Université de Montréal

ÉTUDE COMPARATIVE DES PROJECTIONS DES NEURONES DOPAMINERGIQUES CHEZ DEUX ESPÈCES ANIMALES

par Catherine Dubé

Département de neurosciences, Université de Montréal, Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de Maitrise en sciences neurologiques

Août, 2014

© Catherine Dubé, 2014

Résumé

Une des voies les plus étudiées dans le contrôle locomoteur est la voie dopaminergique ascendante, vu son importance dans les maladies qui touchent la locomotion, comme la maladie du Parkinson. La substance noire *pars compacta* (A9; SNc) et l'aire tegmentaire ventrale (A10; VTA) envoient des projections dopaminergiques (DA+) vers les ganglions de la base (GB) qui à leur tour projettent vers la région locomotrice mésencéphalique (RLM), une région de tronc cérébral qui contrôle la locomotion chez les vertébrés. Des terminaisons DA+ au niveau de la RLM ont récemment été découvertes chez le singe. Donc, il semblait intéressant de savoir d'où provenaient ces projections DA+ et si elles étaient maintenues de manière équivalente dans l'évolution des espèces animales. Nous nous sommes donc penchés sur deux espèces animales en particulier, la lamproie et le triton. Dans ce travail, nous avons observé une voie DA+ descendante du tubercule postérieur (PT; homologue à la substance noire *pars compacta* et à l'aire tegmentaire ventrale chez les mammifères) directement vers la RLM, sans passer par l'intermédiaire des GB. Cette voie DA+ descendante a été observée autant chez la lamproie que chez le triton, à la suite d'injections de marqueurs rétrogrades et de détection immunohistochimique de la tyrosine hydroxylase (TH) ou de la dopamine (DA). La voie DA+ descendante semble donc conservée au cours de l'évolution des espèces vertébrés, bien que l'importance relative de la voie ascendante DA+ semble augmenter au cours de l'évolution.

Mots-Clés

Locomotion, Dopamine, Région locomotrice mésencéphalique, Mésencéphale, Tronc cérébral, Ganglions de la base, Tubercule postérieur, Aire tegmentaire ventrale, Substance noire *pars compacta*.

Summary

One of the most studied pathways in the control of locomotion is the ascending dopaminergic pathway, because of its importance in some diseases affecting locomotor behaviour like Parkinson's disease. The A9 and the A10 send dopaminergic inputs to the basal ganglia that in turn, project to the RLM, a region from the brainstem that controls the locomotion in vertebrate. Dopaminergic terminals in the RLM were discovered in the monkey. It seemed interesting to know where they come from and if they were conserved in the evolution of vertebrate species. This is why we investigated the existence of such projection in the lamprey and the newt. In this study we observed a descending dopaminergic pathway from the posterior tuberculum (PT; homologue to A9 and A10 of mammals) to the RLM that does not go through the basal ganglia first. This descending dopaminergic pathway was observed in both the lamprey and the newt, following injection of a retrograde tracer and immunohistochemical detection of either tyrosine TH or DA. The descending dopaminergic pathway seems to be conserved in the evolution of the animal species, although the relative importance of the ascending DA+ pathway seems to increase with evolution.

Keywords

Locomotion, Dopamine, Mesencephalic locomotor region, Mesencephalon, Brainstem, Basal ganglia, Posterior tuberculum, Ventral tegmental area, Substantia nigra *pars compacta*.

Table des matières

Résumé……i

Summary……iii

Liste des figures……viii

Liste des tableaux……xii

Liste des abréviations……xiii

Identification du jury……xiv

Remerciements……xv

Introduction……1

Locomotion ……1

Régions liées à la locomotion……1

Générateur central de patrons……2

Formation réticulée……6

Région locomotrice diencéphalique……13

Région locomotrice mésencéphalique……14

Ganglions de la base……21

Aire tegmentaire ventrale et substance noire ……29

La région mésodiencéphalique de la lamproie et du triton…… 30

Cervelet……51

Cortex moteur……52

Voie nigro-striée ……54

Objectifs……57

Méthodologie……60

Espèces à l'étude……60

Dissection……61

Traçage axonal……62

Fixation, révélation de la biocytine et protocole d'immunofluorescence……64

Observations microscopiques et élaboration des figures……67

Analyse……67

.

