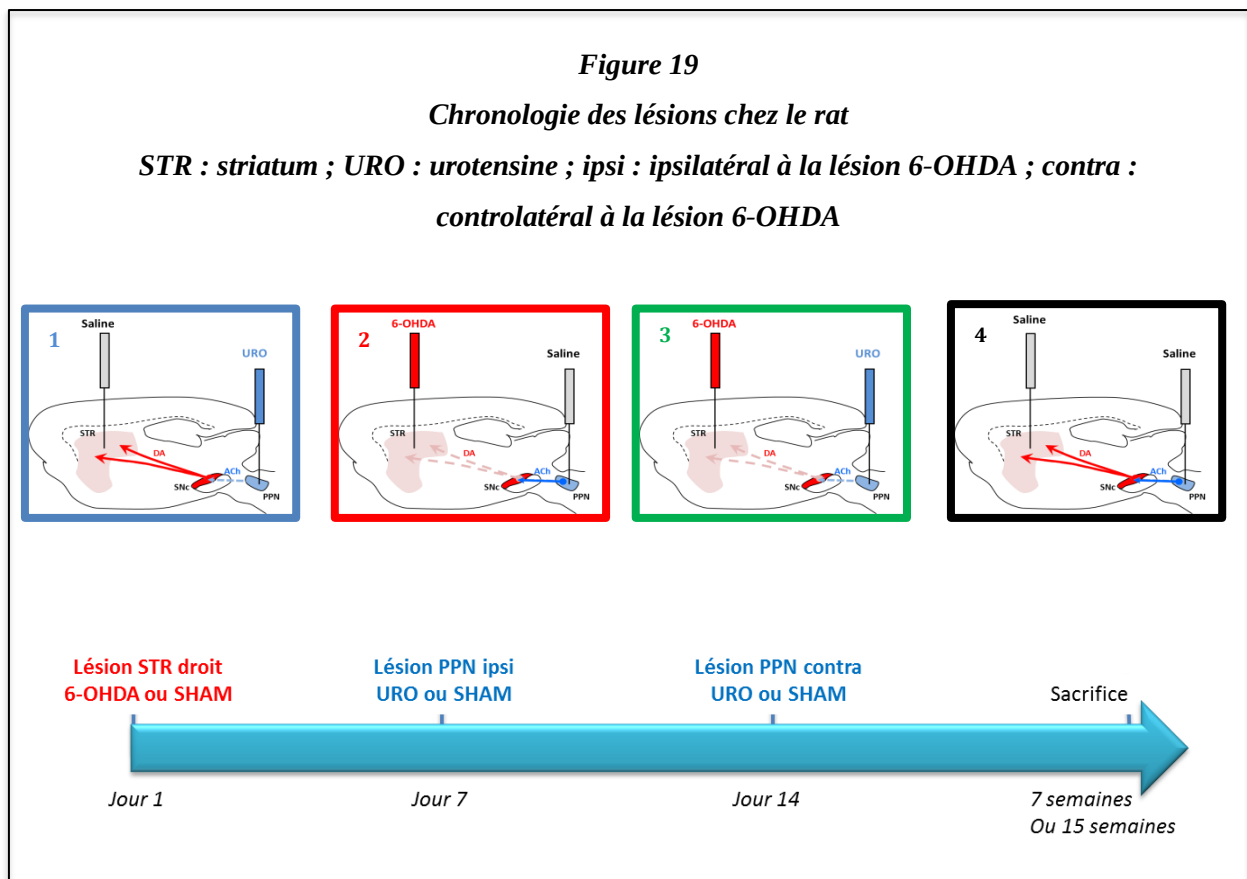
AXE 1. SYSTEME CHOLINERGIQUE DU PPN ET VULNERABILITE DES NEURONES DA

I. Hypothèses et justifications de la méthodologie utilisée

Comme nous l'avons détaillé précédemment, différentes données expérimentales suggèrent que l'activité électrique des neurones DA pourrait jouer un rôle clé dans le contrôle de leur survie. Les neurones DA de la SNc recevant une afférence cholinergique excitatrice majeure du PPN, nous avons émis l'hypothèse qu'une lésion spécifique des neurones cholinergiques devait induire une souffrance, voire une mort de neurones DA. La combinaison d'une lésion cholinergique à une dégénérescence DA comme ce qui est observé chez les patients parkinsoniens devrait aggraver la dégénérescence DA.

Nous avons mis en place un paradigme lésionnel où les neurones cholinergiques du PPN sont spécifiquement détruits chez le rat sain et le rat hémiparkinsonien. Récemment, une toxine issue de la fusion entre la toxine diphtérique et l'urotensine-II (urotensine) a été créée permettant de détruire de manière sélective les neurones cholinergiques du PPN et du noyau latéro-dorsal du tegmentum (Clark et coll., 2007). En effet, seuls les neurones cholinergiques du tronc cérébral possèdent le récepteur à l'urotensine-II. La toxicité quant à elle est due à la toxine diphtérique, très connue et largement utilisée, et qui exerce son effet délétère après avoir été internalisée au sein de la cellule. Une fois dans la cellule, la toxine diphtérique agit en inhibant la synthèse protéique provoquant, in fine, la mort de la cellule (Blanke et coll., 1994, Falnes et coll., 1995). Cette protéine fusion est, dans notre paradigme, injectée en intracérébral dans le PPN des deux hémisphères cérébraux, évitant ainsi d'atteindre le noyau latéro-dorsal du tegmentum. Il existe une autre toxine spécifique des neurones cholinergiques, la 192-saporine, mais elle n'a pas d'effet sur les neurones cholinergiques du tronc cérébral car ils ne possèdent pas le récepteur p75NTR (Knusel & Hefti 1988). Ainsi, l'urotensine s'est avérée une toxine de choix pour notre paradigme lésionnel.

J'ai pris en charge l'ensemble du travail réalisé sur les rongeurs. Afin d'évaluer l'effet des lésions cholinergiques du PPN sur la survie des neurones DA chez le rat sain et le rat hémiparkinsonien, plusieurs groupes d'animaux ont été constitués: 1) un groupe de rats sains lésés bilatéralement dans le PPN ; 2) un groupe de rats hémiparkinsoniens, recevant une injection unilatérale striatale de 6-OHDA ; 3) un groupe de rats doublement lésés, c'est à dire hémiparkinsoniens avec une lésion bilatérale du PPN ; 4) un groupe de rats sham, injectés avec une solution saline dans le striatum et le PPN ; et 5) un groupe de rats contrôles ne subissant aucune chirurgie. Tous les groupes, sauf le groupe contrôle, sont représentés sur le schéma ci-dessous avec la chronologie des lésions (*Figure 19*).



Le modèle de rat parkinsonien que nous avons choisi est le modèle obtenu par injection unilatérale de 6-OHDA dans le striatum dorso-latéral. Ce choix est apparu le plus approprié pour notre étude. En effet, l'injection intrastriatale de 6-OHDA induit une lésion plus progressive, pendant 3 semaines (Blandini et coll., 2007), plus proche de la physiopathologie de la MP que lorsque l'injection concerne directement la SNc ou le MFB. Ce délai de

neurodégénérescence permet d'effectuer les lésions cholinergiques une puis deux semaines suivant la lésion 6-OHDA, donc au cours de la dégénérescence DA. Une lésion DA bilatérale striatale aurait été sûrement plus appropriée qu'une lésion unilatérale, mais la lésion unilatérale a été préférée car les animaux subissent 3 chirurgies successives, les lésions du PPN devant se faire à 1 semaine de distance compte tenu des risques importants de mort après injections dans le tronc cérébral. Le taux de survie et de souffrance des animaux est un facteur particulièrement important à prendre en compte dans l'élaboration du paradigme lésionnel.

J'ai eu l'opportunité d'accéder à des tissus de macaques (*Macaca fascicularis*) contrôles, intoxiqués par le MPTP et lésés dans le PPN par la même toxine, urotensine, issus d'études précédentes effectuées au sein de l'équipe et publiées (Karachi et coll., 2010). Je n'ai réalisé aucune des manipulations *in vivo* sur le singe. A partir des coupes qui m'ont été confiées, j'ai réalisé le travail de marquage cellulaire, d'analyse de données et de statistiques. Le modèle primate non-humain est le plus proche de l'humain tant d'un point de vue anatomique que physiopathologique et représente une étape clé pour le passage aux essais cliniques sur l'homme. La possibilité de travailler sur deux modèles de la MP est un avantage considérable afin de comparer les différences inter-espèces ainsi que les différences inter-modèles impliquant différents mécanismes de mort neuronale.

II. Méthodologie

Animaux:

Les expérimentations animales ont été réalisées en accord avec la directive européenne 2010/63 et ont été approuvées par le Comité d'éthique d'expérimentation animale Charles Darwin (agrément no. Ce5/2012/086).

Un total de 32 rats mâles Sprague-Dawley de 250-300g a été utilisé dans notre étude. Les rats ont été divisés en 4 groupes : 1) un groupe contrôle avec des lésions sham dans le striatum droit et les PPN des deux hémisphères (n=5) ou bien aucune procédure chirurgicale (n=2) ; 2) un groupe avec une lésion unilatérale de 6-OHDA dans le striatum droit et des lésions sham dans les PPN des deux hémisphères (n=13) ; 3) un groupe avec une lésion sham dans le striatum droit et des lésions cholinergiques des PPN des deux hémisphères avec la toxine diphtérique couplée à l'urotensine II (urotensine) (Clark et coll., 2007) (n=8) ; 4) un groupe doublement lésé avec une lésion unilatérale de 6-OHDA dans le striatum droit et une lésion cholinergique des PPN des deux hémisphères avec l'urotensine (n=4). Tous les groupes (sauf les contrôles n'ayant subi aucun traitement chirurgical) ont subi 3 chirurgies successives, les lésions du PPN devant se faire à 1 semaine de distance compte tenu des risques importants de mort après injections dans le tronc cérébral. Ainsi les rats ont reçu une injection 1) dans le striatum droit, puis 2) dans le PPN droit une semaine plus tard, enfin 3) dans le PPN gauche la semaine suivante.

Des coupes de cerveaux de 16 macaques mâles adultes (*Macaca fascicularis*) issus d'autres études de l'équipe (Grabli et coll., 2013, Karachi et coll., 2010) ont été utilisées. Parmi ces animaux, 6 ont été intoxiqués par le MPTP ; 5 ont reçu une lésion cholinergique des PPN des deux hémisphères utilisant la même toxine que celle des rats ; et 5 animaux contrôles n'ont reçu aucun traitement.

Lésions DA et cholinergiques chez le rat

Les animaux ont été préalablement tranquilisés par injection intramusculaire d'un mélange kétamine (10 mg/kg) et atropine (0,1 mg/kg) puis placés dans l'appareil stéréotaxique où ils ont été maintenus sous anesthésie gazeuse avec un mélange de fluothane (1 – 3%) et d'oxygène (1.5 L/min). Un tapis chauffant permet de maintenir la température corporelle à 37°C tout du long de la procédure. Les coordonnées stéréotaxiques des sites

d'injections, selon l'atlas de Paxinos et Watson (1998), ont été préalablement testées et confirmées par injection de bleu de pontamine.

Deux injections striatales de 2µl de 6-OHDA, à 4.86µg/µl dissous dans une solution de NaCl à 0.9% contenant 0.01% d'acide ascorbique, ont été réalisées aux coordonnées stéréotaxiques suivantes par rapport au Bregma : 1) Antériorité: +0.5mm, Latéralité : +2.5mm, Profondeur (par rapport à la dure mère) : -5mm ; 2) Antériorité : -0.5mm, Latéralité : +4mm ; Profondeur : -5mm.

Deux injections de toxine diphtérique couplée à l'urotensine II de 1 µL diluée à 5% dans de l'eau stérile, ont été réalisées dans le PPN selon les coordonnées suivantes, par rapport au Bregma : Antériorité : -7.6mm ; Latéralité : + ou - 1.8mm ; Profondeur : -7.3mm. Une fois l'aiguille en place dans la structure, un délai d'attente de 2 minutes a été respecté, puis les toxines ont été délivrées à une vitesse de 0.2µl par minute. Un délai d'attente de 10 minutes a à nouveau été respecté avant la remontée de l'aiguille. Après la chirurgie, tous les animaux ont été placés seuls dans une cage chauffée en post-opératoire avec un accès facilité à la nourriture et l'eau. Leur poids a été surveillé quotidiennement.

Lésions cholinergiques et DA chez le macaque

L'administration de MPTP a été effectuée selon un mode sub-chronique, avec des injections intramusculaires à raison de 0,4 mg/kg tous les 3 à 7 jours. Les injections ont été arrêtées après l'apparition de tous les symptômes parkinsoniens. Tous les 6 singes MPTP ont développé des symptômes moteurs sévères et ont été euthanasiés 2 à 4 mois après la dernière injection.

La toxine diphtérique couplée à l'urotensine II (10µl à 20%) a été injectée par stéréotaxie dans le PPN d'un hémisphère puis dans le PPN controlatéral 2 à 4 semaines plus tard, comme décrit dans l'article de Karachi et coll., 2010. Les macaques ont été euthanasiés de 2 mois en moyenne après la dernière injection par perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde à 4%. Les cerveaux ont été ensuite prélevés, congelés puis coupés au microtome à congélation en coupes transversales de 50µm

Prélèvement des tissus

Sur les 32 rats, 27 ont été sacrifiés 7 semaines post-injection striatale, et 5 rats hémiparkinsoniens sacrifiés 15 semaines post-lésion DA. Les animaux ont été sacrifiés par injection létale de pentobarbital et perfusés en intracardiaque avec un volume de 200-300ml de solution saline 0.9% hépariné suivi d'un volume de 300-400ml de paraformaldéhyde à 4%

dans du PB 0.1M. Les cerveaux ont ensuite été prélevés et post-fixés toute la nuit dans la même solution de fixateur. Les cerveaux ont été transférés dans des solutions de PBS 0.1M – Sucrose puis congelés dans de l'isopentane et conservés à -80°C. Des coupes transverses de 40µm ont ensuite été réalisées au microtome à congélation.

Immunohistochimie

Les neurones et les fibres DA ont été mis en évidence par immunomarquage de la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme limitante de biosynthèse des catécholamines, chez le rat et le macaque. Brièvement, des séries de coupes régulièrement espacées (400µm pour le rat et 500µm pour le singe) recouvrant l'étendue du striatum et de la SNc sont rincées, incubées dans une solution contenant du peroxyde d'hydrogène (3%) et du méthanol (20%) afin d'inhiber les peroxydases endogènes, puis dans du sérum bovin (BSA 4%) afin de bloquer les sites de liaison non spécifiques des anticorps. Les coupes sont incubées pendant 48h avec l'anticorps primaire monoclonal anti-TH fait chez la souris (1/500; Immunostar, Hudson, WI), puis 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-souris fait chez la chèvre (1/500). Afin d'intensifier le marquage, la réaction est amplifiée, pendant 1 heure à température ambiante, à l'aide d'un kit avidine-biotine (Vectastain ABC peroxidase kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Le marquage est ensuite révélé avec une solution contenant du diaminobenzidine (DAB à 50mg/ml, Sigma). Les coupes sont alors rincées, montées sur lames gélatinées, séchées, déshydratées puis montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage (Eukitt). Les coupes ont également été contre-colorées au crésyl-violet ou au rouge neutre.

Puisque tous les neurones cholinergiques du PPN contiennent la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate diaphorase (NADPH) (Geula et coll., 1993), nous avons choisi de les mettre en évidence par histochimie de la NADPH selon la méthode publiée (Hirsch et coll., 1987) sur une série de coupes régulièrement espacées.

Des marquages en immunofluorescence de la microglie ont été réalisés afin de détecter une possible neuroinflammation. Des coupes régulièrement espacées ont été montées sur lame, séchées toute la nuit, réhydratées, saturées et incubées 48h avec 3 anticorps primaires : 1) un anticorps polyclonal anti-Iba1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1 ; 1/500 ; WAKO, USA) fait chez le lapin, afin de marquer la microglie ; 2) soit un anticorps polyclonal anti-ChAT (Choline Acétyl Transferase ; 1/500 ; AB144P, Merck Millipore) fait chez la chèvre afin de marquer les neurones cholinergiques, soit l'anticorps anti-TH utilisé précédemment ; 3) soit un anticorps monoclonal anti-NeuN (Neuronal Nuclear protein ;

1/500 ; Merck Millipore) fait chez la souris, afin d'identifier tous les neurones. Les coupes ont été ensuite incubées avec les anticorps secondaires appropriés : 1) anticorps anti-lapin fait chez l'âne (1/500 ; Alexa fluor 488 ; Life Technologies) ; 2) anticorps anti-chèvre fait chez l'âne (1/500 ; Alexa fluor 455 ; Life Technologies) ; 3) anticorps anti-souris fait chez l'âne (1/500 ; Alexa fluor 657 ; Life Technologies) ; et dans du DAPI (4',6'-diamino-2-phenylindole) pour marquer tous les noyaux. Les coupes sont rincées puis recouverte d'une lamelle avec un milieu de montage aqueux (Fluoromount)

Les neurones en souffrance neuronale ont été visualisés grâce au kit Flurojade-C (Fluoro-Jade C Ready-to-dilute staining kit ; Biosensis, Thebarton, South Australia) sur une série de coupes (Schmued et coll., 2005). Cette technique étant plus résolutive que les précédente avec moins de bruit de fond et une meilleure spécificité du marquage.

Quantification

Les neurones et fibres TH-positifs ainsi que les neurones NADPH-positifs ont tous été quantifiés. Sur toutes les coupes marquées, la SN, le striatum et le PPN ont été délimités anatomiquement et les contours comparés d'un individu à l'autre afin de vérifier que la délimitation était similaire chez tous les d'animaux.

La densité optique (DO) des fibres TH-positives a été mesurée dans toutes les coupes de striatum par le logiciel d'analyse d'image MCID (MCID Image Analysis Software Solutions for Life Sciences, Interfocus Imaging Ltd., Linton, UK). La DO du striatum d'animaux lésés a été comparée à la DO des animaux sham dont la valeur a été ramenée à 100%.

La quantification des neurones TH-positifs a été réalisée par stéréologie non-biaisée (Mercator, Exploranova, La Rochelle, France) sur 6 coupes régulièrement espacées couvrant tout l'axe antero-postérieur de la SN Par contre, la délimitation du PPN n'étant pas évidente, tous les neurones NADPH-positifs présents dans la formation réticulée du mésencéphale ont été comptabilisés sur chacune des 5 coupes du PPN, régulièrement espacées et couvrant tout l'axe antéro-postérieur de la structure par le logiciel Mercator (Exploranova, La Rochelle, France). Un facteur de correction a été ensuite appliqué (Abercrombie correction factor) afin de compenser le fait que le même neurone puisse être compté dans des sections adjacentes (Francois et coll., 1999).

Afin d'évaluer une éventuelle atrophie des neurones TH-positifs après lésion du PPN, nous avons mesuré le diamètre des corps cellulaires de la SNc. Nous avons préféré réaliser cette mesure sur des corps cellulaires mis en évidence après contrecoloration au Crésyl violet plutôt que sur des coupes TH-positives car la présence de larges dendrites TH-positives

émanant du corps cellulaire n'aurait pas permis une mesure précise du diamètre. Ces mesures ont été réalisées à l'objectif x40 (n=60 neurones par animal) en utilisant une caméra Lucida, et ce sur des coupes de 4 macaques contrôles et 3 macaques avec une lésion du PPN.

Analyses des données

Toutes les valeurs sont exprimées en valeur moyenne $\pm$ l'erreur standard à la moyenne (SEM) ou en pourcentage $\pm$ SEM. Toutes les analyses statistiques ont été faites en utilisant le logiciel SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA). Les comparaisons entre deux groupes (groupe lésé vs groupe contrôle), ont été effectuées avec le test non paramétrique de Mann-Whitney. Celles au sein d'un même groupe (hémisphère lésé vs hémisphère sham) ont été effectuées avec le test non paramétrique de Wilcoxon pour échantillons appariés. Les comparaisons entre trois groupes ont été effectuées avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test U de Mann-Whitney en cas de différences statistiquement significatives.

Les corrélations entre le nombre de neurones TH-positifs de la SNc et le nombre de neurones NADPH-positifs du PPN ont été analysées par le coefficient de corrélation de Pearson mais également par le coefficient de corrélation de Spearman afin de vérifier la conformité des résultats. Aucun point aberrant n'a été détecté et la significativité des corrélations a été évaluée. Dans toutes les analyses l'hypothèse nulle a été rejetée pour une valeur de $p \leq 0,05$.

III. Résultats obtenus

A. Comparaison entre animaux contrôles et sham

En premier lieu, nous avons vérifié que l'injection de solution saline, sham, ne provoque pas de perte des neurones DA ou cholinergiques. Aucune différence n'a été observée concernant la densité optique (DO) des fibres TH-positives du striatum, le nombre de neurones TH-positifs dans la SNc et le nombre de neurones NADPH-positifs dans le PPN, entre les hémisphères ayant reçu une injection sham (n=5) et les hémisphères controlatéraux, ou les hémisphères d'animaux contrôles (n=2 rats, 4 hémisphères) (n'ayant subi aucune chirurgie). Les données du groupe sham et du groupe contrôle ont donc été regroupées et considérées comme le groupe sham (n=7, 14 hémisphères).

Aucune différence de marquage de Iba1, marqueur microglial, n'a été observée au niveau de la SNc et du PPN après lésion 6-OHDA et/ou urotensine par rapport aux animaux sham, suggérant qu'il n'y pas de signes de neuroinflammation à 7 semaines post-lésion. Néanmoins, des cellules microgliales ont été observées le long du passage de l'aiguille d'injection, caractéristique retrouvée chez tous les animaux injectés et correspondant au tissu cicatriciel (*Figure 20A*).

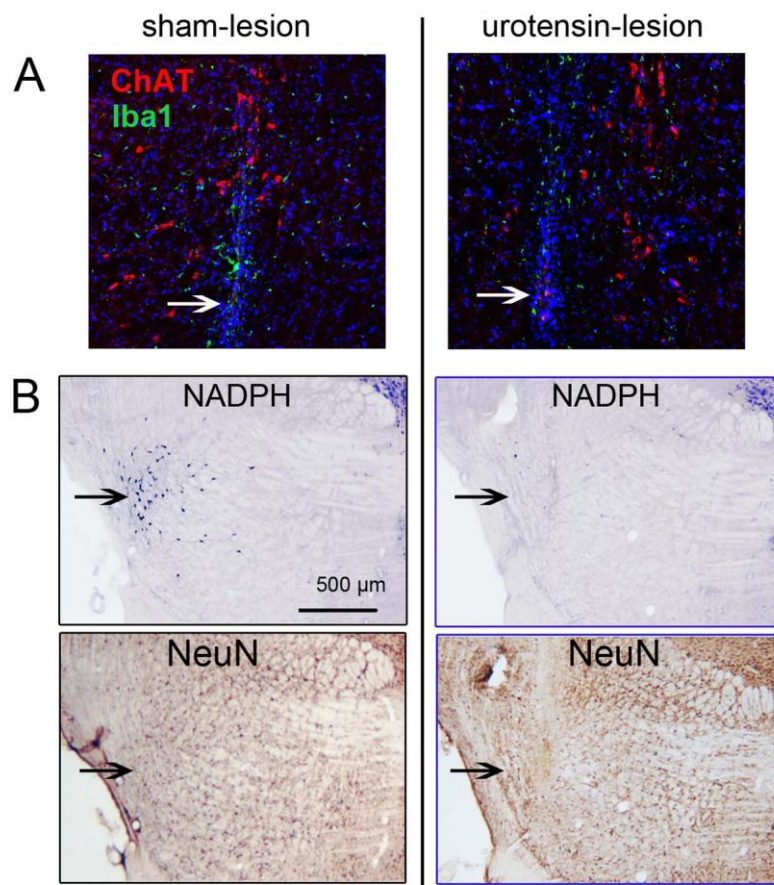
B. Perte des neurones DA de la SNc de rats après lésion cholinergique bilatérale du PPN

Les hémisphères de rats dont la lésion des neurones cholinergiques du PPN était inférieure à 20% ont été retirés de l'étude (5 hémisphères). Le groupe lésé à l'urotensine est donc composé de 5 rats lésés de façon unilatérale et de 3 rats lésés bilatéralement (n=11 hémisphères). Les résultats ont donc été exprimés par hémisphères de rats lésés en comparaison aux hémisphères de rats sham.