Résumé des différentes injections faites chez la lamproie et chez le triton……69

Expériences additionnelles……70

Résultats……71

Groupe de neurones dopaminergiques mésodiencéphaliques chez la lamproie et le triton……71

Projections dopaminergiques du PT vers la RLM chez la lamproie…..83

Projections dopaminergiques du PT vers le Str chez la lamproie…….86

Marquage dans le PT à la suite d'injections simultanées dans la RLM et dans le Str chez la lamproie……91

Projections dopaminergiques du PT vers la RLM chez le triton……..96

Projections dopaminergiques du PT vers le Str chez le triton……..103

Marquage dans le PT suite à des injections simultanées dans la RLM et dans le Str chez le triton……106

Aspects comparatifs……118

Discussion ……119

Groupes de neurones dopaminergiques mésodiencéphaliques chez la lamproie et chez le triton……119

Projections dopaminergiques du PT vers le Str chez la lamproie et chez le triton……123

Projections dopaminergiques du PT vers la RLM chez la lamproie et chez le triton……126

Voie ascendante et descendantes chez la lamproie et chez le triton……128

Conclusion……131

Sources documentaires……135

Annexes……I

Annexe I (Ryczko et al., 2013)……I

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Schéma illustrant les structures utilisées au cours d'une activité locomotrice chez les vertébrés en général……..3

Figure 2. Schéma illustrant les différentes structures du générateur central de patrons de la locomotion chez la lamproie……..7

Figure 3. Schéma illustrant les structures de la formation réticulée impliquées dans la locomotion chez la lamproie……10

Figure 4. Schéma illustrant les structures de la région locomotrice mésencéphalique et ses connexions en lien avec la locomotion chez la lamproie……..16

Figure 5. Schéma illustrant les voies directe et indirecte des ganglions de la base responsables du contrôle de la locomotion……..26

Figure 6. Schéma illustrant une vue dorsale des cerveaux de lamproie et de triton avec la localisation sommaire des régions principales à l'étude……32

Figure 7. Section médio-sagittale du cerveau de lamproie, *Lampetra fluviatilis*…….33

Figure 8. Coupe transverse du cerveau de lamproie, *Lampetra fluviatilis,* à la jonction entre le mésencéphale et le diencéphale et passant au travers du tubercule postérieur……..35

Figure 9. Coupe transversale du cerveau de lamproie, *Lampetra fluviatilis,* au niveau du tubercule postérieur présentant les cellules DA+ suivant une détection immunohistochimique de la DA……37

Figure 10. Coupe transversale du cerveau de lamproie, *Lampetra fluviatilis,* au niveau du tubercule postérieur présentant les cellules qui projettent au striatum...39

Figure 11. Photo d'une coupe transversale du cerveau de lamproie, *Lampetra fluviatilis,* au niveau du tubercule postérieur présentant les cellules DA+ qui projettent au striatum……..41

Figure 12. Hémi-sections de coupes transversales de salamandre, *Pleurodeles waltl,* présentant une immunohistochimie de la TH ou de la DA de la région mésodiencéphalique……..44

Figure 13. Schéma de coupes transverses de cerveau de salamandre, *Pleurodeles waltl,* à la suite d'une injection de traceur dans le striatum et une immunohistochimie de la TH……47

Figure 14. Schéma de coupes transverses de cerveau de salamandre, *Pleurodeles waltl,* suivant une injection de traceur dans le noyau accumbens et une immunohistochimie de la TH……48

Figure 15. Schéma de coupes transverses de lamproie, *Petromyzon marinus,* et de triton, *Notophthalmus viridescens,* au niveau de la région mésodiencéphalique montrant des neurones immunoréactifs à la DA……..49

Figure 16. Schéma illustrant les différentes structures de la voie ascendante et de la voie descendante qui serait, elle aussi, hypothétiquement impliquée dans la locomotion. ……55

<u>Résultats</u>

Figure 17. Schéma de coupes du cerveau de *Notophthalmus viridescens* montrant les groupes neuronaux du PT révélés par immunofluorescence de la DA……..73

Figure 18. Neurones révélés par immunohistochimie de la DA ou de la TH dans la partie dorsomédiane la plus caudale du PT chez le triton, *Notophthalmus viridescens* (région considérée ici, pour simplifier l'analyse, comme faisant partie du PT, mais qui est en fait du mésencéphale rostral)……..75

Figure 19. Neurones révélés par immunohistochimie de la DA ou de la TH dans la partie dorsomédiane et ventrolatérale du PT chez le triton, *Notophthalmus viridescens* ……..77

Figure 20. Neurones révélés par immunohistochimie de la DA ou de la TH dans la partie plus rostrale et médiane du PT chez le triton, *Notophthalmus viridescens*……..79

Figure 21. Schéma de coupes transverses du cerveau de *Petromyzon marinus* après une injection de traceur dans la région locomotrice mésencéphalique et l'immunohistochimie de la TH montrant des corps cellulaires TH+ projetant à la RLM……..84

Figure 22. Schéma et photos illustrant des corps cellulaires marqués l'injection de traceur dans la région locomotrice mésencéphalique et marqués par immunofluorescence contre la TH chez la lamproie, *Petromyzon marinus*.……..89

Figure 23. Schéma de coupes du cerveau de lamproie, *Petromyzon marinus,* après une injection de traceur rétrograde dans le striatum et une immunohistochimie des corps cellulaires TH+ et les corps cellulaires marqués à partir du striatum……..92

Figure 24. Schéma et photos illustrant des corps cellulaires du PT marqués à partir de la région locomotrice mésencéphalique, du striatum et marqués par immunohistochimie de la TH chez la lamproie, *Petromyzon marinus.* ……94