L'injection de toxine a provoqué une perte de neurones NADPH-positifs de 33% en moyenne (n=11 hémisphères) (*Figure 21 A,D, Tableau 1*). La perte était généralement

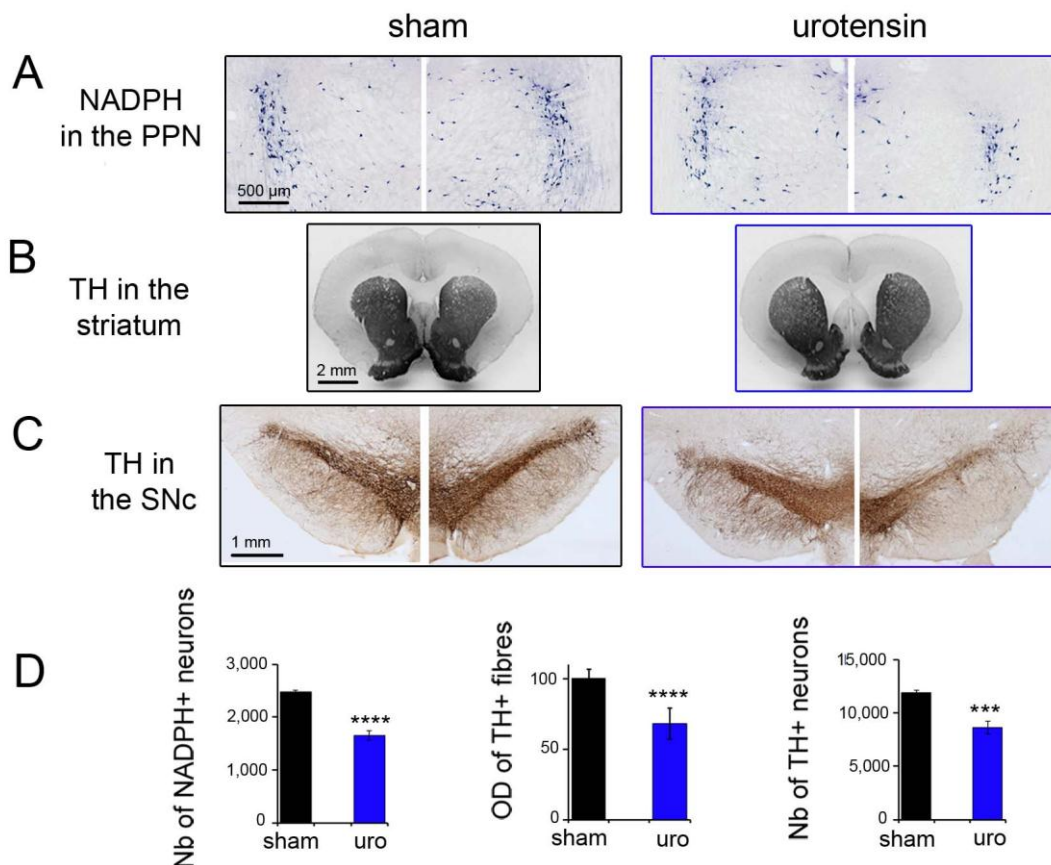
localisée au centre de la structure ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis). Afin de vérifier la spécificité de l'urotensine pour les neurones cholinergiques du PPN, des coupes adjacentes à celles utilisées pour visualiser les neurones NADPH-positifs ont été marquées avec l'anticorps anti-Neuronal Nuclei (NeuN) spécifique des neurones. Aucune perte visible de neurones non-cholinergiques n'a été observée sur les coupes NeuN de rats lésés à l'urotensine comparée à des rats sham (Figure 20B). Ces données confirment que la toxine utilisée est spécifique des neurones cholinergiques, comme déjà montré chez le rat (Clark et coll., 2007).

Figure 20. (A) Triple marquage fluorescent pour la ChAT (rouge), Iba1 (vert), et DAPI (bleu) au niveau du PPN d'un rat sham et d'un rat lésé dans le PPN. La présence d'Iba1 indique une légère inflammation le long du trajet de l'électrode (flèche). (B) Mise en évidence de neurones NADPH et de neurones marqués avec le marqueur nucléaire NeuN sur des coupes adjacentes d'un rat sham (à gauche) et d'un rat après lésion à l'urotensine (à droite). La présence de NeuN mais l'absence de NADPH indique que la toxine urotensine est bien sélective des neurones cholinergiques (Clark et al., 2007). Les flèches indiquent le bord latéral du PPN sur chacune des coupes.



La lésion cholinergique du PPN a induit ipsilatéralement une perte de fibres TH-positives striatales de 37% (Figure 21B,D) ainsi qu'une perte du nombre de neurones TH-positifs de la SNc de 27% (Figure 21C,D) comparé au groupe sham ($p < 0.005$, Kruskal-Wallis). La perte de fibres et de corps cellulaires TH-positifs observée était homogène et non visible à l'œil nu.

Figure 21. L'injection d'urotensine dans le PPN induit la perte de neurones NADPH-positifs (A), de fibres TH-positives dans le striatum (B), et de neurones TH-positifs dans la SNc (C). (D) Quantification du nombre total de neurones NADPH-positifs dans le PPN, de fibres TH-positives dans le striatum par densité optique (OD) et de neurones TH-positifs dans la SNc d'animaux lésés à l'urotensine (uro, $n=8$ rats, 11 hémisphères) comparés à des animaux sham (sham, $n=7$ rats, 14 hémisphères). *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$, Mann-Whitney U test.



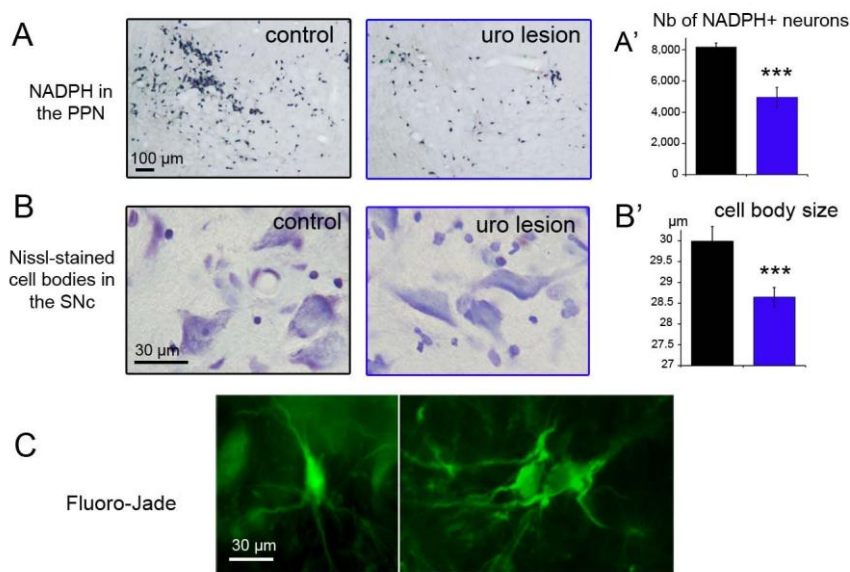
Une contre-coloration au crésyl violet a été réalisée afin de déterminer si la perte des neurones TH-positifs correspondait à une perte neuronale ou à une perte d'expression de la TH. Nous n'avons observé qu'un faible nombre de corps cellulaires présentant un phénotype TH-négatif au sein de la SNc suggérant que la plupart des neurones TH-positifs avaient dégénéré (résultats non illustrés).

C. Atrophie des neurones TH-positifs de la SNc de macaques après lésion cholinergique bilatérale

Une lésion cholinergique bilatérale du PPN de 5 macaques induite par l'injection d'urotensine a provoqué une perte de 39.5% des neurones NADPH-positifs comparé aux animaux contrôles (n=5) ($p < 0.01$, Mann-Whitney U test), comme montré dans la précédente publication de l'équipe (Karachi et coll., 2010). Aucune perte des neurones TH-positifs de la SNc ou de fibres TH-positives du striatum n'a été observée après lésion cholinergique ($p > 0.05$, Mann-Whitney U test) (*Figure 22A,A'*; *Tableau 1*).

Cependant, la taille des neurones TH-positifs a diminué significativement (contrôle : $29.99 \pm 0.36 \mu\text{m}$ de diamètre ; urotensine : $28.65 \pm 0.24 \mu\text{m}$ de diamètre ; $p < 0.005$, Mann-Whitney U test) (*Figure 22B, B'*), l'intensité de la diminution étant corrélée au taux de la lésion du PPN. De plus, des neurones Fluoro-jade-positifs ont été observés au niveau de la SNc, suggérant la présence de neurones en souffrance ou en processus de dégénérescence (*Figure 22C*).

Figure 22. (A) Effets d'une injection d'urotensine dans le PPN d'un macaque comparé à un animal contrôle. (A') Quantification du nombre total de neurones NADPH-positifs. (B) Coupes de SNc contre-colorées montrant la diminution de taille des corps cellulaires de la SNc après lésion du PPN comparé à un contrôle. (B') Diminution de la plus grande longueur des corps cellulaires chez les macaques ayant une lésion à l'urotensine (n=6) comparé à des contrôles (n=5). (C) Neurones fluoro-Jade-positifs présents dans la SNc de macaques après lésions du PPN. * $p < 0.005$, Mann-Whitney U test.**



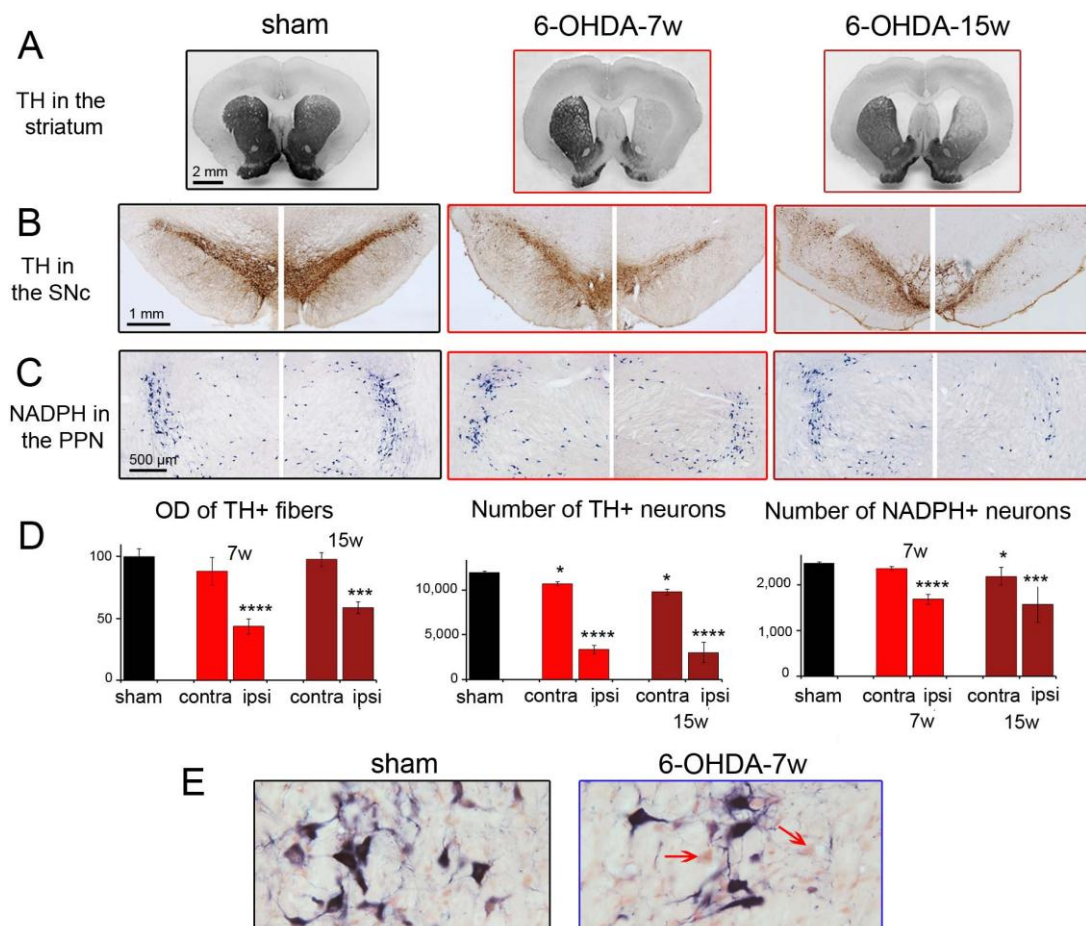
D. Perte des neurones cholinergiques du PPN après lésion DA chez le rat

A 7 semaines post-lésion 6-OHDA, une perte de fibres TH-positives striatales de 51.1% (Figure 23A,D) et de neurones TH-positifs de la SNc ipsilatérale à la lésion de 71.8% (Figure 23B,D) a été retrouvée comparée au groupe sham ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis). L'hémisphère controlatéral à la lésion présentait aussi une perte significative de 10.5% de neurones TH-positifs ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis) (Figure 23B,D). De manière inattendue, le nombre de neurones NADPH-positifs a diminué du côté ipsilatéral à la lésion striatale, 7 semaines post-injection de 6-OHDA (perte de 31.7%) (n=8) ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis; Figure 23C,D).

Afin de déterminer si un temps de survie plus long peut influencer sur le taux de mort cellulaire, 5 rats ont été sacrifiés 15 semaines post-lésion à la 6-OHDA. Chez ces animaux, le taux de perte des fibres TH-positives striatales a atteint 41.1%, et celle de neurones TH-positifs nigraux a atteint 74.7% ($p < 0.005$ and $p < 0.001$, respectivement, Kruskal-Wallis) (*Figure 23A,B,D*). Une perte statistiquement significative de neurones TH-positifs dans la SNc controlatérale à la lésion de 18.1% a également été observée ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis). La densité optique des fibres TH-positives a tendance à augmenter au bout de 15 semaines par rapport à 7 semaines de survie (non significatif), suggérant la mise en place d'une repousse des fibres TH-positives restantes. L'intensité de la perte de neurones NADPH-positifs est plus importante à 15 semaines post-injection 6-OHDA, et a atteint les deux hémisphères avec une perte de 36.2% du côté ipsilatéral à la lésion 6-OHDA ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis) et 11,4% du côté controlatéral ($p < 0.005$, Kruskal-Wallis) (*Figure 23C,D*). Aucune différence significative n'a été trouvée entre les pertes des neurones NADPH-positifs observées à 7 ou à 15 semaines.

Afin de vérifier que la perte des neurones NADPH-positifs chez le rat correspond à une mort neuronale et non à une perte d'expression de NADPH, une contre-coloration au rouge neutre a été réalisée. Nous n'avons observé qu'un faible nombre de corps cellulaires présentant un phénotype NADPH-négatif au sein de la SNc, suggérant que la plupart des neurones NADPH-positifs avaient dégénéré.

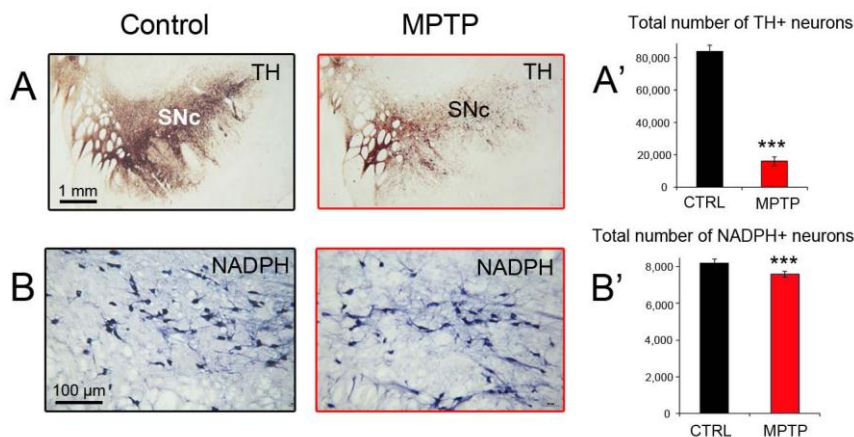
Figure 23. Coupes transverses montrant la perte de fibres TH-positives dans le striatum (A), de neurones TH-positifs dans la SNc (B), et de neurones NADPH-positifs dans le PPN (C) 7 semaines (7w) et 15 semaines (15w) après injection de 6-OHDA dans le striatum. (D) Quantification du nombre de fibres TH-positives dans le striatum mesurées par densité optique (OD), de neurones TH-positifs dans la SNc, et de neurones NADPH-positifs dans le PPN de rats survivant 7 semaines (6-OHDA-7w, n=8 rats, 8 hémisphères ipsi- et 8 controlatéraux), et 15 semaines après la lésion 6-OHDA (6-OHDA-15w, n=5 rats, 5 hémisphères ipsi- et 5 controlatéraux) comparés à des rats sham (sham, n=7 rats, 14 hémisphères). (E) Coupes NADPH contrecolorées au rouge neutre montrant la présence de grand corps cellulaires contrecolorés (flèches) dans le PPN de rats 6-OHDA et non chez les rats sham. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$, Kruskal-Wallis test.



E. Perte des neurones cholinergiques du PPN après lésion DA chez le macaque

La lésion DA bilatérale induite chez le macaque par intoxication au MPTP a provoqué la perte drastique de 81% des neurones TH-positifs de la SNc ($p < 0.005$, Mann-Whitney U test) (Figure 24A,A'). Chez ces primates rendus parkinsoniens, une perte légère mais significative des neurones NADPH-positifs a été quantifiée (7.2%) dans le PPN des deux hémisphères ($p < 0.005$, Mann-Whitney U test) (Tableau 1, Figure 24B,B').

Figure 24. (A) Diminution de TH dans la SNc d'un macaque intoxiqué par le MPTP comparé à un animal contrôle (CTRL). (A') Quantification du nombre total de neurones TH-positifs dans la SNc. (B) Photomicrographies de coupes NADPH dans le PPN d'un macaque intoxiqué par le MPTP comparé à un animal contrôle. (B') Quantification du nombre total de neurones NADPH-positifs montrant la faible diminution significative chez les singes intoxiqués par le MPTP ($n=6$) comparés à des animaux contrôles ($n=5$). *** $p < 0.005$, Mann-Whitney U test.

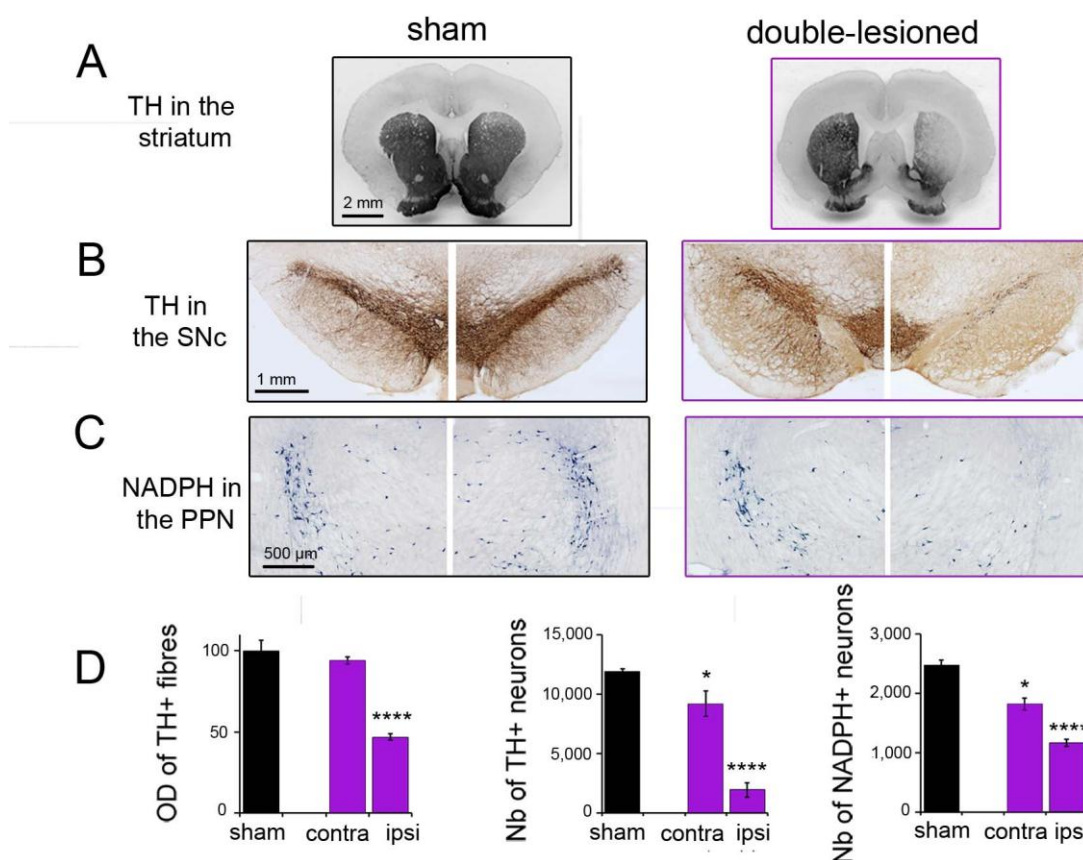


F. Une double lésion, DA et cholinergique, induit une perte plus importante dans les deux systèmes chez le rat

Une lésion cholinergique chez des rats lésés unilatéralement à la 6-OHDA a provoqué une perte drastique de neurones TH-positifs de la SNc de 83.6% et de fibres TH-positives de 52.5% du côté ipsilatéral à la lésion DA comparé aux rats sham ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis) (Figure 25A,B). La perte en TH était plus conséquente après une double lésion par rapport à

une lésion DA seule mais cette différence n'était pas significative. Le nombre de neurones NADPH-positifs a également fortement diminué que ce soit du côté ipsilatéral à la lésion 6-OHDA (53%) ou controlatéral (26.7%) ($p < 0.001$ and 0.05 , respectivement, Kruskal-Wallis) (Figure 25C,D). La perte ipsilatérale était significativement supérieure comparée à celle obtenue après une lésion cholinergique seule ($p < 0.05$).

Figure 25. Effet d'une double lésion cholinergique et DA. Coupes transverses montrant la perte de fibres TH-positives dans le striatum (A) de neurones TH-positifs dans la SNc (B), et de neurones NADPH-positifs dans le PPN (C) après injections de 6-OHDA dans le striatum et d'urotensine dans le PPN.(D) Graphes montrant la perte sévère de fibres TH-positives dans le striatum mesurées par densité optique (DO), de neurones TH-positifs dans la SNc, et de neurones NADPH-positifs dans le PPN de rats doublement lésés ($n=4$ rats ; 4 hémisphères ipsi- et 4 controlatéraux) comparés à des rats sham ($n=7$ rats, 14 hémisphères). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, Kruskal-Wallis test.**



G. Corrélation entre intensité de la perte DA dans la SNc et taux de dénervation cholinergique du PPN chez le rat

Une forte corrélation a été obtenue entre les pertes de neurones TH-positifs et NADPH-positifs observées dans toutes les conditions expérimentales. Le coefficient de corrélation a atteint la valeur de : 0.83 ($p<0.0001$) dans le groupe avec une lésion cholinergique (tous les hémisphères ont été considérés, même ceux dont la lésion cholinergique était inférieure à 20%) ; de 0.88 ($p<0.0001$) dans le groupe avec une lésion DA striatale unilatérale (regroupant les rats lésés 7 et 15 semaines post-lésion) ; de 0.90 ($p<0.0001$) pour les rats doublement lésés (Figure 26) et de 0.78 ($p<0.0001$) pour tous les rats toutes conditions confondues.

Figure 26. Une forte corrélation entre le nombre de neurones TH-positifs et le nombre de neurones NADPH-positifs a été observée dans toutes les conditions expérimentales chez le rat.

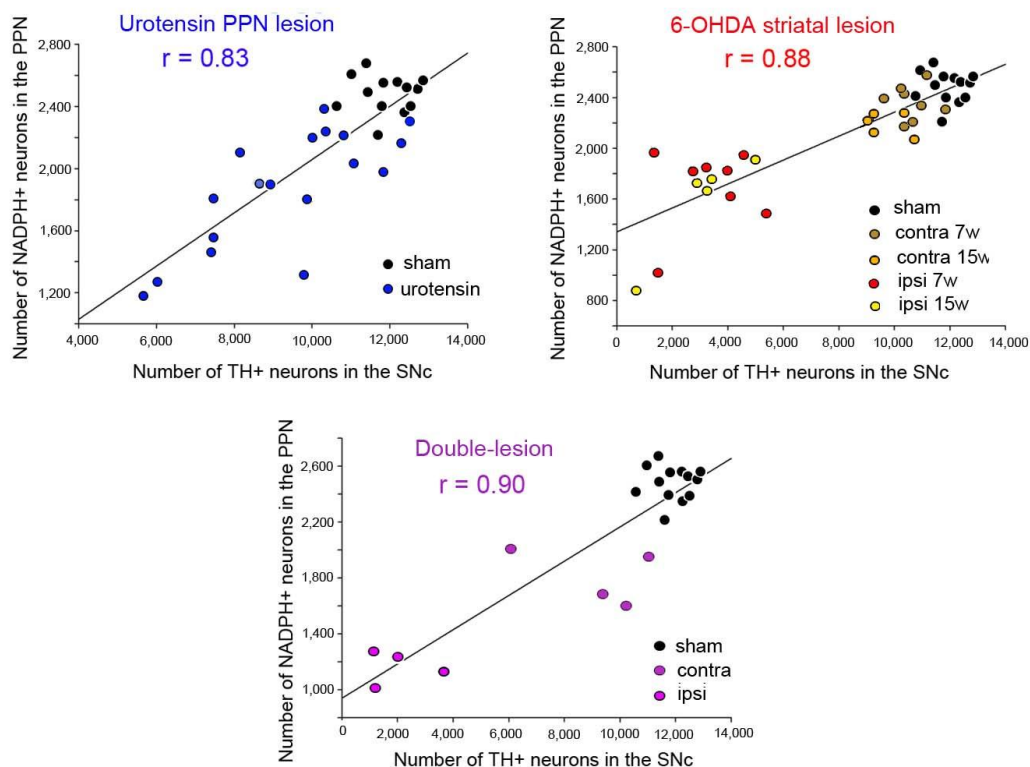


Tableau 1 :

experiments	NADPH		TH DO (%)		TH	
	ipsi	contra	ipsi	contra	ipsi	contra
rats						
sham (n=7)			100 ± 6		11,911 ± 182	
urotensin (n=8)			68 ± 11 (37%) ****		8,649 ± 578 (27%) ****	
6-OHDA-7w (n=8)	1,689 ± 105 (32%) ****	2,474 ± 33	43 ± 6 (56%) ****	88 ± 11	3,358 ± 479 (72%) ****	10,663 ± 219 (10%) *
6-OHDA-15w (n=5)	1,579 ± 392 (36%) *	2,193 ± 195 (11%) ****	59 ± 5 (41%) ****	98 ± 5	3,013 ± 1,137 (75%) ****	9,753 ± 342 (18%) *
Double-lesioned (n=4)	1,162 ± 57 (53%) ****	1,813 ± 100 (27%) *	47 ± 2 (52%) ****	94 ± 2	1,955 ± 596 (84%) ****	9,174 ± 1,067
macaques						
controls (n= 5)		8,178 ± 236			84,150 ± 3,808	
PPN-lesioned (n=5)	4,951 ± 621 (39.5%) **				82,866 ± 2,110	
MPTP-treated (n=6)	7,592 ± 284 (7.2%) ****				16,023 ± 2,796 (81%) ****	

IV. Discussion

A. Une lésion cholinergique du PPN provoque une perte des neurones DA chez le rat et une atrophie des neurones DA chez le singe

Différences de vulnérabilité des neurones DA entre le rat et le macaque

Une dénervation cholinergique du PPN de même ampleur, induite par l'injection de la même toxine, a provoqué une perte de neurones DA chez le rat mais seulement une souffrance neuronale chez le singe, attestée par une atrophie des corps cellulaires DA. Ces différences pourraient être liées à l'espèce. En effet, si toutes les structures sous-corticales décrites chez le primate sont retrouvées chez le rat, elles y sont moins développées et l'importance de leurs connexions peut varier considérablement (Alam et coll., 2011). Ainsi, la proportion et le type des projections du PPN pouvant moduler l'activité des neurones DA de la SNc, diffèrent entre ces deux espèces. Il est intéressant de noter que 25% des afférences de la SNc provenant du PPN sont cholinergiques chez le singe (Lavoie & Parent 1994a), la proportion pourrait atteindre 40% chez le rat (Gould et coll., 1989, Woolf & Butcher 1986) (Pahapill & Lozano 2000). Il est donc possible qu'une lésion purement cholinergique chez le singe ne soit pas suffisante pour induire une dégénérescence DA et des mécanismes de compensations peuvent être mis en jeu par les afférences glutamatergiques. L'idée que la lésion DA puisse mettre plus de temps à s'installer chez le singe n'est pas non plus à exclure. Enfin, chez le rat, la présence d'un nombre plus important de larges corps cellulaires TH-négatifs dans la SNc après lésion cholinergique suggère que certains neurones de la SNc n'ont pas totalement dégénéré mais ont simplement perdu, à ce stade, leur capacité à produire de la TH, devenant ainsi probablement plus vulnérables. Dans ce contexte, il est intéressant de rappeler que la TH, qui est absente d'une large population de neurones DA neuro-mélanisés dans les conditions physiopathologiques de la MP (Hirsch et coll., 1988), a son niveau d'expression régulé par l'activité électrique (Nagamoto-Combs et coll., 1997). La présence de ces neurones ayant perdu la capacité de synthétiser la TH pourrait résulter d'un déficit d'afférences excitatrices cholinergiques dans le modèle rongeur de la maladie comme chez le sujet parkinsonien.