Figure 25. Schéma de coupes transverses du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* montrant le marquage dans le PT suite à une injection de traceur dans la région locomotrice mésencéphalique et l'immunohistochimie de la TH.……..97

Figure 26. Schéma et photos de coupes du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* suite à une injection de traceur dans la région locomotrice mésencéphalique et l'immunohistochimie montrant les corps cellulaires TH+ et rétrogradement marqués à partir de la RLM au niveau dorsomédian du PT……..99

Figure 27. Schéma et photos de coupes du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* suite à une injection de traceur dans la région locomotrice mésencéphalique et une réaction immunohistochimique contre la DA montrant des corps cellulaires DAir et rétrogradement marqués à partir de la RLM dans la portion ventrolatérale du PT. ……..101

Figure 28. Schéma et photos de coupes transverses du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* montrant des cellules marquées dans le PT, portion ventrolatérale, après une injection de traceur rétrograde dans la région locomotrice mésencéphalique et une immunohistochimie de la TH. ……..104

Figure 29. Schéma de coupes transverses du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* montrant le marquage dans le PT suite à une injection de traceur dans le striatum et une immunohistochimie de la TH……107

Figure 30. Schéma et photos de coupes du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* au niveau du PT suite à une injection de traceur dans le striatum et une réaction immunohistochimique contre la TH. ……110

Figure 31. Schéma et photos d'une coupe transverse du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* au niveau du PT montrant des neurones TH+ qui projettent au Str et à la RLM.……114

Figure 32. Schéma et photos d'une coupe transverse du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* au niveau du PT suite à une injection de traceur dans le striatum et dans la région locomotrice mésencéphalique montrant les cellules TH+ rétrogradement marquées à partir du striatum ou de la région locomotrice mésencéphalique……116

Liste des tableaux

Méthodologie

Tableau 1. Nombre de lamproies, *Petromyzon marinus,* et de tritons, *Notophthalmus viridescens,* qui ont reçu une injection simple de traceur dans la région locomotrice mésencéphalique ou dans le striatum……..69

Tableau 2. Nombre de lamproies, *Petromyzon marinus,* et de tritons, *Notophthalmus viridescens,* qui ont reçu des injections simultanées dans la région locomotrice mésencéphalique et dans le striatum**.**……69

Résultats

Tableau 3. Nombre de cellules TH+ total et de cellules TH+ marquées de manière rétrograde à partir du Str au niveau du tubercule postérieur chez la lamproie, *Petromyzon marinus.*……..81

Tableau 4. Nombre total de cellules TH+ et de cellules TH+ rétrogradement marquées à partir de la région locomotrice mésencéphalique au niveau du tubercule postérieur chez le triton, *Notophthalmus viridescens.* ……..82

Tableau 5. Nombre de cellules TH+ total et de cellules TH+ rétrogradement marquées à partir de la région locomotrice mésencéphalique au niveau du tubercule postérieur chez la lamproie, *Petromyzon marinus.* ……..85

Tableau 6. Nombre de cellules TH+ total et de cellules TH+ rétrogradement marquées à partir du striatum au niveau du tubercule postérieur chez le triton, *Notophthalmus viridescens.* ……..112

Liste des abréviations

A9 / SNc: Substance noire *pars compacta*
A10 / VTA: Aire tegmentaire ventrale
ADN: Acide désoxyribonucléique
AMPA: Acide α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique
ARRN: Noyau rhombencéphalique réticulaire antérieur
$CaCl_2$: Dichlorure de calcium
CCPA: Conseil canadien de la protection des animaux
CDEA: Comité de déontologie de l'expérimentation animale
cm: Centimètre
CuN: Noyau cunéiforme
DA: Dopamine
DA+ : Dopaminergique
D1: Récepteur dopaminergique de type 1
D2: Récepteur dopaminergique de type 2
E: Interneurone excitateur
g: Gramme
GB: Ganglions de la base
GCP: Générateur central de patrons
GPe: Globus pallidus externe
GPi: Globus pallidus interne
I: Interneurone inhibiteur 1
KCl: Chlorure de potassium
L-DOPA: L-3,4- dihydroxyphénylalanine
LDT: Noyau latérodorsal du tegmentum
$MgCl_2$: Chlorure de magnésium
mm: Millimètre
mM: Millimolaire
Mn: Motoneurone
MRN: Noyau mésencéphalique réticulaire
MRRN: Noyau rhombencéphalique réticulaire moyen
MS-222: Tricaine méthanesulfonate
n: Nombre
NaCl: Chlorure de sodium
NAcc: Noyau accumbens
N.f.l.: Noyau du faisceau longitudinal médian
NGS: Sérum normal de chèvre
NMDA: N-methyl-D-aspartate
Non-NMDA: non-N-Methyl-D-aspartate
OT: Tubercule olfactif
PFA: Paraformaldéhyde
PPN: Noyau pédunculopontin
PRRN: Noyau rhombencéphalique réticulaire postérieur
PT: Tubercule postérieur
RLD: Région locomotrice diencéphalique
RLM: Région locomotrice mésencéphalique
rpos: Récessus postérieur
RS: réticulospinal
Str: Striatum
SubCuN: Noyau sous-cunéiforme
TH: Tyrosine hydroxylase
TH+: Tyrosine hydroxylase-immunoréactif
TRDA: Dextran amine Texas Red
5-HT: Sérotonine
^{o}C: degré Celsius