En conclusion, nos résultats suggèrent que de supprimer partiellement l'input excitateur cholinergique des neurones DA chez le rat et le macaque conduit à une souffrance des neurones DA, voire à leur mort.

Comment expliquer la perte DA

Le niveau d'activité électrique des neurones DA de la SNc pourrait être primordial pour leur survie (Michel et coll., 2013). Or, ces neurones ont pour source excitatrice principale les afférences du PPN. Par ailleurs, la stimulation des récepteurs nicotinique à l'acétylcholine des neurones DA nigraux par l'administration systémique (Grenhoff et coll., 1986) ou iontophorétique (Lichtensteiger et coll., 1982) de nicotine augmente le taux de décharge des neurones DA. D'autre part, une stimulation du PPN augmente l'activité électrique des neurones DA (Clarke et coll., 1987) ainsi que la libération striatale de DA (Forster & Blaha 2003). L'ensemble de ces données nous conduit à formuler l'hypothèse qu'une lésion cholinergique du PPN réduit la stimulation nicotinique des neurones DA, conduisant à une diminution de leur activité. Les neurones DA en sous-activité pourraient alors entrer dans une phase de souffrance, certains finissant par dégénérer.

En lien avec cette hypothèse, il a été récemment montré qu'une activation des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine de sous-type type alpha-7, par la nicotine ou un agoniste spécifique, protège les neurones DA vulnérables dans un modèle cellulaire de mort spontanée des neurones DA mésencéphaliques (Toulorge et coll., 2011) et dans un modèle rat 6-OHDA de la MP (Bordia et coll., 2014, Suzuki et coll., 2013). A l'inverse, un antagoniste spécifique du même sous-type de récepteur nicotinique, la méthyllycaconitine, prévient ces effets protecteurs (Suzuki et coll., 2013). Ainsi l'administration systémique d'agonistes des récepteurs alpha-7, pourrait être envisagée comme thérapie neuroprotectrice vis-à-vis des neurones DA. D'un point de vue mécanistique, cette stimulation provoquerait une augmentation modérée de calcium intracellulaire, accompagnée d'une dépolarisation du neurone conduisant à l'activation de voies pro-survies telles que la voie de signalisation PI3k-Akt si on se rapporte aux données de la littérature (Toulorge et coll., 2011). Dans notre modèle expérimental et dans les conditions physiopathologiques de la MP, la mort des neurones cholinergiques du PPN pourrait donc conduire à un déficit de stimulation des neurones DA par défaut d'activation des récepteurs nicotiniques alpha-7, entraînant la souffrance et la mort de ces neurones. Nos propres résultats doivent être, cependant,

confirmés et complétés par des études permettant de caractériser les mécanismes précis conduisant à la mort neuronale.

A l'inverse, puisque les neurones glutamatergiques du PPN sont également en position de moduler l'activité DA, il est possible qu'une lésion cholinergique du PPN induise une hyperactivité compensatrice des neurones glutamatergiques. Cette hyperactivité pourrait être délétère et favoriser la perte des neurones DA par un processus d'excitotoxicité. En conclusion, si un neurone DA a besoin d'un minimum de stimulation pour survivre, un excès de glutamate peut aussi induire sa dégénérescence par excitotoxicité (Assous et coll., 2014).

B. Une lésion DA induit des modifications DA controlatérales

Nos résultats montrent que la perte de neurones DA de la SNc controlatérale à la lésion 6-OHDA était visible dès 7 semaines et s'est intensifiée au bout de 15 semaines. Nos données sont en accord avec de précédentes données de la littérature montrant des modifications controlatérales au niveau de la SNc et du striatum après injection de 6-OHDA chez le rat (Hahn et coll., 1981, Yuan et coll., 2005), et démontrent que l'hémisphère controlatéral à la lésion 6-OHDA ne peut être utilisé comme hémisphère contrôle. L'existence de projections DA controlatérales (Fass & Butcher 1981, Morgan et coll., 1986) pourrait expliquer l'effet controlatéral d'une lésion unilatérale.

C. Mécanismes compensatoire dans le striatum pour palier la perte des fibres DA

La faible augmentation, non significative du nombre de fibres striatales TH-positives observée à 15 semaines par rapport à 7 semaines post-lésion DA pourrait refléter la mise en place d'un mécanisme de compensation des neurones DA sains restants caractérisé par une repousse des arborisations axonales DA au sein du striatum afin de compenser la perte DA (Zeng et coll., 2012).

D. Une lésion DA induit une perte des neurones cholinergiques du PPN

Comparaison avec les données de la littérature

Nos données concordent avec la perte des neurones cholinergiques observée chez des singes âgés intoxiqués par le MPTP (Karachi et coll., 2010) et avec les résultats d'études post-mortem chez des patients parkinsoniens (Hirsch et coll., 1987, Jellinger 1988, Zweig et coll., 1989a). Il est également intéressant de noter que dans un nouveau modèle rongeur de la MP, la mort des neurones de la SN obtenue par injection intra-nigrale de lactacystine, inhibiteur du protéasome, provoque une perte cholinergique du PPN de 61% (Pienaar et coll., 2013). Enfin, nos résultats obtenus chez le rat montrent qu'il existe une importante corrélation entre le taux de dénervation des neurones DA de la SNc et l'intensité de la perte des neurones cholinergiques du PPN ($R=0,88$), corrélation qui avait déjà été décrite chez le patient parkinsonien (Karachi et coll., 2010, Zweig et coll., 1989a).

Cependant, des études similaires réalisées par d'autres équipes de recherche menées sur les mêmes modèles animaux de MP concluent à l'absence de perte cholinergique (Heise et coll., 2005, Herrero et coll., 1993a, Pienaar & van de Berg 2013). Plusieurs arguments peuvent expliquer ces contradictions :

- L'administration d'apomorphine, afin de valider la lésion 6-OHDA par évaluation du comportement de rotation, dans les autres études et non dans la nôtre, pourrait être un autre argument. Compte tenu de l'effet neurotrophique et neuroprotecteur de l'apomorphine chez le rat lésé à la 6-OHDA après administration chronique (Yuan et coll., 2004), il est possible qu'une simple dose atténue la dégénérescence des terminaisons DA striatales, résultant ainsi en une moindre vulnérabilité des circuits neuronaux en aval.
- Nous pouvons également suggérer que la technique de quantification des neurones DA et cholinergiques utilisée par les auteurs est moins précise que la stéréologie non-biaisée utilisée dans notre étude.

- L'utilisation des hémisphères controlatéraux à la lésion comme contrôles est un autre argument. En effet dans l'étude de Heise et coll. (2005), les hémisphères lésés par la 6-OHDA ont été comparés non pas à des hémisphères de rats contrôles ou sham mais aux hémisphères controlatéraux à la lésion. Or, nos résultats et ceux publiés dans la littérature (Hahn et coll., 1981, Yuan et coll., 2005) montrent que l'hémisphère controlatéral à la lésion ne peut être utilisé comme hémisphère contrôle. De plus dans leur étude, le nombre de neurones DA de l'hémisphère controlatéral à la lésion varie considérablement en fonction du temps de survie post-injection. Cette importante variabilité pourrait être expliquée par une mort neuronale induite par l'injection d'un grand volume de solution saline (12 à 16 µL) dans les hémisphères controlatéraux.
- Le délai post-lésion 6-OHDA des rats utilisés dans l'étude de Pienaar et coll., (2013) n'était que de 3 semaines, ce qui pourrait correspondre à un stade où la perte cholinergique n'est pas encore perceptible.
- Le nombre de macaques utilisés dans les deux études de la littérature réalisées sur le singe intoxiqué par le MPTP (3 / 4 macaques MPTP et 2 / 3 animaux contrôles ; (Heise et coll., 2005, Herrero et coll., 1993a) respectivement), est probablement trop faible pour détecter une différence significative. En effet, la perte que nous avons détectée était faible (7%) et n'était significative que lorsqu'un 6^{ème} animal intoxiqué par le MPTP a été rajouté. Aucune statistique n'a d'ailleurs été réalisée par Heise et coll. (2005).

Différences de vulnérabilité des neurones cholinergiques entre le rat et le macaque

Nos résultats ne montrent pas la même intensité de perte des neurones cholinergiques du PPN entre le primate non-humain et le rat parkinsoniens après lésion DA. En dehors des différences inter-espèces pouvant expliquer ces inégalités, notons que les approches lésionnelles utilisées sont différentes. En effet, la cinétique de perte DA induite par un protocole sub-chronique d'injections de MPTP en systémique chez le singe (durant 1 à 2 mois environ) est plus progressive que celle induite par une injection intrastriatale unilatérale de 6-OHDA chez le rat, laissant plus de temps à des mécanismes de compensation de se mettre en

place. De plus le MPTP et la 6-OHDA induisent la mort des neurones DA par des mécanismes différents. En effet, comme expliqué dans la partie II de l'introduction, le MPTP provoque un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale alors que la 6-OHDA est transformée en groupements réactifs à l'oxygène.

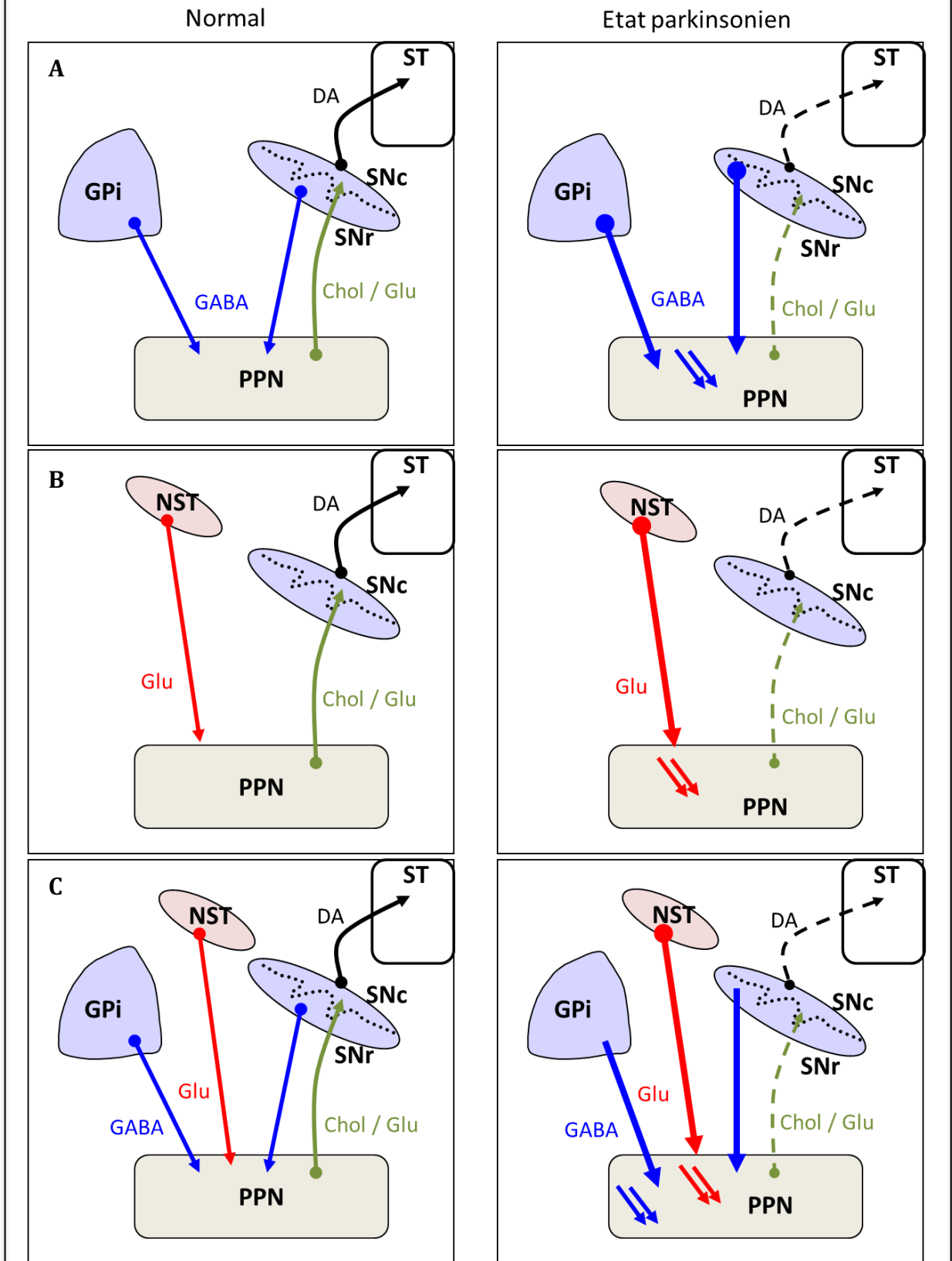
Comment expliquer la perte cholinergique au niveau du PPN

Plusieurs arguments peuvent être avancés pour expliquer la perte cholinergique après lésion DA. 1) La perte des neurones DA cibles pourrait induire la perte cholinergique par dégénérescence rétrograde. 2) Les neurones du PPN reçoivent, en retour, une afférence DA de la SNc et la dégénérescence de cette afférence à l'état parkinsonien (Rolland et coll., 2009) pourrait contribuer au dysfonctionnement cholinergique. 3) De manière indirecte, la perte des neurones cholinergiques du PPN peut être causée par une trop forte inhibition en provenance des voies de sorties des ganglions de la base GABAergiques, du globus pallidus interne et de la SN *pars reticulata*, hyperactives à l'état parkinsonien. Cette hypothèse est en accord avec une étude rapportant une diminution de l'activité métabolique des neurones cholinergiques du PPN (par quantification de l'ARN messager codant pour la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase) chez le singe intoxiqué par le MPTP (Gomez-Gallego et coll., 2007). L'activité électrique étant un facteur clé pour la survie neuronale DA, l'hyperinhibition des neurones du PPN pourrait entraîner leur dégénérescence (*Figure 27 A*).

Par contre, chez le rat 6-OHDA, une augmentation de l'activité métabolique du PPN (Orieux et coll., 2000) ainsi qu'une augmentation du taux de décharge des neurones du PPN accompagné d'un changement du patron de décharge (Breit et coll., 2001) ont été décrits. Ces données chez le rat suggèrent que l'afférence glutamatergique excitatrice majeure en provenance du noyau subthalamique, hyperactif à l'état parkinsonien (Rodriguez et coll., 1998), pourrait également jouer un rôle clé sur l'activité des neurones du PPN. En accord avec cette hypothèse, l'activité augmentée des neurones du PPN observée chez le rat hémiparkinsonien retourne à la normale après lésion du noyau subthalamique (Breit et coll., 2001) (*Figure 27 B*). En résumé, s'il est impossible de déterminer l'influence de l'une ou l'autre des voies de sorties des ganglions de la base sur le taux de décharge des neurones du PPN (*Figure 27 C*), nous pouvons suggérer que leur hyperactivité entraîne une modification de leur patron de décharge. Enfin, on ne peut pas exclure l'influence d'autres structures projetant directement sur le PPN telles que certaines régions du cortex ou encore l'hypothalamus, et qui sont altérées à l'état parkinsonien.

Figure 27. Schéma des différentes hypothèses sur l'impact des afférences des ganglions de la base sur l'activité et la survie des neurones du PPN à l'état parkinsonien par rapport à l'état normal : A. hyperinhibition des voies de sorties des ganglions de la base ; B. hyperactivité excitotoxique du NST ; C. hyperactivité de toutes les afférences des ganglions de la base.

ST : Striatum ; GPi : Globus Pallidus interne ; SNr : Substantia nigra pars compacta ; NST : Noyau subthalamique ; Glu : Glutamate ; Chol : Acétylcholine



Effet d'une lésion unilatérale DA sur le PPN controlatéral

Alors qu'aucune perte de neurones cholinergiques du PPN controlatéral à la lésion DA n'était visible 7 semaines post-lésion DA, 11,4% des neurones cholinergiques controlatéraux dégénèrent à 15 semaines post-lésion. Cet effet controlatéral peut s'expliquer par la projection controlatérale de 40% des neurones du PPN (Beninato & Spencer 1987, Clarke et coll., 1987, Gerfen et coll., 1982, Gould et coll., 1989, Lavoie & Parent 1994c). Des études électrophysiologiques réalisées sur des rats hémiparkinsoniens ont également décrit l'existence d'un changement d'activité du PPN controlatéral à la lésion DA, ce changement ayant pour origine le PPN ipsilatéral (Breit et coll., 2008). D'après leurs résultats, Breit et coll. (2008) suggèrent que le PPN jouerait un rôle important dans la régulation inter-hémisphérique des ganglions de la base et proposent une révision du modèle parkinsonien de lésion unilatérale qui aurait un impact fonctionnel bilatéral.

E. Une double lésion, cholinergique et DA, aggrave la perte neuronale dans les deux systèmes

Combiner une lésion cholinergique bilatérale du PPN à une lésion unilatérale DA nigrostriatale pendant le processus de dégénérescence des neurones DA a induit une exacerbation des pertes DA de la SNc et cholinergique du PPN, et ce aussi bien du côté ipsilatéral que controlatéral à la lésion DA. Ces résultats mettent en avant l'existence d'une forte interrelation entre le système cholinergique pédonculopontin et le système DA nigrostrié. Il existe d'ailleurs un fort de taux de corrélation ($R=0,9$) entre l'intensité de la perte DA et le taux de dénervation cholinergique dans notre étude. Ces résultats sont en accord avec ceux retrouvés en post-mortem sur des patients parkinsoniens (Karachi et coll., 2010, Zweig et coll., 1989a), mettant en évidence l'implication du système cholinergique pédonculopontin dans l'évolution de la MP.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au total, notre travail expérimental a permis de montrer qu'une lésion du système cholinergique pédonculopontin induit une souffrance, voire une mort des neurones DA de la SNc, et qu'à l'inverse une lésion DA provoque une atteinte du système cholinergique. Ce travail de thèse combiné aux données de la littérature renforce l'idée que le PPN est bien une structure faisant partie des ganglions de la base, puisqu'il est interconnecté avec ces structures, et confirme son rôle clé dans la physiopathologie de la MP. Nous avons également montré qu'ajouter une lésion cholinergique à une dégénérescence DA comme ce qui est observé chez les patients parkinsoniens aggrave la dégénérescence des neurones de ces deux structures. Ce travail met ainsi en évidence l'étroite relation entre le PPN et le système DA de la SNc. Bien que nous ayons avancé dans la physiopathologie de la MP, et plus particulièrement dans le rôle des lésions non-DA dans la vulnérabilité des neurones DA, de nombreux points restent à élucider.

Etudier l'impact d'une lésion cholinergique et glutamatergique du PPN sur la survie des neurones DA de la SNc chez le singe

Puisqu'une lésion cholinergique du PPN n'est pas suffisante pour induire une dégénérescence des neurones DA de la SNc chez le singe, il serait par conséquent intéressant d'étudier les effets d'une lésion affectant non seulement les afférences cholinergiques mais aussi les neurones glutamatergiques du PPN sur la survie des neurones DA de la SNc. Sur le plan comportemental, ce type de lésions chez le singe induit des troubles moteurs beaucoup plus importants (Aziz et coll., 1998, Jenkinson et coll., 2004, Kojima et coll., 1997, Matsumura 2001, 2005, Matsumura & Kojima 2001, Munro-Davies et coll., 2001, Munro-Davies et coll., 1999, Nandi et coll., 2002b) que lorsque la lésion est spécifique des neurones cholinergiques (Grabli et coll., 2013, Karachi et coll., 2010). Ces données comportementales confortent l'idée qu'une lésion des neurones glutamatergiques du PPN pourrait également avoir un impact important sur la survie des neurones DA de la SNc.

Identifier les changements d'activité électrique et les mécanismes de mort neuronale DA

Notre étude est basée sur l'hypothèse que l'activité électrique des neurones DA est un facteur essentiel pour leur survie (Michel et coll., 2013). Il serait donc intéressant de mesurer l'activité électrique des neurones DA de la SNc après lésion cholinergique du PPN. La souffrance neuronale des neurones DA détectée chez le singe suggère que le patron de décharge des neurones DA pourrait être altéré.

Il serait également important de caractériser les mécanismes à l'origine de la mort neuronale, et de mettre en évidence les voies de mort neuronale impliquées telles que l'apoptose, le stress oxydatif, le dysfonctionnement mitochondrial ou encore des molécules neuroinflammatoires à l'aide de diverses techniques d'analyse moléculaire.

Déterminer si la lésion cholinergique du PPN est retrouvée dans d'autres modèles animaux de la MP

Récemment, un nouveau modèle très prometteur de la MP a été développé par injection intra-nigrale d'un inhibiteur substrat des transporteurs des acides aminés excitateurs, le L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC). Cet inhibiteur induit la perte sélective et progressive des neurones DA de la SNc, perte qui se bilatéralise plus tardivement, avec une évolution caudo-rostrale (Assous et coll., 2014). Dans ce nouveau modèle sélectif des neurones DA de la SNc, nous pensons qu'il serait intéressant de déterminer s'il existe une dégénérescence des neurones cholinergiques et non-cholinergiques du PPN.

Déterminer s'il existe une perte non-cholinergique après lésion DA

Selon l'étude des Pienaar et coll., (2013), une lésion DA de la SNc par la 6-OHDA chez le rat n'induit pas de perte des neurones cholinergiques du PPN 21 jours post-lésion, mais une dégénérescence des neurones non-cholinergiques (Pienaar & van de Berg 2013). De façon similaire, une dégénérescence des neurones non-cholinergiques a été mise en évidence en post mortem chez le patient parkinsonien (Rinne et coll., 2008). Il serait donc intéressant de quantifier les neurones glutamatergiques et GABAergiques du PPN dans nos modèles de la MP afin de déterminer l'existence ou non d'une perte de neurones non-cholinergiques du PPN.

Mettre en évidence l'origine de la perte neuronale du PPN

Afin de mieux comprendre si la perte des neurones cholinergiques du PPN est une conséquence directe de la mort des neurones DA de la SNc ou si d'autres structures entrent en jeu, il pourrait être envisagé d'effectuer une lésion du noyau subthalamique en plus de la lésion DA. En effet, Breit et coll., 2001 montrent qu'une lésion du noyau subthalamique chez les rats hémiparkinsoniens permet aux neurones du PPN de retrouver une activité électrique normale (Breit et coll., 2001). Une lésion du noyau subthalamique chez nos rats porteurs de lésions DA pourrait permettre aux neurones du PPN de retrouver leur activité normale.

Analyser les effets d'une lésion cholinergique du PPN sur le sommeil

Le PPN et la formation réticulée adjacente sont impliqués dans la régulation des cycles de veille/sommeil et du tonus musculaire. Une récente étude menée au sein de l'équipe a révélé l'existence de profonds changements, mais transitoires, du sommeil paradoxal après lésion cholinergique partielle du PPN chez des singes parkinsoniens (Belaid et coll., 2014). Des troubles du sommeil paradoxal transitoires après lésion non-spécifique du PPN ont également été rapportés chez le rat (Deurveilher & Hennevin 2001). Dans notre étude, en collaboration avec l'équipe de Joelle Adrien, spécialiste du sommeil, certains rats utilisés pour ce travail de thèse ont été implantés de microélectrodes permettant l'enregistrement en continu de l'activité électrique cérébrale (EEG), musculaire (EMG) et oculaire (EOG). Les enregistrements, en cours d'analyses, permettront de comparer l'effet sur le sommeil d'une lésion cholinergique du PPN seule à celui obtenu après double lésion DA et cholinergique. Les résultats pourront être comparés à ceux obtenus chez le singe (Belaid et coll., 2014). Ils permettront également de déterminer si une lésion cholinergique du PPN seule est capable d'induire une diminution du sommeil paradoxal accompagné ou non d'une perte d'atonie musculaire ou s'il est nécessaire de la combiner à la lésion DA.

Criblage de molécules pouvant potentialiser l'effet neuroprotecteur de la nicotine *in vitro*

Un des objectifs de ma thèse avait été d'étudier les effets d'une dénervation cholinergique du PPN sur la survie des neurones DA de la SNc avec une approche *in vitro*. Ce travail a été arrêté faute de temps. Le but de cette étude était d'identifier et de disséquer les effets éventuellement protecteurs de molécules agissant comme des modulateurs des récepteurs à la nicotine dans un modèle de culture cellulaire reproduisant la mort spontanée,

sélective et progressive des neurones DA (Toullorge et coll., 2011). Plusieurs molécules ont été choisies telles que la substance P et des modulateurs allostériques positifs des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine. Cette étude est actuellement en cours au sein du laboratoire. Après avoir trouvé la molécule optimale *in vitro*, le but sera de l'administrer en combinaison avec la nicotine *in vivo* dans nos différents modèles de lésion chez le rat afin d'étudier son potentiel neuroprotecteur.

AXE 2. SYSTEME OREXINERGIQUE ET VULNERABILITE DES NEURONES DA

I. Hypothèses et justifications de la méthodologie utilisée

La perte des neurones orexinergiques est à l'origine de la narcolepsie, pathologie caractérisée par une fragmentation de l'architecture du sommeil avec une durée diminuée du sommeil paradoxal, une somnolence diurne ainsi que des attaques cataplexiques. Or les patients parkinsoniens souffrent de troubles du sommeil similaires pouvant précéder l'apparition des troubles moteurs (Tandberg et coll., 1998). De plus, une perte importante (mais partielle) des neurones orexinergiques a également été retrouvée en post-mortem chez des sujets atteints la MP (Fronczek et coll., 2008, Thannickal et coll., 2007). Cependant, il n'a pas été déterminé si les troubles du sommeil observés chez les patients parkinsoniens sont dus à la perte orexinergique et/ou à la perte de neurones dans d'autres structures impliquées dans la régulation du sommeil. Dans les modèles animaux, l'injection de 6-OHDA chez le rat est capable d'induire une diminution du nombre de neurones orexinergiques (Cui et coll., 2010), mais l'impact d'une telle lésion sur l'apparition de troubles du sommeil n'a pas été évalué. Puisque les macaques intoxiqués par le MPTP développent des troubles du sommeil ressemblant à ceux observés chez les patients parkinsoniens (Barraud et coll., 2009, Belaid et coll., 2014), nous avons émis l'hypothèse qu'une intoxication au MPTP chez le singe pouvait induire une atteinte du système orexinergique, avec diminution du nombre de neurones et de terminaisons orexinergiques innervant les neurones DA de la SNc. Le niveau d'activité électrique pouvant être un facteur clé de la survie des neurones DA (Michel et coll., 2013) et l'orexine étant connue pour agir comme un agent dépolarisant, la diminution des afférences orexinergiques excitatrices pourrait donc augmenter la vulnérabilité des neurones DA à la neurodégénérescence.

Enfin, bien que l'orexine-B n'ait pas les mêmes effets comportementaux, neuroendocriniens et neurochimiques que l'orexine-A (Jones et coll., 2001), les deux peptides colocalisent dans les neurones hypothalamiques chez le rat et le chat (Date et coll., 1999, Zhang et coll., 2001). Nous avons cependant émis l'hypothèse que la plus grande complexité

du cerveau de primates pourrait s'accompagner d'une localisation différentielle des deux peptides.

Les objectifs de cette étude ont donc été 1) de confirmer la colocalisation de l'orexine-A et de l'orexine-B au sein des neurones hypothalamiques ainsi que de vérifier l'innervation des neurones DA de la SNc par les fibres orexinergiques ; et 2) de déterminer s'il existe une perte des fibres et des neurones orexinergiques après lésion DA de la SNc par intoxication au MPTP.

II. Méthodologie

L'ensemble des approches méthodologiques utilisées sont développées dans la publication. J'ai réalisé l'ensemble des techniques de révélation immunohistochimiques et de quantification des neurones et de fibres marquées. Comme indiqué précédemment (méthodologie page 51), j'ai utilisé des tissus de macaques (*Macaca fascicularis*) jeunes sains (n=5) et intoxiqués par le MPTP (n=5), ainsi que des macaques âgés sains (n=4) et intoxiqués par le MPTP (n=3) issus des études de Grabli et coll., 2013 et de Belaid et al., 2014 de notre laboratoire. Ces précédentes études ont montré que les animaux intoxiqués par le MPTP présentaient des troubles de la marche et de la posture (Grabli et coll., 2013), ainsi que des troubles du sommeil similaires à ceux rencontrés chez les patients parkinsoniens (Belaid et coll., 2014). L'orexine A et l'orexine-B ont été mis en évidence (1:500; Santa Cruz Biotechnology) sur des coupes régulièrement espacées d'hypothalamus et de SNc, et la spécificité des anticorps a été testée. Les neurones TH-positifs de la SNc et orexine-positifs de l'hypothalamus ont été quantifiés. Les fibres orexine-positives présentes dans la SNc ont été également quantifiées et le nombre de fibres a été exprimé par mm². Une ANOVA à 2 facteurs a été réalisée pour comparer les effets de l'âge et du traitement MPTP sur le nombre de neurones TH et orexine-A et -B positifs, suivi du test post hoc de Holm-Sidak pour des comparaisons multiples. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer le nombre de terminaisons orexine-positives dans la SNc entre les animaux témoins et intoxiqués par le MPTP.

III. Principaux résultats obtenus

Nos résultats montrent que virtuellement tous les neurones marqués dans l'hypothalamus par l'orexine-A co-exprimaient l'orexine-B. De nombreuses terminaisons marquées par l'orexine-A et -B innervent toute l'étendue du mésencéphale, aussi bien l'aire tegmentale ventrale que la SNc. Ces terminaisons étaient en contact avec les dendrites TH-positives de la SNc, et plus rarement avec les corps cellulaires TH-positifs. Ces données indiquent que les deux peptides sont en position de contrôler et de moduler l'activité des neurones DA de la SNc. Cependant, aucune diminution du nombre de neurones orexine-A ou orexine-B dans l'hypothalamus, ni aucune perte de fibres orexine dans la SNc n'a été observée chez les macaques intoxiqués par le MPTP comparés à des animaux contrôles. En conclusion, une lésion relativement sélective des neurones DA comme celle réalisée chez les macaques intoxiqués par le MPTP n'est pas suffisante pour induire une perte de neurones orexinergiques.

IV. Discussion et perspectives

En premier lieu, nos résultats chez le macaque confirment les données de la littérature concernant la localisation des neurones à orexine au sein de l'hypothalamus (Date et coll., 1999, de Lecea et coll., 1998, Downs et coll., 2007, Peyron et coll., 1998, Thannickal et coll., 2007), la co-expression des deux peptides (orexine-A et -B) dans un même corps cellulaire et une même fibre (Date et coll., 1999, Zhang et coll., 2001), et l'innervation orexinergique de toute l'étendue de la SNc et de l'aire tegmentale ventrale (Date et coll., 1999, Hrabovszky et coll., 2013, Peyron et coll., 1998, Zhang et coll., 2001). Le fait que de nombreuses fibres orexinergiques soient en contact avec des dendrites DA suggère que l'orexine est bien en position de moduler l'activité des neurones DA de la SNc. Cependant nos observations ont été réalisées en microscopie photonique et devraient être confirmées par des analyses ultramicroscopiques.

Il a été montré que l'application d'orexine-A ou -B au niveau de la SNc n'avait pas d'influence sur l'activité électrique des neurones DA dans une préparation de tranches de mésencéphale de rat (Korotkova et coll., 2003). Pourtant les neurones DA de la SNc possèdent les deux sous-types de récepteurs à l'orexine (OXR1 et OXR2) (Marcus et coll., 2001). De plus, des études *in vitro* récentes réalisées au sein de notre équipe ont mis en évidence un effet neuroprotecteur de l'orexine-B vis-à-vis de neurones DA de mésencéphale qui dégénèrent de manière spontanée et sélective (Michel et coll., 2014 abstract SFN). Ces résultats suggèrent que les effets de l'orexine vis-à-vis les neurones DA de la SNc pourraient dépendre d'un paramètre qui n'est pas reproduit dans le modèle de tranches utilisé par Korotkova et collègues (2003) et qui n'est cependant pas nécessaire à l'activation des neurones DA de la VTA. Dans ce contexte, il serait donc intéressant de mieux caractériser les mécanismes d'action de l'orexine vis-à-vis des neurones DA de la SNc ainsi que les voies de signalisation mises en jeu dans ses effets.

Notre principal résultat est l'absence de perte de neurones orexinergiques dans l'hypothalamus ainsi que de fibres orexinergiques projetant sur la SNc chez le singe parkinsonien intoxiqué par le MPTP, contrairement à ce qui est décrit en post-mortem chez les patients parkinsoniens (Fronczek et coll., 2008, Thannickal et coll., 2007). Nous pouvons

donc suggérer que le MPTP ne provoque pas de lésion du système orexinergique, même si un dysfonctionnement des neurones à orexine ne peut être exclu. Ce résultat suggère qu'une lésion limitée au système DA n'est pas suffisante pour provoquer la perte de neurones orexinergiques. Par contre chez le patient parkinsonien, il existe des lésions dans de nombreuses structures non-DA comme le système noradrénergique du locus coeruleus ou cholinergique du PPN. Ces structures recevant une forte innervation orexinergique, l'atteinte du système orexinergique pourrait résulter de ces lésions non-DA. Nos résultats sont également en contradiction avec la perte de neurones orexinergiques (30%) décrite après injection de 6-OHDA dans le MFB chez le rat (Cui et coll., 2010). Il est possible que le mode d'administration sub-chronique utilisé dans notre étude chez le macaque, donc conduisant à une mort DA relativement progressive, permette la mise en place de processus de compensation, alors que les injections de 6-OHDA pratiquées dans le MFB chez le rat ne le permettent pas car conduisant à une mort rapide et presque complète des neurones DA du mésencéphale. Des enregistrements électrophysiologiques chez le macaque à l'état contrôle puis parkinsonien permettraient de déterminer si la dénervation DA induit un changement d'activité des neurones à orexine.

Les troubles du sommeil sont très fréquents chez les patients parkinsoniens et chez le singe intoxiqué par le MPTP (Barraud et coll., 2009, Belaid et coll., 2014). D'après nos résultats, ces troubles du sommeil ne peuvent avoir pour seule origine la perte des neurones orexinergiques, puisqu'elle est absente chez le singe parkinsonien. Le système DA jouant un rôle dans la régulation du cycle veille/sommeil (Dzirasa et coll., 2006), une lésion DA seule pourrait en soi être la cause de l'apparition d'un certain nombre de troubles du sommeil. Le développement d'une toxine spécifique des neurones à orexine pourrait permettre de développer des études lésionnelles du système orexinergique et d'étudier son impact dans la physiopathologie de la MP.

Publication

Sparing of orexin-A and -B neurons in the hypothalamus and of orexin fibers in the substantia nigra of MPTP-treated macaques

Manale Bensaid, Dominique Tandé, Véronique Fabre, Patrick P. Michel, Etienne C. Hirsch, Chantal François *

Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, UM75, U1127, UMR 7225, ICM, F-75013 Paris, France

*** Corresponding author** at: Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, UM75, U1127, UMR 7225, ICM, F-75013 Paris, France
E-mail: chantal.francois@upmc.fr
Phone: 33 1 57 27 45 40; Fax: 33 1 57 27 47 82

Running title: Orexin neurons and fibers in MPTP-treated macaques

Total number of:

- Pages: 25
- Figures: 5
- Tables: 1

Total number of words in:

- The whole manuscript: 3950
- The abstract: 246
- The introduction: 496

Keywords: Hypocretin; Parkinson's disease; orexin projections; dopaminergic neurons

Abstract

Several studies conducted in patients with Parkinson's disease have reported that the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons, which are essential for motor control, is associated with the loss of hypothalamic orexin neurons, which are involved in sleep regulation. In order to better explore mutual interactions between these two systems, we wished to determine in macaques (1) if the two orexin peptides, orexin-A and orexin-B, are distributed in the same hypothalamic cells and if they are localized in nerve terminals that project onto nigral dopaminergic neurons, and (2) if there is a loss of orexin neurons in the hypothalamus and of orexin fibers innervating nigral dopaminergic neurons in macaques rendered parkinsonian by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) intoxication. We show that virtually all cells stained for orexin-A in the hypothalamus co-expressed orexin-B. Numerous terminals stained for both orexin-A and orexin-B immunoreactivity which innervated the whole extent of the ventral tegmental area and substantia nigra pars compacta were found in close proximity to tyrosine hydroxylase-immunoreactive dendrites. These data indicate that orexin-A and -B peptides are in a position to play a role in controlling the activity of nigral dopaminergic neurons. Yet, no loss of orexin-A or of orexin-B neurons in the hypothalamus and no loss of orexin fibers in the substantia nigra pars compacta was found in MPTP-treated macaques when compared to control macaques. We conclude that a relatively selective dopaminergic lesion such as that performed in MPTP-treated macaques is not sufficient to induce a loss of hypothalamic orexin neurons.

Introduction

Orexin, also called hypocretin, is exclusively produced by hypothalamic neurons. The loss of orexin neurons produces narcolepsy, characterized by severe diurnal sleepiness, fragmented nocturnal sleep and attacks of cataplexy. Patients with Parkinson's disease (PD) suffer from similar sleep problems (Tandberg et coll., 1998), often preceding the motor onset of the disease (Thannickal *et al.*, 2007). Damage to the orexin system was found in PD patients (Fronczek et coll., 2007, Thannickal et coll., 2007), but whether sleepiness symptoms are due to orexin neuronal loss itself and/or to the cell death that occurs in various brain structures that also play a role in sleep-wake regulation is unknown. Injection of the selective dopaminergic neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats was reported to induce a decrease in orexin neurons (Cui et coll., 2010), but the impact of this lesion in sleep regulation was not addressed. Since macaques intoxicated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) are known to develop sleep disorders similar to those reported in PD patients (Barraud et coll., 2009, Belaid et coll., 2014), it is of key interest to investigate potential damage to the orexin system in MPTP-treated macaques.

An age-related decrease in orexin inputs to the locus coeruleus associated with a decline in tyrosine hydroxylase mRNA expression was reported in macaques that tend to show sleep fragmentation during aging (Downs et coll., 2007). This suggests that a decrease of excitatory orexinergic inputs to noradrenergic neurons could contribute to the occurrence of sleep disorders. Orexin fibers were also found in the ventral tegmental area (VTA) and the substantia nigra pars compacta (SNc) (Hrabovszky et coll., 2013, Peyron et coll., 1998). Because dopamine (DA) is involved in the regulation of sleep-wake cycles, loss of orexin inputs onto DA neurons may contribute to the suffering of DA neurons in the course of PD and possibly to the deterioration of sleep quality. Moreover, since a number of arguments suggest that DA nigral neurons may die in PD because they become progressively electrically inactive (Michel et coll., 2013), a reduction in excitatory orexinergic inputs could also render nigral DA neurons more vulnerable to degeneration.

Despite the fact that orexin-B can be distinguished from orexin-A on the basis of a number of behavioral, neuroendocrine and neurochemical effects (Jones et coll., 2001), the co-localization of the two peptides in the same neurons is reported in rats and cats (Date et coll., 1999, Zhang et coll., 2002). However, the wiring of the monkey's brain enables more connections and brain complexity to regulate specific tasks and behaviors, suggesting that subtle differences may exist in primates.

In the present study, we specifically sought to determine (1) if the orexin-A and orexin-B peptides are distributed in the same hypothalamic cells and if they innervate nigral dopaminergic neurons, and (2) if there is a loss of orexin neurons in the hypothalamus and of orexin fibers innervating nigral dopaminergic neurons after intoxication with MPTP. Sleep disorders in the MPTP-treated macaques used in the present study have been described elsewhere (Belaid et coll., 2014).

Experimental procedures

Animals

All studies were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 2010 (2010/63/UE). The authorization for conducting our experiments was approved by the Ethics Committee in Animal Experiment Charles Darwin (agreement no. Ce5/2012/049). All macaques (*Macaca fascicularis*) were kept under standard conditions (12-h light/dark cycle with light on at 8:00 a.m., 23 °C and 50% humidity).

The study was performed on five young macaque monkeys (3 to 5 years old) that were intoxicated by MPTP. Four of them were used in another study, and were chronically implanted with a miniaturized telemetry device for continuous and long-term electroencephalographic monitoring of vigilance states at baseline and after MPTP intoxication (Belaid et coll., 2014). We also used brain sections obtained from macaques previously used in another study (Grabli et coll., 2013): five young adult macaques (3 to 5 years old) as a control young group, seven aged macaques, estimated to be 25 to 30 years old according to their dentition and their hair appearance, three of them having being intoxicated with MPTP and four others that were considered as a control aged group.

MPTP intoxication

MPTP injections (0.2–0.4 mg/kg, in NaCl 0.9%) were intramuscular and performed under light anesthesia (ketamine 0.4–0.5 mg/kg). A progressive administration protocol was used, with injections performed at an interval of 3 to 7 days until the emergence of all parkinsonian symptoms. Intoxication was stopped once all motor parkinsonian symptoms had appeared. All young (n=5) and aged (n=3) MPTP-treated macaques developed motor symptoms (akinesia, rigidity, and episodes of tremor), as previously described (Karachi et coll., 2010). Survival time after the last MPTP injection was 2 to 4 months.

Immunohistochemistry

All macaques were deeply anesthetized and intracardially perfused with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS). Brains were removed, immersed in 30% sucrose in PBS, and frozen. Transverse sections 50 µm thick were cut on a freezing microtome and stored at 4 °C in PBS containing sodium azide until immunohistochemical analysis.

For peroxidase immunohistochemistry, series of regularly interspaced (500 µm apart) fresh-frozen sections of macaque brains were incubated in the primary antiserum for 2 days at 4 °C with a monoclonal mouse anti-orexin-A antibody raised against amino acids 34-66 of orexin-A of human origin (1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA) (Maaloud & Meister 2010), a goat polyclonal anti-orexin-B antibody raised against an epitope mapping at the C-terminus of orexin-B of human origin (1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA) (Downs et coll., 2007), or a rabbit polyclonal anti-tyrosine hydroxylase (TH) (1:5000; Immunostar, Hudson, WI). They were then incubated with secondary antibodies from appropriate species. Peroxidase-conjugated anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat secondary antibody immunoreactivity was then visualized using a Vector avidin–biotin complex (ABC) kit (Vector Laboratories, Burlington, CA) with diaminobenzidine (DAB; Sigma) as a chromogen. Sections were counterstained with cresyl violet.

We took advantage of the presence of the pigment neuromelanin in catecholaminergic neurons of macaques (Herrero et coll., 1993c) to visualize the SNc. This allowed a better visualization of orexin terminals among dopaminergic nigral cell bodies than would have been possible using TH immunoreactivity, because the density of TH dendritic expansions hampers visualization of thin orexin terminals.

For fluorescent immunohistochemistry, another series of regularly interspaced sections were processed in the same primary antibodies for orexin-A, orexin-B and TH, and were then incubated with secondary fluorescent antibodies from the appropriate species (all from Life Technologies): donkey anti-goat Alexa Fluor 555, donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 and donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647. After immunocytochemistry, the sections were treated with a solution of Sudan Black B (Allied Chemical, New York, NY) in 70% ethanol for 5 min in order to reduce lipofuscin autofluorescence (Schnell et coll., 1999). Nuclei were stained with 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI). Fluorescent immunoreactivity was observed under a Zeiss Axio Imager M2 microscope, equipped with the ApoTome module and appropriate epifluorescence filters, enabling us to obtain high-resolution z-stack pictures.

Sequences of 10 to 20 optical sections (4.5- μ m-thick slices) were acquired using a digital camera attached to the microscope under x20 and x63 objective lenses.

Antiserum specificity was determined in control experiments in which the primary antiserum was (1) omitted, and (2) pre-absorbed overnight at 4 °C with 1000-fold molar excess of control orexin-A or orexin-B peptides over the IgG fraction of each antibody

Data analysis

TH and orexin cell bodies and fibers were quantified in all control and MPTP-treated macaques. The investigator performing the quantification was blinded to the treatment during the analysis. The sections were matched anatomically in each of the brains, while verifying that the cross-sections of the substantia nigra (SN) and of the hypothalamus were similar in all individuals.

1) Estimation of the total number of TH-positive cell bodies was performed using an unbiased stereology method with a computer-based system (Mercator, ExploraNova, La Rochelle, France) as described previously (Karachi et coll., 2010). The method consists in delineating the SNc in 8 regularly spaced sections (every 500 μ m) covering the antero-posterior extent of the structure of 8 control macaques and 8 MPTP-treated animals. TH-positive cell bodies were counted and sampled according to the so-called fractionator principles, that is, a combination of the optical dissector, a three-dimensional probe used for counting, and fractionator sampling, a scheme involving the probing of a known fraction of the tissue (West et coll., 1991). Optical dissectors were distributed using a systematic sampling scheme. The height of the dissector was 22 μ m. Dissectors (60 μ m long, 60 μ m wide) were separated from each other by 75 μ m x 75 μ m. To be counted, a neuron had to come into focus within the optical dissector, and had to be entirely within the surface area of the dissector or had to cross the dissector border. Only two consecutive borders on four of the dissectors were considered. Mean estimated numbers of TH-positive neurons $\pm$ SEM were then calculated for each group of macaques. Values for coefficient of errors (CE) (West et coll., 1991) were determined.

2) Orexin cell bodies were quantified in 8 regularly spaced sections of the hypothalamus in 9 control macaques and 8 MPTP-treated animals using the same image analysis system (Mercator, ExploraNova, La Rochelle, France). Due to the heterogeneous distribution of orexin cell bodies in the hypothalamus and the difficulty of delineating the structure, the total number of orexin-A or orexin-B cell bodies present in the hypothalamic sections was estimated by plotting all cells per section. The Abercrombie correction factor ($N = n \times T/T +$

D) is defined as follows: N is the actual number of cells, n is the number of counted cells, T is the section thickness (50 μm), and D the average diameter of nuclei (21 μm) was then applied to compensate for double counting in adjacent sections (Francois et coll., 1999).

3) Quantification of orexin fibers in the SNc was performed on four transverse levels for each individual. The method consists of determining the numbers of orexin fibers crossing the perimeter of squares regularly distributed by the computer within the drawn limit of the SNc. Results are expressed as the number of orexin fibers/ mm^2 . Maps of orexin-A and orexin-B cell bodies in the hypothalamus and of their terminals in the SNc were drawn using the same image analysis system.

A two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the effect of age (young and old animals) and treatment (MPTP or not) on the number of TH, orexin-A and orexin-B neurons, followed by multiple comparisons using the Holm-Sidak Method. The Mann-Whitney U test was used to compare the number of orexin terminals in the SNc in controls and in MPTP-treated animals. Data are shown as mean $\pm$ SEM. Statistical significance was considered at a probability (p) value ≤ 0.05 .

Results

Specificity of the antibodies

Incubation of hypothalamic sections with orexin-A antiserum preadsorbed with an excess of the orexin-A peptide, or without orexin-A antiserum, resulted in absence of neuronal staining. The same results were obtained for the orexin-B antibody (Fig. 1A).