Identification du Jury

Président – rapporteur : DOUCET, Guy

Membres du jury

Directeur de recherche : DUBUC, Réjean

Membre : KOLTA, Arlette

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche Réjean Dubuc, pour son soutien et son aide tout au long de mon parcours à la maitrise. J'aimerais également remercier Danielle Veilleux pour son assistance technique, François Auclair et Dimitri Ryczko pour leur aide en général et avec certaines expériences ainsi que Frédéric Bernard pour son aide en infographie. J'aimerais, enfin, remercier Arlette Kolta et Guy Doucet d'avoir accepté de faire partie de mon comité de parrainage, ainsi que d'être membres du jury de mon mémoire.

Introduction

Locomotion

La locomotion est une action motrice fondamentale utilisée de manière quotidienne. Elle peut se manifester sous plusieurs formes chez les animaux, comme la marche, la course, la nage ou le vol. Les animaux doivent sélectionner des actions pour subvenir à leurs besoins sensoriels ou à leurs buts. Ce qui reste encore incertain, est de savoir si les mécanismes neuronaux utilisés pour accomplir cette fonction sont les mêmes chez tous les animaux.

Chez les vertébrés, deux caractéristiques communes des différents mécanismes neuronaux utilisés pour la locomotion sont l'alternance des mouvements du corps et la rythmicité de ces mouvements. Ces caractéristiques communes sont contrôlées de manière automatique à un niveau relativement inférieur du système nerveux alors qu'elles peuvent être modifiées et contrôlées à des niveaux supérieurs (revue par Ryczko & Dubuc, 2013). En effet, le patron de la synergie musculaire est généré par le générateur central de patrons (GCP) au niveau de la moelle épinière et permet des mouvements rythmiques qui eux sont initiés et contrôlés par les centres nerveux supraspinaux dans le tronc cérébral et le prosencéphale (Le Ray *et al*., 2011).

Régions liées à la locomotion

De manière générale, les GB ont été identifiés comme étant un groupe de noyaux qui permet de déterminer quel programme locomoteur doit être activé à un

instant précis (revue par Grillner *et al*., 2008; Grillner *et al*., 2005; Hikosaka, 2007). Ils sont influencés par des projections provenant majoritairement du cortex, du thalamus et de la SNc. Les GB projettent ensuite vers des centres de contrôle locomoteur supraspinaux. Deux de ces centres de contrôle locomoteur sont situés d'une part dans le diencéphale (région locomotrice diencéphalique: RLD (El Manira *et al*., 1997; revue par Grillner *et al*., 2008) et d'une autre part dans le mésencéphale : RLM (Le Ray *et al*., 2011). Ceux-ci projettent ensuite vers la formation réticulée (cellules réticulospinales (RS)), qui sert de relais entre les régions locomotrices mésencéphalique et diencéphalique et le réseau locomoteur spinal; le GCP (Brocard & Dubuc, 2003)(Figure 1).

1. Réseaux locomoteurs spinaux

Générateur central de patrons

Le GCP de la locomotion, présent dans la moelle épinière, a été identifié chez plusieurs espèces de vertébrés comme la lamproie (Cohen & Wallen, 1980) et le xénope (Roberts *et al*., 1981). Le GCP a également été caractérisé en partie chez le triton, le poisson zébré, la tortue, la souris, le rat, le lapin et le chat. Il permet de générer un patron de synergie musculaire et d'effectuer des mouvements volontaires dictés par les régions supraspinales permettant ainsi la locomotion (revue par Ryczko & Dubuc, 2013). Les entrées supraspinales ne sont pas nécessaires pour générer ce patron. En effet une simple stimulation électrique ou