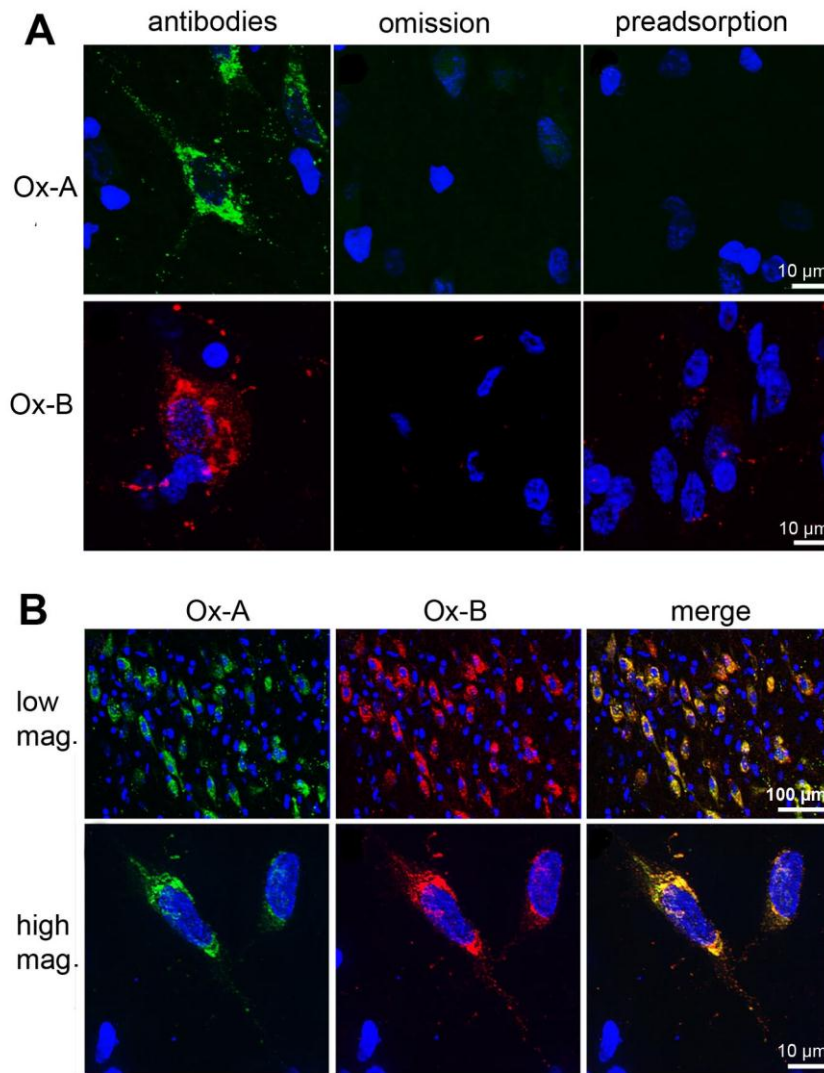
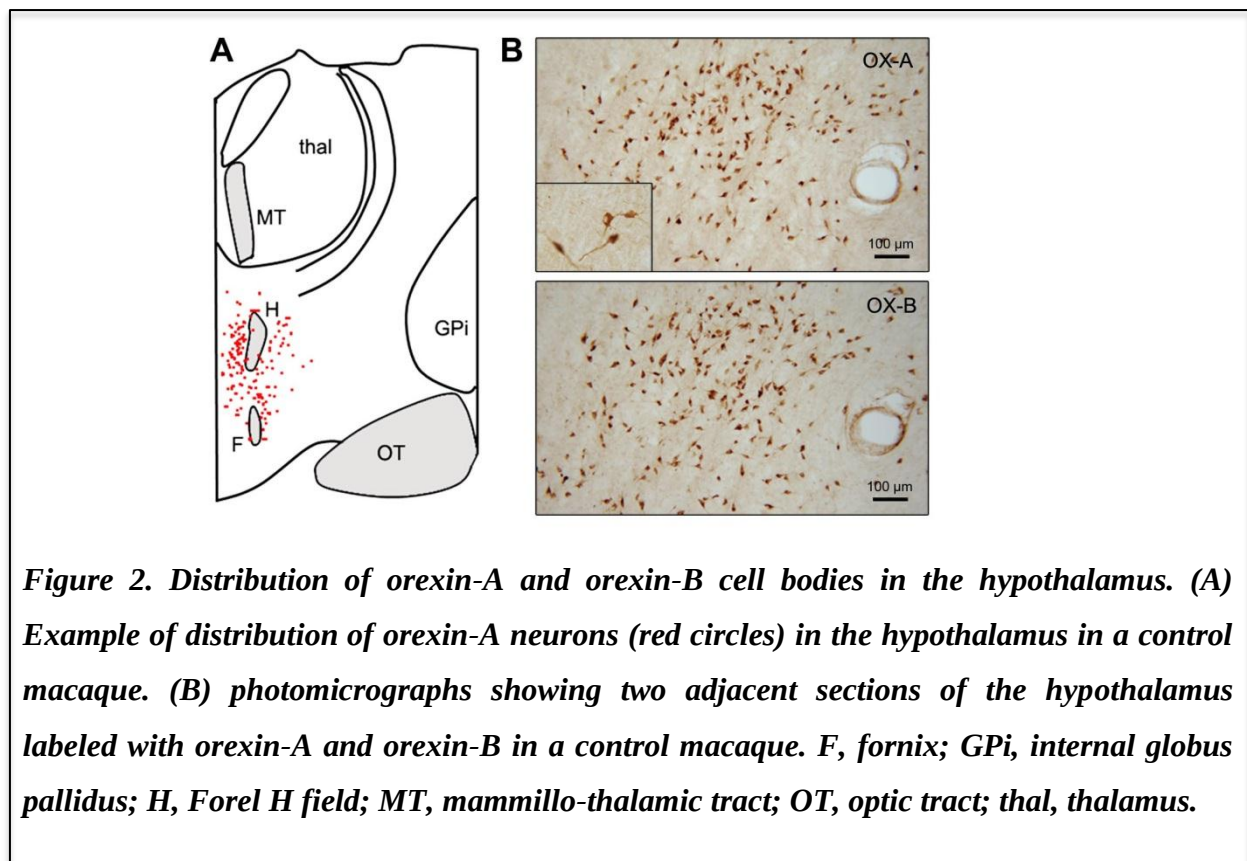


Figure 1. Immunodetection of hypothalamic orexin neurons in the macaque brain using orexin-A and orexin-B antibodies. (A) Specificity of anti-orexin-A (top row, green) and anti-orexin-B antibodies (bottom row, red). Note the strong immunoreactivity observed in orexin-A neurons and in orexin-B neurons, and the absence of immunoreactivity when anti-orexin-A or anti-orexin-B is omitted from the incubation buffer, or when immunostaining is performed with antibodies preadsorbed with orexin-A or orexin-B peptides (B) Immunofluorescent photomicrographs of hypothalamic sections showing colocalization of orexin-A (Ox-A, green) and orexin-B (Ox-B, red) at low (top row) and high magnification (mag.).

Distribution of orexin-A and orexin-B cell bodies

Stained orexin-A and orexin-B cell bodies were found in the perifornical area of the lateral hypothalamus (Fig. 2A), At the most rostral levels, they were located in the lateral part of the hypothalamus. More caudally, they were distributed around the fornix and in the posterior and lateral part of the hypothalamus. Some stained neurons were also detected in the zona incerta. Neurons immunoreactive for orexin-A and those immunoreactive for orexin-B exhibited a similar localization in the hypothalamus (Fig. 2B).



In order to determine if orexin-A and orexin-B are expressed in the same cell bodies, sections were double stained for orexin-A and orexin-B immunoreactivity. On double-fluorescent sections, virtually all of the stained cells expressed both peptides (Fig. 1B). However, a very few neurons appeared to express exclusively orexin-B, albeit faintly (data not shown), whereas no cells containing exclusively orexin-A could be detected. Orexin-A and orexin-B immunoreactivities, which mostly appeared granular, were distributed throughout the cell body excluding the nucleus and extended along proximal dendrites.

Distribution of orexin-A and orexin -B terminal fibers in the mesencephalon

From qualitative observations, the distribution of orexin-A and orexin-B terminal fibers was analyzed in two mesencephalon sections of four control macaques. Numerous stained terminals, characterized by bifurcations and varicosities, were seen throughout the whole rostrocaudal and mediolateral extent of both the VTA and the SNc (Fig. 3B). The density of orexin fibers slightly decreased from medial to lateral SNc but only anteriorly. In both the VTA and SNc, orexin terminals established axo-dendritic appositions onto DA neurons, but a majority of TH cell bodies and dendrites were not surrounded by orexin axons (not shown). Orexin fibers were much more sparsely distributed in the dorsal part of the SN pars reticulata. No difference in the distribution of orexin-A and orexin-B fibers was observed.

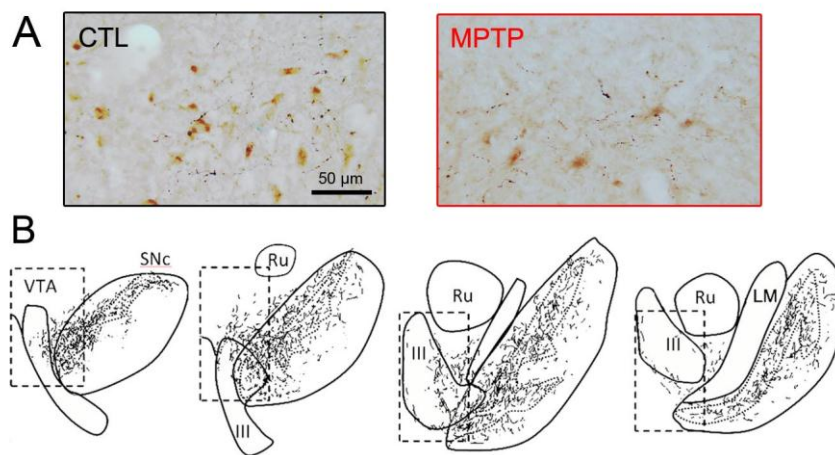
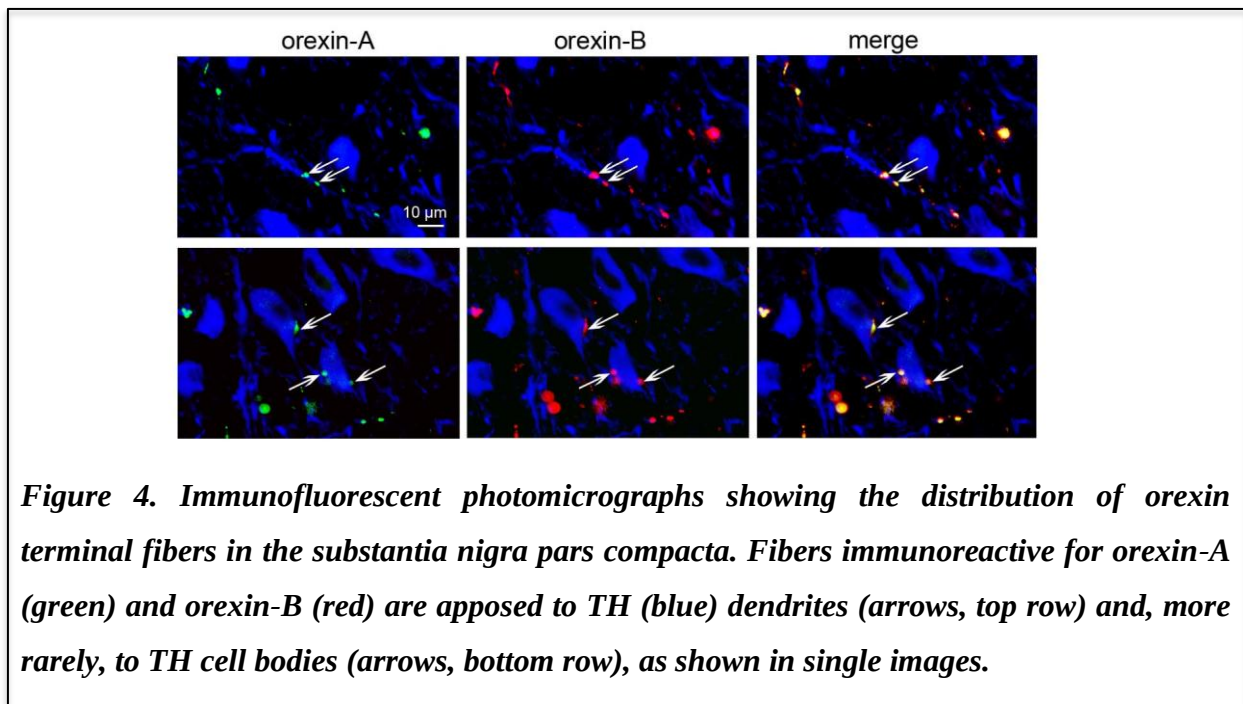


Figure 3. (A) Photomicrographs showing orexin-B varicose fibers (black) within the SNc characterized by cell bodies rich in the pigment neuromelanin (brown) of a control (CTL) and an MPTP-treated animal. Note the decrease in the number of melanized neurons located in the SNc of the MPTP-treated macaque compared to the control animal. (B) Schematic drawings of four rostrocaudal transverse sections illustrating the distribution and relative density of orexin-B terminal fibers at the level of the mesencephalon. III, oculomotor nerve; ML, medial lemniscus; Ru, red nucleus; SNc, substantia nigra pars compacta; VTA, ventral tegmental area.

On double-fluorescent-stained sections, all orexin-A-stained fibers present in the mesencephalon were also immunoreactive for orexin-B (Fig. 4). We conducted apotome analyses to further investigate the localization of orexin terminal fibers in the SNc. Triple

immunolabeling for orexin-A, orexin-B and TH showed that some orexin varicose terminal axons were apposed to TH dendrites and more rarely to TH cell bodies (Fig. 4).



Parkinsonian symptoms and DA cell loss in MPTP-intoxicated macaques

After stabilization of symptoms (6 weeks after the last MPTP injection), all the monkeys developed severe parkinsonism, characterized by hypokinesia (freezing, bradykinesia and reduction of spontaneous activity), rigidity, tremor and postural disturbances. Stereological quantification of TH-positive neurons in the SNc revealed a statistically significant loss of 28% of TH-positive neurons in the SNc of aged control macaques (n=4) compared to young control animals (n=5) ($76,121 \pm 1,125$ neurons, CE=0.01 vs $105,247 \pm 4,429$ neurons, CE=0.04; $p<0.001$), while no difference was found between aged (n=3) and young MPTP-treated animals (n=5) ($20,588 \pm 4,037$ neurons, CE=0.2, vs $17,534 \pm 3,478$ neurons, CE=0.2; $p=0.082$) (Table 1). The loss of TH-positive neurons in the SNc was 83% in young MPTP-treated macaques ($p<0.001$) and 73% in aged MPTP-treated animals ($p<0.001$) compared to their respective controls (Table 1, Fig. 5A).

Quantification of orexin-A and orexin-B neurons and fibers in MPTP-treated macaques

We quantified orexin neurons in the hypothalamus (Fig. 5C-D; Table 1). A two-way ANOVA showed that the total number of orexin-A neurons did not differ significantly between young

and aged control macaques (young control, $10,347 \pm 77$ neurons; aged control, $10,294 \pm 91$ neurons, $p=0.69$) or between young and aged MPTP-treated animals (young MPTP, $10,511 \pm 579$ neurons; aged MPTP, $9,656 \pm 613$ neurons, $p=0.45$). Similar results were obtained for the total number of orexin-B neurons between young and aged control macaques (young control, $11,759 \pm 645$ neurons; aged control, $10,875 \pm 313$ neurons, $p=0.91$) and between young and aged MPTP-treated animals (young MPTP, $11,957 \pm 297$ neurons; aged MPTP, $10,722 \pm 574$ neurons, $p=0.07$).

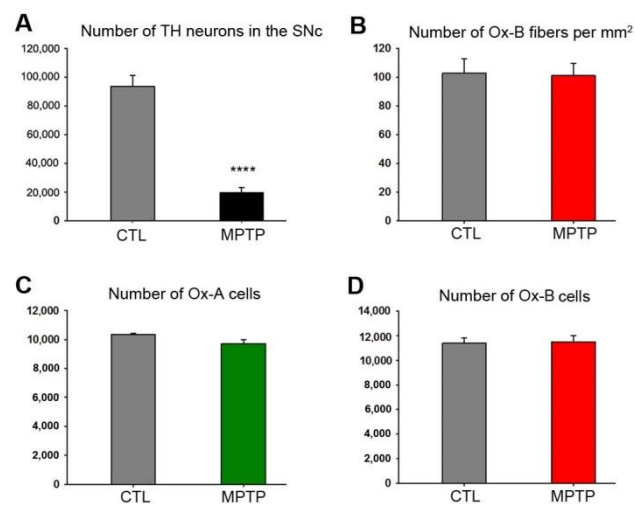


Figure 5. Histograms showing the total number of TH neurons (A) and of orexin-B fibers (B) in the substantia nigra, and of orexin-A (C) and orexin-B cells (D) in the hypothalamus of young control (CTL) and young MPTP-treated macaques. Note the lack of orexin-B fibers and of orexin-A and orexin-B neuronal loss in MPTP-treated macaques compared to control animals ($p>0.05$), while the loss of the total number of TH neurons is statistically significant ($p<0.001$).

Table 1

Total number of TH neurons in the substantia nigra pars compacta and of orexin-A and orexin-B neurons in the hypothalamus of macaques before and after MPTP intoxication

Immunoreactivity	Young CTL (n=5)	Young MPTP (n=5)	Aged CTL (n=4)	Aged MPTP (n=3)
TH neurons	105,247 ± 4,429	17,534 ± 3,478	76,121 ± 1,125	20,588 ± 4,037
Ox-A neurons	10,347 ± 77	10,511 ± 579	10,294 ± 91	9656 ± 613
Ox-B neurons	11,759 ± 645	11,957 ± 297	10,875 ± 313	10,722 ± 574

The number of neurons immunostained for TH and orexin-A (Ox-A) and orexin-B (Ox-B) in the hypothalamus was quantified in young and aged control (CTL) and in young and aged MPTP-treated (MPTP) macaques.

Quantification and statistical analysis did not reveal a significant difference in the density of orexin-B fibers in MPTP-treated macaques compared to controls (MPTP, 101.1 ± 8.6 fibers per mm^2 , control, 102.7 ± 10.0 fibers per mm^2 ; $p = 0.959$) (Figs. 3A and 5B). Since we previously observed that virtually all orexin-stained cells and fibers co-expressed orexin-A and orexin-B, the number of orexin-A fibers was not quantified.

Discussion

Our data first reveal that orexin-A and orexin-B are co-expressed in the same hypothalamic cell bodies in macaques. The specificity of the two primary antibodies for orexin-A and orexin-B that we used was confirmed by control experiments in which the two antibodies were either omitted or preadsorbed with appropriate peptides. Similar results have already been reported for the orexin-B antibody in macaques (Downs *et al.*, 2007).

In the non-human primates, orexin neurons appeared to be essentially restricted to lateral and posterior hypothalamic areas, which is consistent with the distribution of orexin already reported in human and animal studies (Date *et coll.*, 1999, de Lecea *et coll.*, 1998, Downs *et coll.*, 2007, Peyron *et coll.*, 1998, Thannickal *et coll.*, 2007). Moreover, in agreement with previous studies in cats (Zhang *et coll.*, 2002) and in rats (Date *et coll.*, 1999), virtually all orexin cell bodies of the hypothalamus co-expressed orexin-A and orexin-B peptides. Our data thus suggest that the prepro-orexin is enzymatically processed into two

peptides that are then distributed in the same cell bodies. The possibility that a small proportion of cells exclusively express either orexin-A or orexin-B cannot be excluded since a very small number of cells were seen to express, in this case very weakly, only one of the two proteins. The two peptides were found to be distributed throughout the cytoplasm and proximal dendrites. It is possible that the punctate staining was associated with dense core granules, as reported for prepro-orexin (Peyron et coll., 1998). Ultrastructural studies are now needed to detail the subcellular localization of the two proteins.

Within the mesencephalon, orexin fibers, all double stained with orexin-A and orexin-B, not only innervated the VTA but also the entire extent of the SNc, as already reported (Hrabovszky et coll., 2013, Peyron et coll., 1998). No difference in the density of orexin terminals was observed between the VTA and the SNc, as previously reported in rats and humans (Hrabovszky et coll., 2013). Orexin fibers were very often seen in close proximity to TH-positive dendrites and more rarely seen in close proximity to the soma of SNc neurons, suggesting a direct impact of orexin in DA nigral neurons. The fact that DA neurons of the SNc can also be considered as direct targets for orexin action has not been emphasized in the literature until now. This is most likely because the effects of the orexin system are more prominent on the mesolimbic reward pathway than on the nigrostriatal pathway. Accordingly, extracellular and whole-cell patch-clamp recordings of DA neurons after orexin administration demonstrated that DA cells of the VTA show a variety of responses (Korotkova et coll., 2003), whereas those of the SNc remain unaffected when orexin-A or orexin-B is applied (Korotkova et coll., 2002). The latter observation is however surprising since DA neurons of both the VTA and the SNc possess both types of orexin receptors (Marcus et al., 2001). Furthermore, pharmacological studies also revealed robust behavioral effects of orexin when applied in the rodent VTA and an increase in their time spent moving when orexin-A was applied in the SNc of rats (Kotz et coll., 2006). This suggests that the stimulation of SN DA neurons by orexin might be context-dependent, occurring under conditions that possibly require coactivation of other receptors (Toulonge et coll., 2011). In conclusion, even if the precise synaptic relationship between orexin terminal axons and midbrain DA cells must await electron microscopy studies, our findings suggest that orexin is in a position to regulate midbrain DA neurons at the somato-dendritic level of the SNc.

The major finding of the present study is that we did not detect any modification in the number of orexin neurons in the hypothalamus or of orexin fibers terminating in the SN of MPTP-treated macaques, 2 to 3 months after the last injection of MPTP compared to control animals. This is in contrast to the loss of orexin cells reported in patients with PD (Fronczek et

coll., 2007, Thannickal et coll., 2007). This discrepancy may be explained by the occurrence of neuronal losses in many non-DA structures in postmortem brains of parkinsonian patients at end stage of the disease. For example, cholinergic and noradrenergic neurons, which receive dense projections from the orexin system (for review, see (Sakurai 2007), are known to degenerate in PD, leading to dysfunction in various neuronal circuits. Death of orexin neurons may then be regarded as a consequence of these non-DA neuronal losses in PD. In comparison, MPTP is relatively selective for DA neurons since it does not affect brain regions to the same extent as in PD. Thus, MPTP in macaques was reported to induce no loss of cholinergic neurons in the pedunculopontine nucleus or of noradrenergic neurons in the locus coeruleus (Belaïd et coll., 2014, Grabli et coll., 2013, Herrero et coll., 1993b). In contrast, others have described a significant loss of neurons in the dorsal raphe and the thalamus (Villalba et coll., 2014) and of noradrenergic neurons of the locus coeruleus (Masilamoni et coll., 2011). It appears that the MPTP regimen used in the present study was sufficient to induce a severe nigral dopaminergic lesion while sparing orexin neurons in the hypothalamus and noradrenergic neurons in the locus coeruleus (Belaïd *et al.*, 2014). However, the possibility that MPTP only induces a dysfunction of orexin neurons without causing their death cannot be totally ruled out. It is also possible that a more chronic MPTP administration regimen than that used in the present study could favor non-dopaminergic cell death, as already suggested (Masilamoni et coll., 2011). Thus, the use of a monkey model of PD in which non-dopaminergic neuronal populations degenerate should be considered in future studies focusing on the hypothalamic orexinergic system. Nevertheless, our data are of interest as they show that the loss of orexin neurons in the hypothalamus of PD patients is probably not merely the consequence of the deafferentation process occurring in the SN at the level of orexin nerve terminals. The present observation may also suggest that an intrinsic cell death process may affect orexin neurons in the course of PD, the nature of which remains, however, to be determined.

Our results are also in contrast to previous experimental data reporting that a 6-OHDA lesion in rats mimicking the end stage of PD induced a loss of 30% of orexin-A neurons, which started to die only at 3 weeks after surgery (Cui et coll., 2010). These discrepancies may be due to the acute effect of 6-OHDA injected directly into the medial forebrain bundle of rats, which induces a near-complete DA neuronal loss in the whole extent of the mesencephalon. The orexin cell loss that is secondary to the 6-OHDA insult may thus result from an overactivity of various neuronal pathways without any possibility of neural compensation or functional re-organization. In comparison, the chronicity of MPTP

intoxication as performed in our study may allow compensatory changes to occur, resulting in the absence of cell death in the orexin system.

Interest in the orexin system in PD stems from the discovery that peptides orexin-A and orexin-B are crucial regulators of sleep and wakefulness. Diurnal sleepiness and fragmented nocturnal sleep are common sleep disorders observed in parkinsonian humans (Raggi et coll., 2013) and MPTP-treated macaques (Belaid et coll., 2014). Because orexin changes are seen only in PD patients, these sleep symptoms cannot be explained by a reduction of orexinergic inputs, but may result from DA degeneration (Dzirasa et coll., 2006), with a possible involvement of other brain structures. In favor of this hypothesis is the finding that no orexin neuronal loss was detected in aged macaques that display sleep disorders, as already reported (Downs et coll., 2007). The presence of REM sleep behavioral disorder (abnormal behavior that emerges during REM sleep) encountered in some PD patients but not in MPTP-treated macaques (Belaid et coll., 2014) may perhaps explain the difference found in orexin deficit. Indeed, a drastic orexin deficiency was found to be correlated with both REM sleep behavioral disorder and cataplexy (loss of muscle tone during wakefulness) in narcolepsy with cataplexy (Knudsen et coll., 2010). A deficit in orexin would thus lead to sleep motor dysregulation, which is consistent with experiments showing that orexin neurons are strongly involved in muscle-tone control via their projections on spinal motor and locus coeruleus neurons (Mileykovskiy et coll., 2002, Yamuy et coll., 2004). In PD, some patients suffer from REM sleep behavioral disorder in addition to diurnal sleepiness and fragmented nocturnal sleep, but cataplexy appears to be absent (Baumann et coll., 2005). This could explain the partial loss of orexin neurons reported in PD patients compared to the drastic loss that characterizes narcoleptic-cataplectic patients.

References

- Barraud, Q., Lambrecq, V., Forni, C., McGuire, S., Hill, M., Bioulac, B., Balzamo, E., Bezard, E., Tison, F. & Ghorayeb, I. (2009) Sleep disorders in Parkinson's disease: the contribution of the MPTP non-human primate model. *Exp. Neurol.*, **219**, 574-582.
- Baumann, C., Ferini-Strambi, L., Waldvogel, D., Werth, E. & Bassetti, C.L. (2005) Parkinsonism with excessive daytime sleepiness--a narcolepsy-like disorder? *J. Comp. Neurol.*, **252**, 139-145.
- Belaid, H., Adrien, J., Laffrat, E., Tande, D., Karachi, C., Grabli, D., Arnulf, I., Clark, S.D., Drouot, X., Hirsch, E.C. & Francois, C. (2014) Sleep Disorders in Parkinsonian Macaques: Effects of l-Dopa Treatment and Pedunculopontine Nucleus Lesion. *J. Neurosci.*, **34**, 9124-9133.

- Cui, L.B., Li, B.W., Jin, X.H., Zhao, L. & Shi, J. (2010) Progressive changes of orexin system in a rat model of 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease. *Neurosci. Bull*, **26**, 381-387.
- Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., Sakurai, T., Yanagisawa, M. & Nakazato, M. (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 748-753.
- de Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P.E., Danielson, P.E., Fukuhara, C., Battenberg, E.L., Gautvik, V.T., Bartlett, F.S., 2nd, Frankel, W.N., van den Pol, A.N., Bloom, F.E., Gautvik, K.M. & Sutcliffe, J.G. (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **95**, 322-327.
- Downs, J.L., Dunn, M.R., Borok, E., Shanabrough, M., Horvath, T.L., Kohama, S.G. & Urbanski, H.F. (2007) Orexin neuronal changes in the locus coeruleus of the aging rhesus macaque. *Neurobiol. Aging*, **28**, 1286-1295.
- Dzirasa, K., Ribeiro, S., Costa, R., Santos, L.M., Lin, S.C., Grosmark, A., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. & Nicolelis, M.A. (2006) Dopaminergic control of sleep-wake states. *J. Neurosci.*, **26**, 10577-10589.
- Francois, C., Yelnik, J., Tand, D., Agid, Y. & Hirsch, E.C. (1999) Dopaminergic cell group A8 in the monkey: anatomical organization and projections to the striatum. *J. Comp. Neurol.*, **414**, 334-347.
- Fronczek, R., Overeem, S., Lee, S.Y., Hegeman, I.M., van Pelt, J., van Duinen, S.G., Lammers, G.J. & Swaab, D.F. (2007) Hypocretin (orexin) loss in Parkinson's disease. *Brain*, **130**, 1577-1585.
- Grabli, D., Karachi, C., Folgoas, E., Monfort, M., Tande, D., Clark, S., Civelli, O., Hirsch, E.C. & Francois, C. (2013) Gait disorders in parkinsonian monkeys with pedunculopontine nucleus lesions: a tale of two systems. *J. Neurosci.*, **33**, 11986-11993.
- Herrero, M.T., Hirsch, E.C., Javoy-Agid, F., Obeso, J.A. & Agid, Y. (1993a) Differential vulnerability to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine of dopaminergic and cholinergic neurons in the monkey mesopontine tegmentum. *Brain Res.*, **624**, 281-285.
- Herrero, M.T., Hirsch, E.C., Kastner, A., Luquin, M.R., Javoy-Agid, F., Gonzalo, L.M., Obeso, J.A. & Agid, Y. (1993b) Neuromelanin accumulation with age in catecholaminergic neurons from macaca fascicularis brainstem. *Dev. Neuroscience*, **15**, 37-48.
- Hrabovszky, E., Molnar, C.S., Borsay, B.A., Gergely, P., Herczeg, L. & Liposits, Z. (2013) Orexinergic input to dopaminergic neurons of the human ventral tegmental area. *PloS one*, **8**, e83029.
- Jones, D.N., Gartlon, J., Parker, F., Taylor, S.G., Routledge, C., Hemmati, P., Munton, R.P., Ashmeade, T.E., Hatcher, J.P., Johns, A., Porter, R.A., Hagan, J.J., Hunter, A.J. & Upton, N. (2001) Effects of centrally administered orexin-B and orexin-A: a role for orexin-1 receptors in orexin-B-induced hyperactivity. *Psychopharmacology*, **153**, 210-218.

- Karachi, C., Grabli, D., Bernard, F.A., Tande, D., Wattiez, N., Belaid, H., Bardinet, E., Prigent, A., Nothacker, H.P., Hunot, S., Hartmann, A., Lehericy, S., Hirsch, E.C. & Francois, C. (2010) Cholinergic mesencephalic neurons are involved in gait and postural disorders in Parkinson disease. *J. Clin. Invest.*, **120**, 2745-2754.
- Knudsen, S., Gammeltoft, S. & Jennum, P.J. (2010) Rapid eye movement sleep behaviour disorder in patients with narcolepsy is associated with hypocretin-1 deficiency. *Brain*, **133**, 568-579.
- Korotkova, T.M., Eriksson, K.S., Haas, H.L. & Brown, R.E. (2002) Selective excitation of GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat by orexin/hypocretin in vitro. *Regul. Pept.*, **104**, 83-89.
- Korotkova, T.M., Sergeeva, O.A., Eriksson, K.S., Haas, H.L. & Brown, R.E. (2003) Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *J. Neurosci.*, **23**, 7-11.
- Kotz, C.M., Wang, C., Teske, J.A., Thorpe, A.J., Novak, C.M., Kiwaki, K. & Levine, J.A. (2006) Orexin A mediation of time spent moving in rats: neural mechanisms. *Neuroscience*, **142**, 29-36.
- Maolood, N. & Meister, B. (2010) Nociceptin/orphanin FQ peptide in hypothalamic neurones associated with the control of feeding behaviour. *J. Neuroendocrinol.*, **22**, 75-82.
- Masilamoni, G.J., Bogenpohl, J.W., Alagille, D., Delevich, K., Tamagnan, G., Votaw, J.R., Wichmann, T. & Smith, Y. (2011) Metabotropic glutamate receptor 5 antagonist protects dopaminergic and noradrenergic neurons from degeneration in MPTP-treated monkeys. *Brain*, **134**, 2057-2073.
- Michel, P.P., Toulorge, D., Guerreiro, S., Hirsch, E.C. (2013) Specific needs of dopamine neurons for stimulation in order to survive: implication for Parkinson disease. *FASEB J.* **27**, 3414-23.
- Mileykovskiy, B.Y., Kiyashchenko, L.I. & Siegel, J.M. (2002) Muscle tone facilitation and inhibition after orexin-a (hypocretin-1) microinjections into the medial medulla. *J. Neurophysiol.*, **87**, 2480-2489.
- Peyron, C., Tighe, D.K., van den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G. & Kilduff, T.S. (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.*, **18**, 9996-10015.
- Raggi, A., Bella, R., Pennisi, G., Neri, W. & Ferri, R. (2013) Sleep disorders in Parkinson's disease: a narrative review of the literature. *Rev. Neurosci.*, **24**, 279-291.
- Sakurai, T. (2007) The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 171-181.
- Schnell, S.A., Staines, W.A. & Wessendorf, M.W. (1999) Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, **47**, 719-730.
- Tandberg, E., Larsen, J.P. & Karlsen, K. (1998) A community-based study of sleep disorders in patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, **13**, 895-899.

- Thannickal, T.C., Lai, Y.Y. & Siegel, J.M. (2007) Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease. *Brain*, **130**, 1586-1595.
- Toullorge, D., Guerreiro, S., Hild, A., Maskos, U., Hirsch, E.C. & Michel, P.P. (2011) Neuroprotection of midbrain dopamine neurons by nicotine is gated by cytoplasmic Ca²⁺. *FASEB J.*, **25**, 2563-2573.
- Villalba, R.M., Wichmann, T. & Smith, Y. (2014) Neuronal loss in the caudal intralaminar thalamic nuclei in a primate model of Parkinson's disease. *Brain Struct. Funct.*, **219**, 381-394.
- West, M.J., Slomianka, L. & Gundersen, H.J. (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.*, **231**, 482-497.
- Yamuy, J., Fung, S.J., Xi, M. & Chase, M.H. (2004) Hypocretinergic control of spinal cord motoneurons. *J. Neurosci.*, **24**, 5336-5345.
- Zhang, J.H., Sampogna, S., Morales, F.R. & Chase, M.H. (2002) Co-localization of hypocretin-1 and hypocretin-2 in the cat hypothalamus and brainstem. *Peptides*, **23**, 1479-1483

REFERENCES

A

- Abad F, Maroto R, Lopez MG, Sanchez-Garcia P, Garcia AG. 1995. Pharmacological protection against the cytotoxicity induced by 6-hydroxydopamine and H₂O₂ in chromaffin cells. *Eur J Pharmacol* 293: 55-64
- Agid Y, Blin J. 1987. Nerve cell death in degenerative diseases of the central nervous system: clinical aspects. *Ciba Found Symp* 126: 3-29
- Agid Y, Graybiel AM, Ruberg M, Hirsch E, Blin J, et coll. 1990. The efficacy of levodopa treatment declines in the course of Parkinson's disease: do nondopaminergic lesions play a role? *Adv Neurol* 53: 83-100
- Alam M, Schwabe K, Krauss JK. 2011. The pedunculo pontine nucleus area: critical evaluation of interspecies differences relevant for its use as a target for deep brain stimulation. *Brain* 134: 11-23
- Alderson HL, Latimer MP, Winn P. 2006. Intravenous self-administration of nicotine is altered by lesions of the posterior, but not anterior, pedunculo pontine tegmental nucleus. *Eur J Neurosci* 23: 2169-75
- Alderson HL, Latimer MP, Winn P. 2008. A functional dissociation of the anterior and posterior pedunculo pontine tegmental nucleus: excitotoxic lesions have differential effects on locomotion and the response to nicotine. *Brain Struct Funct* 213: 247-53
- Alvarez-Fischer D, Noelker C, Vulinovic F, Grunewald A, Chevarin C, et coll. 2013. Bee venom and its component apamin as neuroprotective agents in a Parkinson disease mouse model. *PLoS One* 8: e61700
- Aravamuthan BR, McNab JA, Miller KL, Rushworth M, Jenkinson N, et coll. 2009. Cortical and subcortical connections within the pedunculo pontine nucleus of the primate *Macaca mulatta* determined using probabilistic diffusion tractography. *J Clin Neurosci* 16: 413-20
- Aravamuthan BR, Muthusamy KA, Stein JF, Aziz TZ, Johansen-Berg H. 2007. Topography of cortical and subcortical connections of the human pedunculo pontine and subthalamic nuclei. *Neuroimage* 37: 694-705
- Arendt T, Bigl V, Arendt A, Tennstedt A. 1983. Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathol* 61: 101-8
- Arnulf I. 2012. REM sleep behavior disorder: motor manifestations and pathophysiology. *Mov Disord* 27: 677-89
- Arnulf I, Ferraye M, Fraix V, Benabid AL, Chabardes S, et coll. 2010. Sleep induced by stimulation in the human pedunculo pontine nucleus area. *Ann Neurol* 67: 546-9
- Assous M, Had-Aissouni L, Gubellini P, Melon C, Nafia I, et coll. 2014. Progressive Parkinsonism by acute dysfunction of excitatory amino acid transporters in the rat substantia nigra. *Neurobiol Dis* 65: 69-81
- Aziz TZ, Davies L, Stein J, France S. 1998. The role of descending basal

ganglia connections to the brain stem in parkinsonian akinesia. *Br J Neurosurg* 12: 245-9

B

- Barcia C, Ros CM, Ros-Bernal F, Gomez A, Annese V, et coll. 2013. Persistent phagocytic characteristics of microglia in the substantia nigra of long-term Parkinsonian macaques. *J Neuroimmunol* 261: 60-6
- Barraud Q, Lambrecq V, Forni C, McGuire S, Hill M, et coll. 2009. Sleep disorders in Parkinson's disease: the contribution of the MPTP non-human primate model. *Exp Neurol* 219: 574-82
- Baumann C, Ferini-Strambi L, Waldvogel D, Werth E, Bassetti CL. 2005. Parkinsonism with excessive daytime sleepiness--a narcolepsy-like disorder? *J Neurol* 252: 139-45
- Beal MF. 2001. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2: 325-34
- Belaid H, Adrien J, Laffrat E, Tande D, Karachi C, et coll. 2014. Sleep Disorders in Parkinsonian Macaques: Effects of l-Dopa Treatment and Pedunculopontine Nucleus Lesion. *J Neurosci* 34: 9124-33
- Ben-Shachar D, Eshel G, Finberg JP, Youdim MB. 1991. The iron chelator desferrioxamine (Desferal) retards 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons. *J Neurochem* 56: 1441-4
- Benabid AL, Le Bas JF, Pollak P. 2003. [Therapeutic and physiopathological contribution of electric stimulation of deep brain structures in Parkinson's disease]. *Bull Acad Natl Med* 187: 305-19; discussion 19-22
- Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J. 1987. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol* 50: 344-6
- Benazzouz A, Hallett M. 2000. Mechanism of action of deep brain stimulation. *Neurology* 55: S13-6
- Beninato M, Spencer RF. 1987. A cholinergic projection to the rat substantia nigra from the pedunculopontine tegmental nucleus. *Brain Res* 412: 169-74
- Beninato M, Spencer RF. 1988. The cholinergic innervation of the rat substantia nigra: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *Exp Brain Res* 72: 178-84
- Bevan MD, Bolam JP. 1995. Cholinergic, GABAergic, and glutamate-enriched inputs from the mesopontine tegmentum to the subthalamic nucleus in the rat. *J Neurosci* 15: 7105-20
- Blandini F, Levandis G, Bazzini E, Nappi G, Armentero MT. 2007. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur J Neurosci* 25: 397-405
- Blanke SR, Huang K, Wilson BA, Papini E, Covacci A, Collier RJ. 1994. Active-site mutations of the diphtheria toxin catalytic domain: role of histidine-21 in nicotinamide adenine dinucleotide binding and ADP-ribosylation of elongation factor 2. *Biochemistry* 33: 5155-61
- Blum D, Torch S, Nissou MF, Benabid AL, Verna JM. 2000. Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. *Neurosci Lett* 283: 193-6
- Bordia T, McGregor M, Papke RL, Decker MW, Michael McIntosh J, Quik M. 2014. The alpha7 nicotinic receptor agonist ABT-107 protects against

- nigrostriatal damage in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Exp Neurol*
- Borisenko GG, Kagan VE, Hsia CJ, Schor NF. 2000. Interaction between 6-hydroxydopamine and transferrin: "Let my iron go". *Biochemistry* 39: 3392-400
- Boutrel B, Kenny PJ, Specio SE, Martin-Fardon R, Markou A, et coll. 2005. Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 19168-73
- Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K. 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318: 121-34
- Breit S, Bouali-Benazzouz R, Benabid AL, Benazzouz A. 2001. Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway induces an increase of neuronal activity of the pedunculopontine nucleus, which is reversed by the lesion of the subthalamic nucleus in the rat. *Eur J Neurosci* 14: 1833-42
- Breit S, Martin A, Lessmann L, Cerkez D, Gasser T, Schulz JB. 2008. Bilateral changes in neuronal activity of the basal ganglia in the unilateral 6-hydroxydopamine rat model. *J Neurosci Res* 86: 1388-96
- Bridoux A, Moutereau S, Covali-Noroc A, Margarit L, Palfi S, et coll. 2013. Ventricular orexin-A (hypocretin-1) levels correlate with rapid-eye-movement sleep without atonia in Parkinson's disease. *Nat Sci Sleep* 5: 87-91
- Brisbare-Roch C, Dingemanse J, Koberstein R, Hoefer P, Aissaoui H, et coll. 2007. Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs and humans. *Nat Med* 13: 150-5
- Brown RG, Marsden CD. 1988. Internal versus external cues and the control of attention in Parkinson's disease. *Brain* 111 (Pt 2): 323-45
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ. 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
- ## C
- Cadet JL, Katz M, Jackson-Lewis V, Fahn S. 1989. Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: behavioral and biochemical evidence. *Brain Res* 476: 10-5
- Carlson JD, Pearlstein RD, Buchholz J, Iacono RP, Maeda G. 1999. Regional metabolic changes in the pedunculopontine nucleus of unilateral 6-hydroxydopamine Parkinson's model rats. *Brain Res* 828: 12-9
- Castagnoli N, Jr., Chiba K, Trevor AJ. 1985. Potential bioactivation pathways for the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Life Sci* 36: 225-30
- 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
- Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, et coll. 2007. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 447: 1081-6
- Charara A, Smith Y, Parent A. 1996. Glutamatergic inputs from the pedunculopontine nucleus to midbrain dopaminergic neurons in primates: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde labeling combined with

- postembedding glutamate and GABA immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 364: 254-66
- Charles PD, Gill CE, Davis TL, Konrad PE, Benabid AL. 2008. Is deep brain stimulation neuroprotective if applied early in the course of PD? *Nat Clin Pract Neurol* 4: 424-6
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, et coll. 1999. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98: 437-51
- Chiba K, Trevor A, Castagnoli N, Jr. 1984. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 574-8
- Choi WS, Yoon SY, Oh TH, Choi EJ, O'Malley KL, Oh YJ. 1999. Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP+-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. *J Neurosci Res* 57: 86-94
- Clark SD, Alderson HL, Winn P, Latimer MP, Nothacker HP, Civelli O. 2007. Fusion of diphtheria toxin and urotensin II produces a neurotoxin selective for cholinergic neurons in the rat mesopontine tegmentum. *J Neurochem* 102: 112-20
- Clarke NP, Bolam JP, Bevan MD. 1996. Glutamate-enriched inputs from the mesopontine tegmentum to the entopeduncular nucleus in the rat. *Eur J Neurosci* 8: 1363-76
- Clarke PB, Hommer DW, Pert A, Skirboll LR. 1987. Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic afferents from pedunculopontine nucleus in the rat: neuroanatomical and electrophysiological evidence. *Neuroscience* 23: 1011-9
- Clemens P, Baron JA, Coffey D, Reeves A. 1995. The short-term effect of nicotine chewing gum in patients with Parkinson's disease. *Psychopharmacology (Berl)* 117: 253-6
- Clements JR, Grant S. 1990. Glutamate-like immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculopontine nuclei in the rat. *Neurosci Lett* 120: 70-3
- Cohen G, Heikkila RE. 1974. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 249: 2447-52
- Cohen G, Pasik P, Cohen B, Leist A, Mytilineou C, Yahr MD. 1984. Pargyline and deprenyl prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in monkeys. *Eur J Pharmacol* 106: 209-10
- Corti O, Brice A. 2003. [Parkinson's disease: what have we learned from the genes responsible for familial forms?]. *Med Sci (Paris)* 19: 613-9
- Costa G, Abin-Carriquiry JA, Dajas F. 2001. Nicotine prevents striatal dopamine loss produced by 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra. *Brain Res* 888: 336-42
- Craig AD. 1995. Distribution of brainstem projections from spinal lamina I neurons in the cat and the monkey. *J Comp Neurol* 361: 225-48
- Cui LB, Li BW, Jin XH, Zhao L, Shi J. 2010. Progressive changes of orexin system in a rat model of 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease. *Neurosci Bull* 26: 381-7
- Cutler DJ, Morris R, Sheridhar V, Wattam TA, Holmes S, et coll. 1999. Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides* 20: 1455-70

D

- D'Amato RJ, Alexander GM, Schwartzman RJ, Kitt CA, Price DL, Snyder SH. 1987a. Evidence for neuromelanin involvement in MPTP-induced neurotoxicity. *Nature* 327: 324-6
- D'Amato RJ, Alexander GM, Schwartzman RJ, Kitt CA, Price DL, Snyder SH. 1987b. Neuromelanin: a role in MPTP-induced neurotoxicity. *Life Sci* 40: 705-12
- D'Amato RJ, Benham DF, Snyder SH. 1987c. Characterization of the binding of N-methyl-4-phenylpyridine, the toxic metabolite of the parkinsonian neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, to neuromelanin. *J Neurochem* 48: 653-8
- D'Amato RJ, Lipman ZP, Snyder SH. 1986. Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP⁺ binds to neuromelanin. *Science* 231: 987-9
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, et coll. 1999. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 748-53
- Dauer W, Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909
- Dautan D, Huerta-Ocampo I, Witten IB, Deisseroth K, Bolam JP, et coll. 2014. A major external source of cholinergic innervation of the striatum and nucleus accumbens originates in the brainstem. *J Neurosci* 34: 4509-18
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, et coll. 1979. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1: 249-54
- Davison AJ, Legault NA, Steele DW. 1986. Effect of 6-hydroxydopamine on polymerization of tubulin. Protection by superoxide dismutase, catalase, or anaerobic conditions. *Biochem Pharmacol* 35: 1411-7
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, et coll. 1998. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 322-7
- De Reuck J, De Weweire M, Van Maele G, Santens P. 2005. Comparison of age of onset and development of motor complications between smokers and non-smokers in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 231: 35-9
- Decker DE, Althaus JS, Buxser SE, VonVoigtlander PF, Ruppel PL. 1993. Competitive irreversible inhibition of dopamine uptake by 6-hydroxydopamine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 79: 195-208
- Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 175: 303-17
- Deurveilher S, Hennevin E. 2001. Lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus reduce paradoxical sleep (PS) propensity: evidence from a short-term PS deprivation study in rats. *Eur J Neurosci* 13: 1963-76
- Di Loreto S, Florio T, Scarnati E. 1992. Evidence that non-NMDA receptors are involved in the excitatory pathway from the pedunculopontine region to nigrostriatal dopaminergic neurons. *Exp Brain Res* 89: 79-86
- Di Monte D, Jewell SA, Ekstrom G, Sandy MS, Smith MT. 1986. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) cause rapid ATP depletion in isolated

- hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 137: 310-5
- Di Monte DA, Wu EY, Irwin I, Delanney LE, Langston JW. 1991. Biotransformation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in primary cultures of mouse astrocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 258: 594-600
- Dormont JF, Conde H, Farin D. 1998. The role of the pedunculopontine tegmental nucleus in relation to conditioned motor performance in the cat. I. Context-dependent and reinforcement-related single unit activity. *Exp Brain Res* 121: 401-10
- Doty RL, Deems DA, Stellar S. 1988. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology* 38: 1237-44
- Douhou A, Troadec JD, Ruberg M, Raisman-Vozari R, Michel PP. 2001. Survival promotion of mesencephalic dopaminergic neurons by depolarizing concentrations of K⁺ requires concurrent inactivation of NMDA or AMPA/kainate receptors. *J Neurochem* 78: 163-74
- Downs JL, Dunn MR, Borok E, Shanabrough M, Horvath TL, et coll. 2007. Orexin neuronal changes in the locus coeruleus of the aging rhesus macaque. *Neurobiol Aging* 28: 1286-95
- Drouot X, Moutereau S, Nguyen JP, Lefaucheur JP, Creange A, et coll. 2003. Low levels of ventricular CSF orexin/hypocretin in advanced PD. *Neurology* 61: 540-3
- Dubois B. 1993. [Parkinsonian syndromes. Etiology, diagnosis, treatment]. *Rev Prat* 43: 2439-44
- Dzirasa K, Ribeiro S, Costa R, Santos LM, Lin SC, et coll. 2006. Dopaminergic control of sleep-wake states. *J Neurosci* 26: 10577-89
- E**
- Ebersbach G, Stock M, Muller J, Wenning G, Wissel J, Poewe W. 1999. Worsening of motor performance in patients with Parkinson's disease following transdermal nicotine administration. *Mov Disord* 14: 1011-3
- Edley SM, Graybiel AM. 1983. The afferent and efferent connections of the feline nucleus tegmenti pedunculopontinus, pars compacta. *J Comp Neurol* 217: 187-215
- Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. 1999. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol* 160: R7-12
- Edwards LL, Pfeiffer RF, Quigley EM, Hofman R, Balluff M. 1991. Gastrointestinal symptoms in Parkinson's disease. *Mov Disord* 6: 151-6
- Eidelberg E, Walden JG, Nguyen LH. 1981. Locomotor control in macaque monkeys. *Brain* 104: 647-63
- F**
- Facon E, Steriade M, Wertheim N. 1958. [Prolonged hypersomnia caused by bilateral lesions of the medial activator system; thrombotic syndrome of the bifurcation of the basilar trunk]. *Rev Neurol (Paris)* 98: 117-33
- Fagerstrom KO, Pomerleau O, Giordani B, Stelson F. 1994. Nicotine may relieve symptoms of Parkinson's disease. *Psychopharmacology (Berl)* 116: 117-9
- Falnes PO, Wiedlocha A, Rapak A, Olsnes S. 1995. Farnesylation of CaaX-tagged diphtheria toxin A-fragment as a measure of transfer to the cytosol. *Biochemistry* 34: 11152-9

- Fass B, Butcher LL. 1981. Evidence for a crossed nigrostriatal pathway in rats. *Neurosci Lett* 22: 109-13
- Fenelon G. 1997. [Diagnosis and course (under treatment) of Parkinson disease]. *Rev Prat* 47: 1062-7
- Ferraye MU, Debu B, Fraix V, Goetz L, Ardouin C, et coll. 2010. Effects of pedunculopontine nucleus area stimulation on gait disorders in Parkinson's disease. *Brain* 133: 205-14
- Ferraye MU, Debu B, Fraix V, Krack P, Chabardes S, et coll. 2011. Subthalamic nucleus versus pedunculopontine nucleus stimulation in Parkinson disease: synergy or antagonism? *J Neural Transm* 118: 1469-75
- Ferraye MU, Debu B, Fraix V, Xie-Brustolin J, Chabardes S, et coll. 2008. Effects of subthalamic nucleus stimulation and levodopa on freezing of gait in Parkinson disease. *Neurology* 70: 1431-7
- Filion M, Harnois C. 1978. A comparison of projections of entopeduncular neurons to the thalamus, the midbrain and the habenula in the cat. *J Comp Neurol* 181: 763-80
- Ford B, Holmes CJ, Mainville L, Jones BE. 1995. GABAergic neurons in the rat pontomesencephalic tegmentum: codistribution with cholinergic and other tegmental neurons projecting to the posterior lateral hypothalamus. *J Comp Neurol* 363: 177-96
- Forster GL, Blaha CD. 2003. Pedunculopontine tegmental stimulation evokes striatal dopamine efflux by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the midbrain and pons of the rat. *Eur J Neurosci* 17: 751-62
- Francois C, Yelnik J, Tand, D, Agid Y, Hirsch EC. 1999. Dopaminergic cell group A8 in the monkey: anatomical organization and projections to the striatum. *Journal of Comparative Neurology* 414: 334-47
- Fronczek R, Overeem S, Lee SY, Hegeman IM, van Pelt J, et coll. 2007. Hypocretin (orexin) loss in Parkinson's disease. *Brain* 130: 1577-85
- Fronczek R, Overeem S, Lee SY, Hegeman IM, van Pelt J, et coll. 2008. Hypocretin (orexin) loss and sleep disturbances in Parkinson's Disease. *Brain* 131: e88
- Futami T, Takakusaki K, Kitai ST. 1995. Glutamatergic and cholinergic inputs from the pedunculopontine tegmental nucleus to dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta. *Neurosci Res* 21: 331-42
- ## G
- Gai WP, Geffen LB, Denoroy L, Blessing WW. 1993. Loss of C1 and C3 epinephrine-synthesizing neurons in the medulla oblongata in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 33: 357-67
- Garcia-Rill E, Heister DS, Ye M, Charlesworth A, Hayar A. 2007. Electrical coupling: novel mechanism for sleep-wake control. *Sleep* 30: 1405-14
- Garcia-Rill E, Homma Y, Skinner RD. 2004. Arousal mechanisms related to posture and locomotion: 1. Descending modulation. *Prog Brain Res* 143: 283-90
- Garcia-Rill E, Houser CR, Skinner RD, Smith W, Woodward DJ. 1987. Locomotion-inducing sites in the vicinity of the pedunculopontine nucleus. *Brain Res Bull* 18: 731-8
- Garcia-Rill E, Kinjo N, Atsuta Y, Ishikawa Y, Webber M, Skinner RD. 1990. Posterior midbrain-induced locomotion. *Brain Res Bull* 24: 499-508
- Garcia-Rill E, Skinner RD. 1987a. The mesencephalic locomotor region. I.