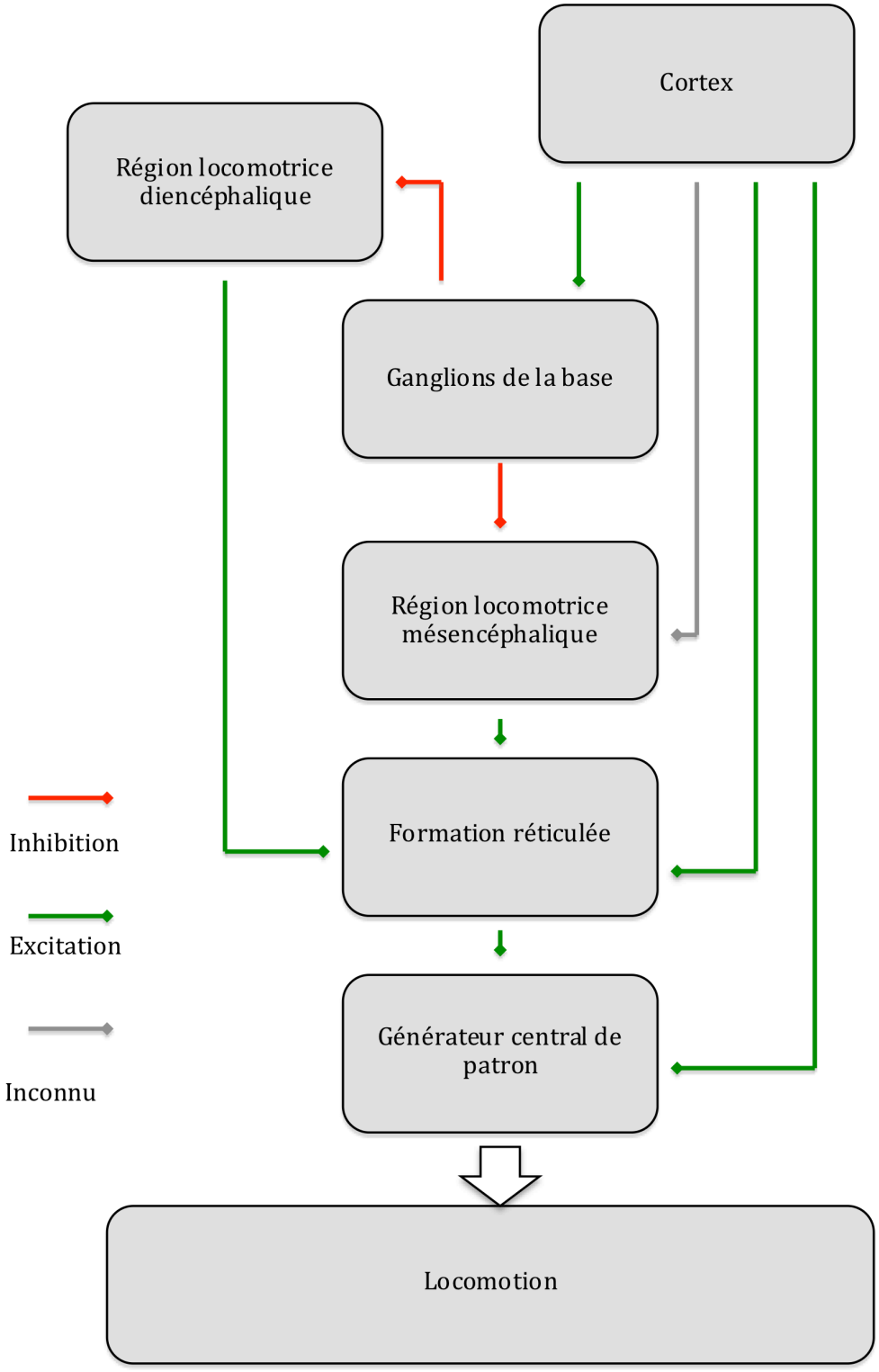

Figure 1

(Cf légende page suivante)

Figure 1

Schéma illustrant les structures utilisées au cours d'une activité locomotrice chez les vertébrés en général. Le cortex envoie des projections excitatrices aux GB, à la formation réticulée et au GCP. Il envoie également des projections à la RLM, mais celles-ci restent encore mal connues. Les GB envoient des projections inhibitrices vers la RLM et la RLD. La RLD et la RLM envoient ensuite des projections excitatrices vers la formation réticulée, qui elle envoie des projections excitatrices vers le GCP. Une fois activé, le GCP génère la locomotion.

chimique du GCP permet l'activation des mouvements de locomotion (Grillner, 1985).

En plus de l'observation du GCP sur plusieurs espèces de vertébrés, des études suggèrent également que le GCP de la locomotion serait présent chez les humains. En effet, durant les première et seconde guerres mondiales, des chirurgiens ont observé que les soldats avec une section totale de la moelle pouvaient quand même générer des mouvements locomoteurs (Holmes, 1915; Kuhn & Macht, 1949; revue par Ryczko & Dubuc, 2013). Des mouvements involontaires et rythmiques rappelant ceux générés par les GCPs chez les animaux ont été décrits pour les membres inférieurs des sujets ayant subi une section partielle de la moelle au niveau cervical et des sujets avec une paraplégie complète (Illis, 1995). Plus tard, il a été observé par électromyographie qu'il était possible d'induire une activité locomotrice chez des patients avec une paraplégie complète, tout comme une activation musculaire bilatérale au moyen d'un léger support du poids corporel et d'un entrainement du mouvement de marche sur un tapis roulant (Dietz *et al.*, 1995; Dobkin *et al.*, 1995). Ces résultats indiquent que la région lombo-sacrée de la moelle épinière chez les humains, même privée de contrôle moteur supraspinal, peut répondre à des entrées phasiques sensorielles des membres inférieurs associées à la marche.

Un des GCPs de la locomotion, le mieux caractérisé, est celui de la lamproie pour la nage (Figure 2). La lamproie nage vers l'avant en alternant l'activation des neurones moteurs de chaque côté du corps et en propageant cette activité de manière rostrocaudale le long du corps, permettant ainsi un mouvement

ondulatoire en forme de « S » (Rovainen, 1976). Chaque segment spinal contient un réseau neuronal pouvant générer l'activité rythmique alternée des neurones moteurs de chaque côté du corps (Grillner *et al.*, 1995). Les cellules RS initient l'activation des neurones spinaux par leurs projections glutamatergiques sur ceux-ci, permettant ainsi d'augmenter l'excitabilité de tous les neurones dans le segment du réseau par l'activation des récepteurs N-methyl-D-aspartate (NMDA) et non- N-methyl-D-aspartate (non-NMDA). Sur chaque côté, l'interneurone excitateur (E) contrôle le motoneurone (Mn) et l'interneurone inhibiteur (I). L'axone de l'interneurone I traverse la ligne médiane et inhibe tous les neurones de la partie contralatérale du réseau, s'assurant ainsi que lorsque les muscles d'un côté du réseau sont actifs, les muscles de l'autre côté sont silencieux (Grillner *et al*., 1997).

Formation réticulée

Une caractéristique commune de toutes les espèces de vertébrés est le rôle crucial joué par les cellules RS de la formation réticulée servant de relais entre les entrées provenant de la RLM vers le GCP de la locomotion (Rovainen, 1974; Buchanan & Cohen, 1982).

Chez le chat, les cellules RS ont été identifiées suite à des lésions de la moelle épinière thoracique (Orlovsky, 1970). L'auteur a entrainé des chats à marcher sur un tapis roulant et a ensuite procédé à la section transverse de la moelle épinière thoracique. Il a observé que la récupération de la fonction locomotrice des membres inférieurs était étroitement liée aux axones épargnés dans au moins un des quadrants ventrolatéraux de la moelle. Ces éléments essentiels seraient en lien avec

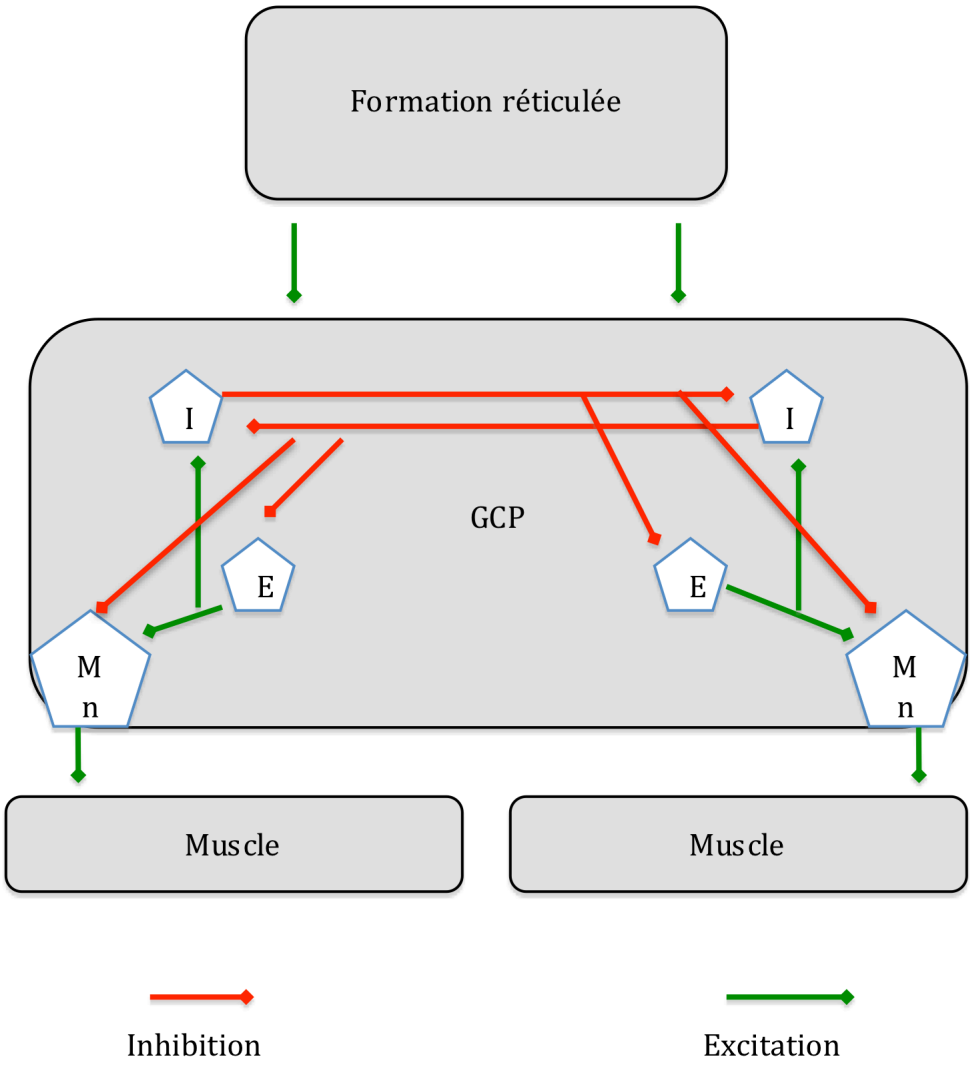

Figure 2

(Cf légende page suivante)