- Activation of a medullary projection site. *Brain Res* 411: 1-12
- Garcia-Rill E, Skinner RD. 1987b. The mesencephalic locomotor region. II. Projections to reticulospinal neurons. *Brain Res* 411: 13-20
- Garcia-Rill E, Skinner RD. 1988. Modulation of rhythmic function in the posterior midbrain. *Neuroscience* 27: 639-54
- Garcia-Rill E, Skinner RD, Miyazato H, Homma Y. 2001. Pedunculopontine stimulation induces prolonged activation of pontine reticular neurons. *Neuroscience* 104: 455-65
- Gaspar P, Ben Jelloun N, Febvret A. 1994. Sparing of the dopaminergic neurons containing calbindin-D28k and of the dopaminergic mesocortical projections in weaver mutant mice. *Neuroscience* 61: 293-305
- Gerfen CR, Staines WA, Arbuthnott GW, Fibiger HC. 1982. Crossed connections of the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol* 207: 283-303
- German DC, Dubach M, Askari S, Speciale SG, Bowden DM. 1988. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonian syndrome in Macaca fascicularis: which midbrain dopaminergic neurons are lost? *Neuroscience* 24: 161-74
- Gesi M, Soldani P, Giorgi FS, Santinami A, Bonaccorsi I, Fornai F. 2000. The role of the locus coeruleus in the development of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 655-68
- Geula C, Schatz CR, Mesulam MM. 1993. Differential localization of NADPH-diaphorase and calbindin-D28k within the cholinergic neurons of the basal forebrain, striatum and brainstem in the rat, monkey, baboon and human. *Neuroscience* 54: 461-76
- Gibb WR, Scott T, Lees AJ. 1991. Neuronal inclusions of Parkinson's disease. *Mov Disord* 6: 2-11
- Giladi N, McMahon D, Przedborski S, Flaster E, Guillory S, et coll. 1992. Motor blocks in Parkinson's disease. *Neurology* 42: 333-9
- Glinka Y, Tipton KF, Youdim MB. 1996. Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. *J Neurochem* 66: 2004-10
- Glinka YY, Youdim MB. 1995. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol* 292: 329-32
- Gomez-Gallego M, Fernandez-Villalba E, Fernandez-Barreiro A, Herrero MT. 2007. Changes in the neuronal activity in the pedunculopontine nucleus in chronic MPTP-treated primates: an in situ hybridization study of cytochrome oxidase subunit I, choline acetyl transferase and substance P mRNA expression. *J Neural Transm* 114: 319-26
- Gonon FG, Buda MJ. 1985. Regulation of dopamine release by impulse flow and by autoreceptors as studied by in vivo voltammetry in the rat striatum. *Neuroscience* 14: 765-74
- Gould E, Woolf NJ, Butcher LL. 1989. Cholinergic projections to the substantia nigra from the pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei. *Neuroscience* 28: 611-23
- Grabli D, Karachi C, Folgoas E, Monfort M, Tande D, et coll. 2013. Gait disorders in parkinsonian monkeys with pedunculopontine nucleus lesions: a tale of two systems. *J Neurosci* 33: 11986-93
- Grace AA, Bunney BS. 1984. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* 4: 2866-76
- Granata AR, Kitai ST. 1989. Intracellular analysis of excitatory subthalamic

- inputs to the pedunculopontine neurons. *Brain Res* 488: 57-72
- Granata AR, Kitai ST. 1991. Inhibitory substantia nigra inputs to the pedunculopontine neurons. *Exp Brain Res* 86: 459-66
- Grenhoff J, Aston-Jones G, Svensson TH. 1986. Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. *Acta Physiol Scand* 128: 351-8
- Grillner P, Mercuri NB. 2002. Intrinsic membrane properties and synaptic inputs regulating the firing activity of the dopamine neurons. *Behav Brain Res* 130: 149-69
- Grofova I, Zhou M. 1998. Nigral innervation of cholinergic and glutamatergic cells in the rat mesopontine tegmentum: light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical studies. *J Comp Neurol* 395: 359-79
- Grunberg BS, Krein H, Krauthamer GM. 1992. Somatosensory input and thalamic projection of pedunculopontine tegmental neurons. *Neuroreport* 3: 673-5
- Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, et coll. 2010. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468: 696-700
- ## H
- Hahn Z, Karadi Z, Lenard L. 1981. Striatal dopamine levels after unilateral lesions of the substantia nigra: evidence for a contralateral decrease. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 57: 249-53
- Hallanger AE, Levey AI, Lee HJ, Rye DB, Wainer BH. 1987. The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 262: 105-24
- Hammond C, Rouzaire-Dubois B, Feger J, Jackson A, Crossman AR. 1983. Anatomical and electrophysiological studies on the reciprocal projections between the subthalamic nucleus and nucleus tegmenti pedunculopontinus in the rat. *Neuroscience* 9: 41-52
- Hanagasi HA, Lees A, Johnson JO, Singleton A, Emre M. 2007. Smoking-responsive juvenile-onset Parkinsonism. *Mov Disord* 22: 115-9
- Harnois C, Filion M. 1980. Pallidal neurons branching to the thalamus and to the midbrain in the monkey. *Brain Res* 186: 222-5
- Harnois C, Filion M. 1982. Pallidofugal projections to thalamus and midbrain: a quantitative antidromic activation study in monkeys and cats. *Exp Brain Res* 47: 277-85
- Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G. 2005. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 437: 556-9
- Haynes AC, Chapman H, Taylor C, Moore GB, Cawthorne MA, et coll. 2002. Anorectic, thermogenic and anti-obesity activity of a selective orexin-1 receptor antagonist in ob/ob mice. *Regul Pept* 104: 153-9
- Haynes AC, Jackson B, Chapman H, Tadayyon M, Johns A, et coll. 2000. A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul Pept* 96: 45-51
- Hazrati LN, Parent A. 1992. Projection from the deep cerebellar nuclei to the pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey. *Brain Res* 585: 267-71
- Hefti F, Melamed E, Sahakian BJ, Wurtman RJ. 1980a. Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. *Pharmacol Biochem Behav* 12: 185-8

- Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ. 1980b. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res* 195: 123-37
- Heikkila R, Cohen G. 1972a. Further studies on the generation of hydrogen peroxide by 6-hydroxydopamine. Potentiation by ascorbic acid. *Mol Pharmacol* 8: 241-8
- Heikkila RE, Cohen G. 1972b. In vivo generation of hydrogen peroxide from 6-hydroxydopamine. *Experientia* 28: 1197-8
- Heise CE, Teo ZC, Wallace BA, Ashkan K, Benabid AL, Mitrofanis J. 2005. Cell survival patterns in the pedunculopontine tegmental nucleus of methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated monkeys and 6OHDA-lesioned rats: evidence for differences to idiopathic Parkinson disease patients? *Anat Embryol (Berl)* 210: 287-302
- Henderson JM, Carpenter K, Cartwright H, Halliday GM. 2000. Degeneration of the centre median-parafascicular complex in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 47: 345-52
- Hernan MA, Takkouche B, Caamano-Isorna F, Gestal-Otero JJ. 2002. A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 52: 276-84
- Herrero MT, Hirsch EC, Javoy-Agid F, Obeso JA, Agid Y. 1993a. Differential vulnerability to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine of dopaminergic and cholinergic neurons in the monkey mesopontine tegmentum. *Brain Research* 624: 281-85
- Herrero MT, Hirsch EC, Javoy-Agid F, Obeso JA, Agid Y. 1993b. Differential vulnerability to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine of dopaminergic and cholinergic neurons in the monkey mesopontine tegmentum. *Brain Res* 624: 281-5
- Herrero MT, Hirsch EC, Kastner A, Luquin MR, Javoy-Agid F, et coll. 1993c. Neuromelanin accumulation with age in catecholaminergic neurons from macaca fascicularis brainstem. *Dev Neuroscience* 15: 37-48
- Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA. 1988. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334: 345-8
- Hirsch EC, Graybiel AM, Duyckaerts C, Javoy-Agid F. 1987. Neuronal loss in the pedunculopontine tegmental nucleus in parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Washington)* 84: 5976-80
- Hirsch EC, Hunot S. 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 8: 382-97
- Hrabovszky E, Molnar CS, Borsay BA, Gergely P, Herczeg L, Liposits Z. 2013. Orexinergic input to dopaminergic neurons of the human ventral tegmental area. *PLoS One* 8: e83029
- Huang LZ, Parameswaran N, Bordia T, Michael McIntosh J, Quik M. 2009. Nicotine is neuroprotective when administered before but not after nigrostriatal damage in rats and monkeys. *J Neurochem* 109: 826-37
- Huber SJ, Freidenberg DL, Paulson GW, Shuttleworth EC, Christy JA. 1990. The pattern of depressive symptoms varies with progression of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53: 275-8
- Hudson JL, van Horne CG, Stromberg I, Brock S, Clayton J, et coll. 1993.

- Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 626: 167-74
- Hylden JL, Hayashi H, Bennett GJ, Dubner R. 1985. Spinal lamina I neurons projecting to the parabrachial area of the cat midbrain. *Brain Res* 336: 195-8
- ## I
- Ichitani Y, Okamura H, Matsumoto Y, Nagatsu I, Iyata Y. 1991. Degeneration of the nigral dopamine neurons after 6-hydroxydopamine injection into the rat striatum. *Brain Res* 549: 350-3
- Inglis WL, Winn P. 1995. The pedunculopontine tegmental nucleus: where the striatum meets the reticular formation. *Prog Neurobiol* 47: 1-29
- Ishibashi M, Takano S, Yanagida H, Takatsuna M, Nakajima K, et coll. 2005. Effects of orexins/hypocretins on neuronal activity in the paraventricular nucleus of the thalamus in rats in vitro. *Peptides* 26: 471-81
- Ishikawa A, Miyatake T. 1993. Effects of smoking in patients with early-onset Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 117: 28-32
- ## J
- Jackson A, Crossman AR. 1983. Nucleus tegmenti pedunculopontinus: efferent connections with special reference to the basal ganglia, studied in the rat by anterograde and retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience* 10: 725-65
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. 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. 1988. The pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51: 540-3
- Jenkinson N, Nandi D, Miall RC, Stein JF, Aziz TZ. 2004. Pedunculopontine nucleus stimulation improves akinesia in a Parkinsonian monkey. *Neuroreport* 15: 2621-4
- Jenkinson N, Nandi D, Oram R, Stein JF, Aziz TZ. 2006. Pedunculopontine nucleus electric stimulation alleviates akinesia independently of dopaminergic mechanisms. *Neuroreport* 17: 639-41
- Jeon MF, Ha Y, Cho YH, Lee BH, Park YG, Chang JW. 2003. Effect of ipsilateral subthalamic nucleus lesioning in a rat parkinsonian model: study of behavior correlated with neuronal activity in the pedunculopontine nucleus. *J Neurosurg* 99: 762-7
- Jones DN, Gartlon J, Parker F, Taylor SG, Routledge C, et coll. 2001. Effects of centrally administered orexin-B and orexin-A: a role for orexin-1 receptors in orexin-B-induced hyperactivity. *Psychopharmacology (Berl)* 153: 210-8
- ## K
- Kamondi A, Williams JA, Hutcheon B, Reiner PB. 1992. Membrane properties of mesopontine cholinergic neurons studied with the whole-cell patch-clamp technique: implications for behavioral state control. *J Neurophysiol* 68: 1359-72
- Kang Y, Kitai ST. 1990. Electrophysiological properties of pedunculopontine neurons and their

- postsynaptic responses following stimulation of substantia nigra reticulata. *Brain Res* 535: 79-95
- Karachi C, Grabli D, Bernard FA, Tande D, Wattiez N, et coll. 2010. Cholinergic mesencephalic neurons are involved in gait and postural disorders in Parkinson disease. *J Clin Invest* 120: 2745-54
- Katsuki H, Shibata H, Takenaka C, Kume T, Kaneko S, Akaike A. 2003. N-Methyl-D-aspartate receptors contribute to the maintenance of dopaminergic neurons in rat midbrain slice cultures. *Neurosci Lett* 341: 123-6
- Katsuki H, Takenaka C, Kume T, Kaneko S, Akaike A. 2001. Requirement of neural activity for the maintenance of dopaminergic neurons in rat midbrain slice cultures. *Neurosci Lett* 300: 166-70
- Kelland MD, Asdourian D. 1989. Pedunculo pontine tegmental nucleus-induced inhibition of muscle activity in the rat. *Behav Brain Res* 34: 213-34
- Kelton MC, Kahn HJ, Conrath CL, Newhouse PA. 2000. The effects of nicotine on Parkinson's disease. *Brain Cogn* 43: 274-82
- Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A. 1998. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intra striatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* 152: 259-77
- Kita H, Kitai ST. 1987. Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *J Comp Neurol* 260: 435-52
- Kitai ST, Shepard PD, Callaway JC, Scroggs R. 1999. Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. *Curr Opin Neurobiol* 9: 690-7
- Kitamura Y, Kakimura J, Taniguchi T. 1998. Protective effect of talipexole on MPTP-treated planarian, a unique parkinsonian worm model. *Jpn J Pharmacol* 78: 23-9
- Knudsen S, Gammeltoft S, Jennum PJ. 2010. Rapid eye movement sleep behaviour disorder in patients with narcolepsy is associated with hypocretin-1 deficiency. *Brain* 133: 568-79
- Knusel B, Hefti F. 1988. Development of cholinergic pedunculo pontine neurons in vitro: comparison with cholinergic septal cells and response to nerve growth factor, ciliary neuronotrophic factor, and retinoic acid. *J Neurosci Res* 21: 365-75
- Kojima J, Yamaji Y, Matsumura M, Nambu A, Inase M, et coll. 1997. Excitotoxic lesions of the pedunculo pontine tegmental nucleus produce contralateral hemiparkinsonism in the monkey. *Neurosci Lett* 226: 111-4
- Koller WC, Glatt S, Vetere-Overfield B, Hassanein R. 1989. Falls and Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 12: 98-105
- Kopin IJ. 1987a. MPTP: an industrial chemical and contaminant of illicit narcotics stimulates a new era in research on Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 75: 45-51
- Kopin IJ. 1987b. Toxins and Parkinson's disease: MPTP parkinsonism in humans and animals. *Adv Neurol* 45: 137-44
- Korotkova TM, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE. 2002. Selective excitation of GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat by orexin/hypocretin in vitro. *Regul Pept* 104: 83-9
- Korotkova TM, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE. 2003. Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by

- orexins/hypocretins. *J Neurosci* 23: 7-11
- Kotz CM, Wang C, Teske JA, Thorpe AJ, Novak CM, et coll. 2006. Orexin A mediation of time spent moving in rats: neural mechanisms. *Neuroscience* 142: 29-36
- Krack P, Batir A, Van Blercom N, Chabardes S, Fraix V, et coll. 2003. Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 349: 1925-34
- Kumar R, Agarwal AK, Seth PK. 1995. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. *J Neurochem* 64: 1703-7
- L**
- Lai YY, Siegel JM. 1990. Muscle tone suppression and stepping produced by stimulation of midbrain and rostral pontine reticular formation. *J Neurosci* 10: 2727-34
- Langston JW, 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 JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219: 979-80
- Langston JW, Ballard PA, Jr. 1983. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med* 309: 310
- Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. 1999. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46: 598-605
- Langston JW, Langston EB, Irwin I. 1984. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand Suppl* 100: 49-54
- Lavoie B, Parent A. 1994a. Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: cholinergic and glutamatergic projections to the substantia nigra. *J Comp Neurol* 344: 232-41
- Lavoie B, Parent A. 1994b. Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: distribution of cholinergic and monoaminergic neurons in the mesopontine tegmentum with evidence for the presence of glutamate in cholinergic neurons. *J Comp Neurol* 344: 190-209
- Lavoie B, Parent A. 1994c. Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: projections to the basal ganglia as revealed by anterograde tract-tracing methods. *J Comp Neurol* 344: 210-31
- Lee MG, Hassani OK, Jones BE. 2005. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 25: 6716-20
- Lemay S, Chouinard S, Blanchet P, Masson H, Soland V, et coll. 2004. Lack of efficacy of a nicotine transdermal treatment on motor and cognitive deficits in Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 31-9
- Levitt P, Pintar JE, Breakefield XO. 1982. Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 6385-9
- Lichtensteiger W, Hefti F, Felix D, Huwyler T, Melamed E, Schlumpf M. 1982. Stimulation of nigrostriatal dopamine neurones by

- nicotine. *Neuropharmacology* 21: 963-8
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, et coll. 1999. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98: 365-76
- Livingstone PD, Wonnacott S. 2009. Nicotinic acetylcholine receptors and the ascending dopamine pathways. *Biochem Pharmacol* 78: 744-55
- Lokwan SJ, Overton PG, Berry MS, Clark D. 1999. Stimulation of the pedunculopontine tegmental nucleus in the rat produces burst firing in A9 dopaminergic neurons. *Neuroscience* 92: 245-54
- Lorenc-Koci E, Lenda T, Antkiewicz-Michaluk L, Wardas J, Domin H, et coll. 2011. Different effects of intranigral and intrastriatal administration of the proteasome inhibitor lactacystin on typical neurochemical and histological markers of Parkinson's disease in rats. *Neurochem Int* 58: 839-49
- Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL. 1999. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci* 19: 1284-93
- ## M
- MacLaren DA, Markovic T, Clark SD. 2014. Assessment of sensorimotor gating following selective lesions of cholinergic pedunculopontine neurons. *Eur J Neurosci*
- Mameli-Engvall M, Evrard A, Pons S, Maskos U, Svensson TH, et coll. 2006. Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron* 50: 911-21
- Mann DM, Yates PO, Hawkes J. 1983. The pathology of the human locus ceruleus. *Clin Neuropathol* 2: 1-7
- Maolood N, Meister B. 2010. Nociceptin/orphanin FQ peptide in hypothalamic neurones associated with the control of feeding behaviour. *J Neuroendocrinol* 22: 75-82
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, et coll. 2001. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435: 6-25
- Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA. 1984. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 311: 464-7
- Marsden CD. 1990. Parkinson's disease. *Lancet* 335: 948-52
- Martinez-Gonzalez C, Bolam JP, Mena-Segovia J. 2011. Topographical organization of the pedunculopontine nucleus. *Front Neuroanat* 5: 22
- Martinez-Gonzalez C, Wang HL, Micklem BR, Bolam JP, Mena-Segovia J. 2012. Subpopulations of cholinergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the pedunculopontine nucleus contain calcium-binding proteins and are heterogeneously distributed. *Eur J Neurosci* 35: 723-34
- Masilamoni GJ, Bogenpohl JW, Alagille D, Delevich K, Tamagnan G, et coll. 2011. Metabotropic glutamate receptor 5 antagonist protects dopaminergic and noradrenergic neurons from degeneration in MPTP-treated monkeys. *Brain* 134: 2057-73
- Matsumura M. 2001. Experimental parkinsonism in primates. *Stereotact Funct Neurosurg* 77: 91-7
- Matsumura M. 2005. The pedunculopontine tegmental nucleus and experimental parkinsonism. A review. *J Neurol* 252 Suppl 4: IV5-IV12
- Matsumura M, Kojima J. 2001. The role of the pedunculopontine tegmental

- nucleus in experimental parkinsonism in primates. *Stereotact Funct Neurosurg* 77: 108-15
- Matsumura M, Nambu A, Yamaji Y, Watanabe K, Imai H, et coll. 2000. Organization of somatic motor inputs from the frontal lobe to the pedunculopontine tegmental nucleus in the macaque monkey. *Neuroscience* 98: 97-110
- Matsumura M, Watanabe K, Ohye C. 1997. Single-unit activity in the primate nucleus tegmenti pedunculopontinus related to voluntary arm movement. *Neurosci Res* 28: 155-65
- Matzuk MM, Saper CB. 1985. Preservation of hypothalamic dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 18: 552-5
- Mayo JC, Sainz RM, Uria H, Antolin I, Esteban MM, Rodriguez C. 1998. Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J Pineal Res* 24: 179-92
- Mazzone P, Lozano A, Stanzione P, Galati S, Scarnati E, et coll. 2005. Implantation of human pedunculopontine nucleus: a safe and clinically relevant target in Parkinson's disease. *Neuroreport* 16: 1877-81
- McGeer EG, McGeer PL. 1984. Substantia nigra cell death from kainic acid or folic acid injections into the pontine tegmentum. *Brain Res* 298: 339-42
- McNaught KS, Bjorklund LM, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW. 2002. Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats. *Neuroreport* 13: 1437-41
- Mena-Segovia J, Micklem BR, Nair-Roberts RG, Ungless MA, Bolam JP. 2009. GABAergic neuron distribution in the pedunculopontine nucleus defines functional subterritories. *J Comp Neurol* 515: 397-408
- Mesulam MM, Geula C, Bothwell MA, Hersh LB. 1989. Human reticular formation: cholinergic neurons of the pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei and some cytochemical comparisons to forebrain cholinergic neurons. *J Comp Neurol* 283: 611-33
- Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH. 1984. Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Neuroscience* 12: 669-86
- Michel PP, Alvarez-Fischer D, Guerreiro S, Hild A, Hartmann A, Hirsch EC. 2007. Role of activity-dependent mechanisms in the control of dopaminergic neuron survival. *J Neurochem* 101: 289-97
- Michel PP, Toulorge D, Guerreiro S, Hirsch EC. 2013. Specific needs of dopamine neurons for stimulation in order to survive: implication for Parkinson disease. *FASEB J* 27: 3414-23
- Mieda M, Willie JT, Hara J, Sinton CM, Sakurai T, Yanagisawa M. 2004. Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4649-54
- Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM. 2002. Muscle tone facilitation and inhibition after orexin-a (hypocretin-1) microinjections into the medial medulla. *J Neurophysiol* 87: 2480-9
- Mitchell IJ, Clarke CE, Boyce S, Robertson RG, Peggs D, et coll. 1989. Neural mechanisms underlying parkinsonian symptoms