Figure 2

Schéma illustrant les différentes structures du générateur central de patrons de la locomotion chez la lamproie. L'interneurone E permet l'activation du Mn. Celui-ci étant activé, permet la contraction des muscles ipsilatéraux. L'interneurone E permet également l'activation de l'interneurone I qui, lui, inhibe tous les neurones contralatéraux. L'interneurone E contralatéral étant inhibé, ne peut permettre l'activation du Mn et donc la contraction musculaire contralatérale n'est pas possible au même moment. La formation réticulée permet l'activation de tous les interneurones (Grillner, 2003).

les systèmes vestibulospinal et réticulospinal. En effet Deliagnina et ses collaborateurs (1975) ont observé des mouvements rythmiques de grattement, rappelant les mouvements rythmiques de la marche, à la suite de la stimulation des segments C1-C2 de la moelle épinière chez des chats décérébrés. De plus, des enregistrements faits dans les noyaux réticulés latéraux chez le chat ont montré que la fréquence de décharge de ces neurones est rythmiquement modulée en relation avec le cycle de grattement (Arshavsky *et al.,* 1978).

Chez la lamproie, les cellules RS ont été décrites anatomiquement et physiologiquement. Elles constituent environ 90% des neurones qui projettent à la moelle épinière (Bussières & Dubuc, 1992; Davis & McClellan, 1994). Les cellules RS de la lamproie sont situées dans le noyau mésencéphalique réticulaire (MRN) et dans trois noyaux rhombencéphaliques réticulaires: le noyau antérieur (ARRN), le noyau moyen (MRRN) et le noyau postérieur (PRRN) (Nieuwenhuys, 1972; Brodin *et al*., 1988; Davis & McClellan, 1994; Swain *et al.,* 1993). Il y a environ 2500 cellules RS et 85% de ces cellules proviennent du MRRN et du PRRN (Bussières, 1994). Des enregistrements faits simultanément de la MRRN et du PRRN ont montré que les cellules RS du MRRN sont activées à des seuils d'intensité de stimulation plus bas, alors que les cellules RS du PRRN déchargent seulement à des seuils d'intensité de stimulation plus élevés, lorsque les cellules RS du MRRN ont atteint leur taux de décharge maximal (Brocard & Dubuc, 2003) (Figure 3). La majeure partie des cellules RS utilise le glutamate comme neurotransmetteur.