- based upon regional uptake of 2-deoxyglucose in monkeys exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience* 32: 213-26
- Mitsuoka T, Kaseda Y, Yamashita H, Kohriyama T, Kawakami H, et coll. 2002. Effects of nicotine chewing gum on UPDRS score and P300 in early-onset parkinsonism. *Hiroshima J Med Sci* 51: 33-9
- Monakow KH, Akert K, Kunzle H. 1979. Projections of precentral and premotor cortex to the red nucleus and other midbrain areas in *Macaca fascicularis*. *Exp Brain Res* 34: 91-105
- Morgan S, Steiner H, Rosenkranz C, Huston JP. 1986. Dissociation of crossed and uncrossed nigrostriatal projections with respect to site of origin in the rat. *Neuroscience* 17: 609-14
- Moro E, Hamani C, Poon YY, Al-Khairallah T, Dostrovsky JO, et coll. 2010. Unilateral pedunculopontine stimulation improves falls in Parkinson's disease. *Brain* 133: 215-24
- Moruzzi G, Magoun HW. 1949. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1: 455-73
- Mourlevat S, Troadec JD, Ruberg M, Michel PP. 2003. Prevention of dopaminergic neuronal death by cyclic AMP in mixed neuronal/glial mesencephalic cultures requires the repression of presumptive astrocytes. *Mol Pharmacol* 64: 578-86
- Munro-Davies L, Winter J, Aziz TZ, Stein J. 2001. Kainate acid lesions of the pedunculopontine region in the normal behaving primate. *Mov Disord* 16: 150-1
- Munro-Davies LE, Winter J, Aziz TZ, Stein JF. 1999. The role of the pedunculopontine region in basal-ganglia mechanisms of akinesia. *Exp Brain Res* 129: 511-7
- ## N
- Nagamoto-Combs K, Piech KM, Best JA, Sun B, Tank AW. 1997. Tyrosine hydroxylase gene promoter activity is regulated by both cyclic AMP-responsive element and AP1 sites following calcium influx. Evidence for cyclic amp-responsive element binding protein-independent regulation. *J Biol Chem* 272: 6051-8
- Nakamura Y, Miura S, Yoshida T, Kim J, Sasaki K. 2010. Cytosolic calcium elevation induced by orexin/hypocretin in granule cell domain cells of the rat cochlear nucleus in vitro. *Peptides* 31: 1579-88
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K. 1999. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827: 243-60
- Nandi D, Aziz TZ, Giladi N, Winter J, Stein JF. 2002a. Reversal of akinesia in experimental parkinsonism by GABA antagonist microinjections in the pedunculopontine nucleus. *Brain* 125: 2418-30
- Nandi D, Liu X, Winter JL, Aziz TZ, Stein JF. 2002b. Deep brain stimulation of the pedunculopontine region in the normal non-human primate. *J Clin Neurosci* 9: 170-4
- Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E. 2000. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 355: 39-40
- Niu C, Mei J, Pan Q, Fu X. 2009. Nigral degeneration with inclusion body formation and behavioral changes in rats after proteasomal inhibition. *Stereotact Funct Neurosurg* 87: 69-81
- Noda T, Oka H. 1984. Nigral inputs to the pedunculopontine region:

- intracellular analysis. *Brain Res* 322: 332-6
- Noda T, Oka H. 1986. Distribution and morphology of tegmental neurons receiving nigral inhibitory inputs in the cat: an intracellular HRP study. *J Comp Neurol* 244: 254-66
- O**
- Orieux G, Francois C, Feger J, Yelnik J, Vila M, et coll. 2000. Metabolic activity of excitatory parafascicular and pedunculopontine inputs to the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 97: 79-88
- P**
- Pahapill PA, Lozano AM. 2000. The pedunculopontine nucleus and Parkinson's disease. *Brain* 123 (Pt 9): 1767-83
- Palombo E, Porrino LJ, Bankiewicz KS, Crane AM, Sokoloff L, Kopin IJ. 1990. Local cerebral glucose utilization in monkeys with hemiparkinsonism induced by intracarotid infusion of the neurotoxin MPTP. *J Neurosci* 10: 860-9
- Parain K, Hapdey C, Rousselet E, Marchand V, Dumery B, Hirsch EC. 2003. Cigarette smoke and nicotine protect dopaminergic neurons against the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine Parkinsonian toxin. *Brain Res* 984: 224-32
- Parain K, Marchand V, Dumery B, Hirsch E. 2001. Nicotine, but not cotinine, partially protects dopaminergic neurons against MPTP-induced degeneration in mice. *Brain Res* 890: 347-50
- Pare D, Smith Y, Parent A, Steriade M. 1988. Projections of brainstem core cholinergic and non-cholinergic neurons of cat to intralaminar and reticular thalamic nuclei. *Neuroscience* 25: 69-86
- Parent A. 1990. Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13: 254-8
- Parent A, De Bellefeuille L. 1982. Organization of efferent projections from the internal segment of globus pallidus in primate as revealed by fluorescence retrograde labeling method. *Brain Res* 245: 201-13
- Parent A, De Bellefeuille L. 1983. The pallidointralaminar and pallidonigral projections in primate as studied by retrograde double-labeling method. *Brain Res* 278: 11-27
- Parent A, Hazrati LN. 1995a. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res Brain Res Rev* 20: 91-127
- Parent A, Hazrati LN. 1995b. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20: 128-54
- Pereira EA, Muthusamy KA, De Pennington N, Joint CA, Aziz TZ. 2008. Deep brain stimulation of the pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease. Preliminary experience at Oxford. *Br J Neurosurg* 22 Suppl 1: S41-4
- Perumal AS, Gopal VB, Tordzro WK, Cooper TB, Cadet JL. 1992. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. *Brain Res Bull* 29: 699-701
- Perumal AS, Tordzro WK, Katz M, Jackson-Lewis V, Cooper TB, et coll. 1989. Regional effects of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on free radical scavengers in rat brain. *Brain Res* 504: 139-41
- Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, et coll. 2000. A

- mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 6: 991-7
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, et coll. 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18: 9996-10015
- Pfeiffer RF. 2011. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 17: 10-5
- Pienaar IS, Harrison IF, Elson JL, Bury A, Woll P, et coll. 2013. An animal model mimicking pedunculopontine nucleus cholinergic degeneration in Parkinson's disease. *Brain Struct Funct*
- Pienaar IS, van de Berg W. 2013. A non-cholinergic neuronal loss in the pedunculopontine nucleus of toxin-evoked parkinsonian rats. *Exp Neurol* 248: 213-23
- Plaha P, Gill SS. 2005. Bilateral deep brain stimulation of the pedunculopontine nucleus for Parkinson's disease. *Neuroreport* 16: 1883-7
- Porras G, Li Q, Bezard E. 2012. Modeling Parkinson's disease in primates: The MPTP model. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a009308
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, et coll. 2000. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor Neurol Neurosci* 16: 135-42
- Quik M, Bordia T, O'Leary K. 2007. Nicotinic receptors as CNS targets for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 74: 1224-34
- Quik M, Parameswaran N, McCallum SE, Bordia T, Bao S, et coll. 2006. Chronic oral nicotine treatment protects against striatal degeneration in MPTP-treated primates. *J Neurochem* 98: 1866-75
- Quik M, Zhang D, Perez XA, Bordia T. 2014. Role for the nicotinic cholinergic system in movement disorders; therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 144: 50-59
- ## R
- Raggi A, Bella R, Pennisi G, Neri W, Ferri R. 2013. Sleep disorders in Parkinson's disease: a narrative review of the literature. *Rev Neurosci* 24: 279-91
- Ramsay RR, Singer TP. 1986. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem* 261: 7585-7
- Reetz K, Gaser C, Klein C, Hagenah J, Buchel C, et coll. 2009. Structural findings in the basal ganglia in genetically determined and idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 24: 99-103
- Rideout HJ, Larsen KE, Sulzer D, Stefanis L. 2001. Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J Neurochem* 78: 899-908
- Rinne JO, Ma SY, Lee MS, Collan Y, Roytta M. 2008. Loss of cholinergic neurons in the pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease is related to disability of the patients. *Parkinsonism Relat Disord* 14: 553-7
- Rodriguez MC, Obeso JA, Olanow CW. 1998. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Ann Neurol* 44: S175-88
- Rohrbacher J, Ichinohe N, Kitai ST. 2000. Electrophysiological characteristics
- ## Q

- of substantia nigra neurons in organotypic cultures: spontaneous and evoked activities. *Neuroscience* 97: 703-14
- Rojas P, Rojas-Castaneda J, Vigueras RM, Habeebu SS, Rojas C, et coll. 2000. MPTP decreases MT-I mRNA in mouse striatum. *Neurochem Res* 25: 503-9
- Rolland AS, Karachi C, Muriel MP, Hirsch EC, Francois C. 2011. Internal pallidum and substantia nigra control different parts of the mesopontine reticular formation in primate. *Mov Disord* 26: 1648-56
- Rolland AS, Tande D, Herrero MT, Luquin MR, Vazquez-Claverie M, et coll. 2009. Evidence for a dopaminergic innervation of the pedunculopontine nucleus in monkeys, and its drastic reduction after MPTP intoxication. *J Neurochem* 110: 1321-9
- Russ H, Staust K, Martel F, Gliese M, Schomig E. 1996. The extraneuronal transporter for monoamine transmitters exists in cells derived from human central nervous system glia. *Eur J Neurosci* 8: 1256-64
- Ryan RE, Ross SA, Drago J, Loiacono RE. 2001. Dose-related neuroprotective effects of chronic nicotine in 6-hydroxydopamine treated rats, and loss of neuroprotection in alpha4 nicotinic receptor subunit knockout mice. *Br J Pharmacol* 132: 1650-6
- Rye DB, Saper CB, Lee HJ, Wainer BH. 1987. Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum. *J Comp Neurol* 259: 483-528
- Sakai ST, Davidson AG, Buford JA. 2009. Reticulospinal neurons in the pontomedullary reticular formation of the monkey (*Macaca fascicularis*). *Neuroscience* 163: 1158-70
- Sakurai T. 2007. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci* 8: 171-81
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, et coll. 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92: 573-85
- Salthun-Lassalle B, Hirsch EC, Wolfart J, Ruberg M, Michel PP. 2004. Rescue of mesencephalic dopaminergic neurons in culture by low-level stimulation of voltage-gated sodium channels. *J Neurosci* 24: 5922-30
- Saner A, Thoenen H. 1971. Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Mol Pharmacol* 7: 147-54
- Saper CB, Loewy AD. 1982. Projections of the pedunculopontine tegmental nucleus in the rat: evidence for additional extrapyramidal circuitry. *Brain Res* 252: 367-72
- Sauer H, Oertel WH. 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
- Scarnati E, Campana E, Pacitti C. 1984. Pedunculopontine-evoked excitation of substantia nigra neurons in the rat. *Brain Res* 304: 351-61
- Scarnati E, Proia A, Campana E, Pacitti C. 1986. A microiontophoretic study on the nature of the putative synaptic neurotransmitter involved in the pedunculopontine-substantia nigra pars compacta excitatory

S

Sakai ST, Davidson AG, Buford JA. 2009. Reticulospinal neurons in the pontomedullary reticular formation of the monkey (*Macaca*

- pathway of the rat. *Exp Brain Res* 62: 470-8
- Scarnati E, Proia A, Di Loreto S, Pacitti C. 1987. The reciprocal electrophysiological influence between the nucleus tegmenti pedunculopontinus and the substantia nigra in normal and decorticated rats. *Brain Res* 423: 116-24
- Scatton B, Dennis T, L'Heureux R, Monfort JC, Duyckaerts C, Javoy-Agid F. 1986. Degeneration of noradrenergic and serotonergic but not dopaminergic neurones in the lumbar spinal cord of parkinsonian patients. *Brain Res* 380: 181-5
- Schmidt N, Ferger B. 2001. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 108: 1263-82
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. 2005. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 1035: 24-31
- Schneider JS, Kovelowski CJ, 2nd. 1990. Chronic exposure to low doses of MPTP. I. Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys. *Brain Res* 519: 122-8
- Schneider JS, Pope-Coleman A. 1995. Cognitive deficits precede motor deficits in a slowly progressing model of parkinsonism in the monkey. *Neurodegeneration* 4: 245-55
- Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW. 1999. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem* 47: 719-30
- Schrempf W, Brandt MD, Storch A, Reichmann H. 2014. Sleep disorders in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 4: 211-21
- Schultz W. 1988. MPTP-induced parkinsonism in monkeys: mechanism of action, selectivity and pathophysiology. *Gen Pharmacol* 19: 153-61
- Schwartz RK, Huston JP. 1996. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 50: 275-331
- Semba K, Fibiger HC. 1992. Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 323: 387-410
- Shik ML, Severin FV, Orlovskii GN. 1966. [Control of walking and running by means of electric stimulation of the midbrain]. *Biofizika* 11: 659-66
- Shink E, Sidibe M, Smith Y. 1997. Efferent connections of the internal globus pallidus in the squirrel monkey: II. Topography and synaptic organization of pallidal efferents to the pedunculopontine nucleus. *J Comp Neurol* 382: 348-63
- Shouse MN, Siegel JM. 1992. Pontine regulation of REM sleep components in cats: integrity of the pedunculopontine tegmentum (PPT) is important for phasic events but unnecessary for atonia during REM sleep. *Brain Res* 571: 50-63
- Shute CC, Lewis PR. 1967. The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain* 90: 497-520
- Sorenson EM, Shiroiyama T, Kitai ST. 1998. Postsynaptic nicotinic receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta of the rat. *Neuroscience* 87: 659-73
- Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Munoz-Patino AM, Labandeira-Garcia JL. 2000. Autoxidation and

- neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem* 74: 1605-12
- Spann BM, Grofova I. 1991. Nigropedunculopontine projection in the rat: an anterograde tracing study with phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol* 311: 375-88
- Spann BM, Grofova I. 1992. Cholinergic and non-cholinergic neurons in the rat pedunculopontine tegmental nucleus. *Anat Embryol (Berl)* 186: 215-27
- Staal RG, Sonsalla PK. 2000. Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in vivo in rat striata. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 336-42
- Steininger TL, Rye DB, Wainer BH. 1992. Afferent projections to the cholinergic pedunculopontine tegmental nucleus and adjacent midbrain extrapyramidal area in the albino rat. I. Retrograde tracing studies. *J Comp Neurol* 321: 515-43
- Steriade M. 1996. Awakening the brain. *Nature* 383: 24-5
- Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G, Curro Dossi RC. 1990. Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* 10: 2541-59
- Steriade M, Dossi RC, Pare D, Oakson G. 1991. Fast oscillations (20-40 Hz) in thalamocortical systems and their potentiation by mesopontine cholinergic nuclei in the cat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4396-400
- Steriade M, Pare D, Parent A, Smith Y. 1988. Projections of cholinergic and non-cholinergic neurons of the brainstem core to relay and associational thalamic nuclei in the cat and macaque monkey. *Neuroscience* 25: 47-67
- Sugimoto T, Hattori T. 1984. Organization and efferent projections of nucleus tegmenti pedunculopontinus pars compacta with special reference to its cholinergic aspects. *Neuroscience* 11: 931-46
- Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez J, Schumacker PT. 2012. Physiological phenotype and vulnerability in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a009290
- Suzuki S, Kawamata J, Matsushita T, Matsumura A, Hisahara S, et coll. 2013. 3-[(2,4-Dimethoxy)benzylidene]-anabaseine dihydrochloride protects against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian neurodegeneration through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor stimulation in rats. *J Neurosci Res* 91: 462-71
- ## T
- Takada M, Li ZK, Hattori T. 1990. Astroglial ablation prevents MPTP-induced nigrostriatal neuronal death. *Brain Res* 509: 55-61
- Takahashi N, Miner LL, Sora I, Ujike H, Revay RS, et coll. 1997. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9938-43
- Takakusaki K, Habaguchi T, Ohtinata-Sugimoto J, Saitoh K, Sakamoto T. 2003. Basal ganglia efferents to the brainstem centers controlling postural muscle tone and locomotion: a new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction. *Neuroscience* 119: 293-308
- Takakusaki K, Shiroyama T, Kitai ST. 1997. Two types of cholinergic

- neurons in the rat tegmental pedunculopontine nucleus: electrophysiological and morphological characterization. *Neuroscience* 79: 1089-109
- Takakusaki K, Shiroyama T, Yamamoto T, Kitai ST. 1996. Cholinergic and noncholinergic tegmental pedunculopontine projection neurons in rats revealed by intracellular labeling. *J Comp Neurol* 371: 345-61
- Tandberg E, Larsen JP, Karlsen K. 1998. A community-based study of sleep disorders in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 13: 895-9
- Thannickal TC, Lai YY, Siegel JM. 2007. Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease. *Brain* 130: 1586-95
- Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, et coll. 2000. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27: 469-74
- Thevathasan W, Coyne TJ, Hyam JA, Kerr G, Jenkinson N, et coll. 2011. Pedunculopontine nucleus stimulation improves gait freezing in Parkinson disease. *Neurosurgery* 69: 1248-53; discussion 54
- Toulorge D, Guerreiro S, Hild A, Maskos U, Hirsch EC, Michel PP. 2011. Neuroprotection of midbrain dopamine neurons by nicotine is gated by cytoplasmic Ca²⁺. *FASEB J* 25: 2563-73
- ## U
- Ungerstedt U. 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5: 107-10
- Ungerstedt U. 1971. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta Physiol Scand Suppl* 367: 49-68
- ## V
- Varastet M, Riche D, Maziere M, Hantraye P. 1994. Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience* 63: 47-56
- Velazquez-Moctezuma J, Gillin JC, Shiromani PJ. 1989. Effect of specific M1, M2 muscarinic receptor agonists on REM sleep generation. *Brain Res* 503: 128-31
- Vernon AC, Johansson SM, Modo MM. 2010. Non-invasive evaluation of nigrostriatal neuropathology in a proteasome inhibitor rodent model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci* 11: 1
- Vierregge A, Sieberer M, Jacobs H, Hagenah JM, Vierregge P. 2001. Transdermal nicotine in PD: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Neurology* 57: 1032-5
- Villafane G, Cesaro P, Rialland A, Baloul S, Azimi S, et coll. 2007. Chronic high dose transdermal nicotine in Parkinson's disease: an open trial. *Eur J Neurol* 14: 1313-6
- Villalba RM, Wichmann T, Smith Y. 2014. Neuronal loss in the caudal intralaminar thalamic nuclei in a primate model of Parkinson's disease. *Brain Struct Funct* 219: 381-94
- Vincent SR. 2000. The ascending reticular activating system--from aminergic neurons to nitric oxide. *J Chem Neuroanat* 18: 23-30
- Vincent SR, Satoh K, Armstrong DM, Fibiger HC. 1983. Substance P in the ascending cholinergic reticular system. *Nature* 306: 688-91
- Vincent SR, Satoh K, Armstrong DM, Panula P, Vale W, Fibiger HC. 1986. Neuropeptides and NADPH-diaphorase activity in the ascending

- cholinergic reticular system of the rat. *Neuroscience* 17: 167-82
- Visanji NP, O'Neill MJ, Duty S. 2006. Nicotine, but neither the alpha4beta2 ligand RJR2403 nor an alpha7 nAChR subtype selective agonist, protects against a partial 6-hydroxydopamine lesion of the rat median forebrain bundle. *Neuropharmacology* 51: 506-16
- W**
- Wang HL, Morales M. 2009. Pedunculo-pontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* 29: 340-58
- Webster HH, Jones BE. 1988. Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res* 458: 285-302
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231: 482-97
- Westlund KN, Denney RM, Kochersperger LM, Rose RM, Abell CW. 1985. Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science* 230: 181-3
- Wichmann T, DeLong MR. 2003. Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder. *Ann N Y Acad Sci* 991: 199-213
- Winn P. 2008. Experimental studies of pedunculo-pontine functions: are they motor, sensory or integrative? *Parkinsonism Relat Disord* 14 Suppl 2: S194-8
- Winn P, Brown VJ, Inglis WL. 1997. On the relationships between the striatum and the pedunculo-pontine tegmental nucleus. *Crit Rev Neurobiol* 11: 241-61
- Woolf NJ, Butcher LL. 1986. Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain. *Brain Res Bull* 16: 603-37
- Y**
- Yamada K, Umegaki H, Maezawa I, Iguchi A, Kameyama T, Nabeshima T. 1997. Possible involvement of catalase in the protective effect of interleukin-6 against 6-hydroxydopamine toxicity in PC12 cells. *Brain Res Bull* 43: 573-7
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, et coll. 2003. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38: 701-13
- Yamuy J, Fung SJ, Xi M, Chase MH. 2004. Hypocretinergic control of spinal cord motoneurons. *J Neurosci* 24: 5336-45
- Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. 2004. Neuroprotective and neurotrophic effect of apomorphine in the striatal 6-OHDA-lesion rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1026: 95-107
- Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. 2005. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* 144: 35-45
- Z**
- Zawilska JB, Urbanska A, Sokolowska P. 2013. Orexins/hypocretins stimulate accumulation of inositol phosphate in primary cultures of rat cortical neurons. *Pharmacol Rep* 65: 513-6

- Zeng X, Shen H, Zhao J, Cai Q, Wang C, Xu Q. 2012. Long-term changes in morphology, D2R expression and targets of regenerated dopaminergic terminals in the striatum after a partial lesion in the substantia nigra in the rat. *Brain Res* 1450: 166-73
- Zhang J, Graham DG, Montine TJ, Ho YS. 2000. Enhanced N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity in mice deficient in CuZn-superoxide dismutase or glutathione peroxidase. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 53-61
- Zhang JH, Sampogna S, Morales FR, Chase MH. 2001. Orexin (hypocretin)-like immunoreactivity in the cat hypothalamus: a light and electron microscopic study. *Sleep* 24: 67-76
- Zhang JH, Sampogna S, Morales FR, Chase MH. 2002. Co-localization of hypocretin-1 and hypocretin-2 in the cat hypothalamus and brainstem. *Peptides* 23: 1479-83
- Zhang QJ, Liu J, Wang Y, Wang S, Wu ZH, et coll. 2008. The firing activity of presumed cholinergic and non-cholinergic neurons of the pedunculopontine nucleus in 6-hydroxydopamine-lesioned rats: an in vivo electrophysiological study. *Brain Res* 1243: 152-60
- Zigmond MJ, Stricker EM. 1984. Parkinson's disease: studies with an animal model. *Life Sci* 35: 5-18
- Zweig RM, Jankel WR, Hedreen JC, Mayeux R, Price DL. 1989a. The pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 26: 41-6
- Zweig RM, Jankel WR, Hedreen JC, Mayeux R, Price DL. 1989b. The pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 26: 41-46

LISTE DES ABREVIATIONS

6-OHDA : 6-hydroxydopamine

DA : Dopaminergique

DO: Densité optique

MAO-B : monoamine oxydase B

MFB : Medial forebrain bundle

MP : Maladie de Parkinson

MPDP : en 1-methyl-4-phenyl-1,2-dihydropyridinium

MPP : 1-methyl-4-phenylpyridine

MPTP : 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate diaphorase

PPN : Noyau pédonculopontin

RBD : Rapid eye movement sleep Behavior Disorder

REM : Rapid eye movement

SNc : Substantia Nigra pars compacta

SRAA: Système réticulé activateur ascendant

TEA: tétraéthyl ammonium

TH : Tyrosine hydroxylase

Urotensine: toxine diphtérique couplée à l'urotensine II

RESUME

Dans la maladie de Parkinson, un déficit d'activité électrique serait impliqué dans le processus de dégénérescence des neurones dopaminergiques (DA) de la substance noire. Or des structures non-DA, en particulier les neurones cholinergiques du noyau pédonculopontin (PPN) et orexinergiques de l'hypothalamus, sont affectés dans la pathologie. Ces neurones étant la source d'une innervation excitatrice pour les neurones DA, un déficit de ces inputs chez les patients pourrait jouer un rôle clé dans la progression de la perte DA. Le premier but de ce projet était d'évaluer l'impact d'une lésion des neurones cholinergiques du PPN sur la survie des neurones DA nigraux de rats et de macaques sains et parkinsoniens. Nous avons montré que 1) une déafférentation cholinergique induit une atrophie neuronale voire une dégénérescence DA, 2) une lésion DA induit une perte de neurones cholinergiques du PPN, et 3) combiner une lésion cholinergique du PPN à une lésion DA induit une exacerbation des pertes neuronales dans les deux systèmes. Enfin, le taux de dégénérescence DA est corrélé à l'intensité de la perte des neurones cholinergiques. Nos résultats confirment que le PPN joue un rôle clé dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson et démontrent la forte interrelation existant entre ces deux systèmes. Concernant le système orexinergique, nous montrons que les fibres sont en position de moduler l'activité des neurones DA, mais qu'une lésion sélective du système DA chez le macaque n'est pas suffisante pour induire la mort des neurones à orexine. Ces résultats suggèrent que l'atteinte du système orexinergique chez des patients parkinsoniens pourrait résulter de lésions non-DA.

Mots clés : maladie de Parkinson, dopamine, noyau pédonculopontin, cholinergique, non-dopaminergique, orexine.

Vulnerability of the dopaminergic neurons in Parkinson's disease: role of excitatory inputs from the cholinergic pedunculopontine and orexin hypothalamic systems

ABSTRACT:

In Parkinson's disease, there is evidence that dopaminergic (DA) neurons of the substantia nigra degenerate when they become electrically less active. Many non-DA structures including cholinergic neurons of the pedunculopontine nucleus (PPN) and orexinergic neurons of the hypothalamus, are also degenerating. Since these non-DA neurons are sources of excitatory inputs to the nigral DA neurons, their lesion in parkinsonian patients might play a key role in the progression of DA neuronal death. The first goal of this study was to evaluate the effect of a cholinergic PPN lesion on the survival of nigral DA neurons in healthy and parkinsonian rats and macaques. We found that 1) a PPN cholinergic lesion induced neuronal atrophy and death; 2) a DA lesion alone resulted in a loss of PPN cholinergic neurons; and 3) adding a PPN cholinergic lesion to a DA lesion in rats when the process of DA degeneration was in progress exacerbated neuronal losses in both systems. Last, the rate of DA degeneration was highly correlated to the level of cholinergic loss. Our results highlight the key role of the PPN in the physiopathology of Parkinson's disease and clearly demonstrate strong reciprocal interactions with nigral DA neurons. The second aim of our study was to focus on the hypothalamic orexinergic system using a morphological approach in macaques. We show that orexinergic fibers are in position to modulate DA neurons activity. However, a relatively selective DA lesion in macaques was not sufficient to induce death of the orexinergic neurons. These data suggest that the loss of orexinergic neurons observed in parkinsonian patients likely results from non-DA lesions.

Keywords: Parkinson's disease, dopamine, pedunculopontine nucleus, cholinergic, non-dopaminergic, orexin.