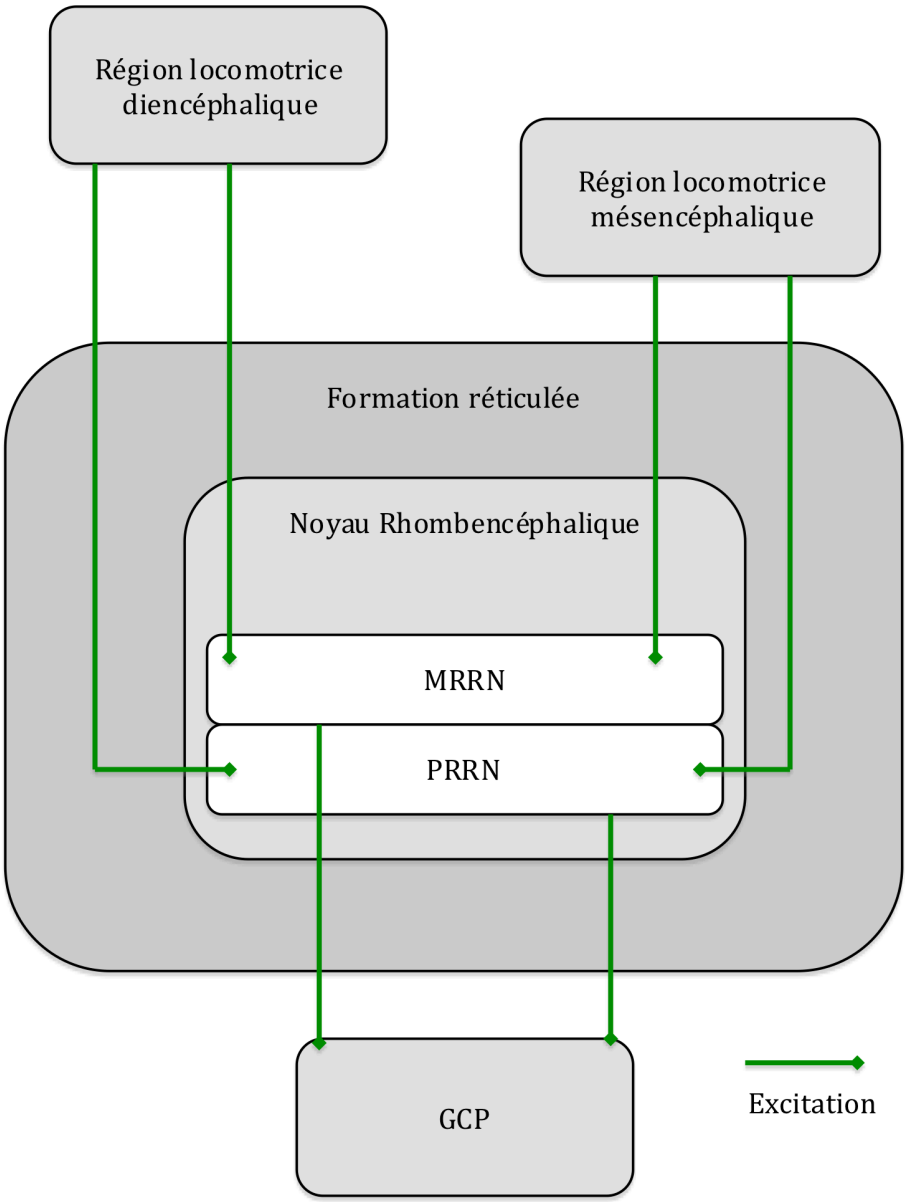

Figure 3

(Cf légende page suivante)

Figure 3

Schéma illustrant les structures de la formation réticulée impliquées dans la locomotion chez la lamproie. La RLM et la RLD envoient des projections excitatrices au MRRN et au PRRN. Le MRRN et le PRRN envoient ensuite des projections excitatrices au GCP locomoteur spinal. Celui-ci génère ensuite la locomotion.

Il a été observé qu'une voie glutamatergique descendante de la RLM vers les cellules RS est impliquée dans l'initiation de l'activité locomotrice. Chez la lamproie, l'administration d'agonistes glutamatergiques au niveau des cellules RS initie l'activité locomotrice (Wannier *et al*., 1998; Brocard & Dubuc, 2003). Wannier et ses collaborateurs. (1998) ont observé, à la suite de la microstimulation (agonistes glutamatergiques) de différents sites des quatre différents noyaux réticulés, l'augmentation de l'activité locomotrice générée par la moelle. Ils ont observé que la majorité des sites stimulés qui engendraient une augmentation de l'activité locomotrice étaient situés au niveau du PRRN (18% ARRN; 31% MRRN et 55% PRRN). L'administration d'antagonistes glutamatergiques au niveau des cellules RS diminue l'activité locomotrice initialement engendrée par la stimulation de la RLM (27% des sites au niveau de l'ARRN, 28% au niveau MRRN et 5% au niveau du PRRN).

Takakusaki et ses collaborateurs (1989) ont observé chez le chat des entrées inhibitrices au niveau des motoneurones spinaux contrôlant les membres postérieurs en mesurant le potentiel post-synaptique, suite à l'application d'agonistes glutamatergiques spécifiques aux récepteurs NMDA au niveau des cellules RS.

De plus, lors de l'enregistrement des cellules RS chez la lamproie, il a été observé que le niveau d'activation des cellules RS est fortement corrélé avec la vigueur de la locomotion (caractérisée par la fréquence des ondulations du corps, l'amplitude des bouffées (par électromyographie) et la force de propulsion de l'animal) (Wannier *et al*., 1995).

En bref, les cellules RS chez la lamproie permettent l'intégration de différents signaux reçus des projections périphériques ou centrales et génèrent une commande locomotrice cohérente vers les réseaux locomoteurs spinaux (Brocard & Dubuc, 2003; Le Ray *et al*., 2011). Ces cellules reçoivent également un feedback du GCP de la locomotion (Dubuc & Grillner, 1989, Antri *et al.*, 2009).

2. Régions locomotrices supraspinales

Région locomotrice diencéphalique

La RLD, une région ventrale du thalamus, a d'abord été identifiée chez le chat (Millhorn *et al.,* 1987) et ensuite chez la lamproie en 1997 par El Manira et ses collaborateurs. En effet, utilisant des techniques électrophysiologiques et morphologiques, ils ont découvert que la RLD projette directement à la formation réticulée et que cette région joue un rôle dans l'initiation de l'activité locomotrice. Cette étude a également montré que la RLD projette plus précisément vers le MRRN et le PRRN. De plus, ils ont montré que la RLD recoit des entrées du bulbe olfactif, du striatum (Str), du noyau préoptique, de l'hypothalamus, du thalamus dorsal et du tectum optique.

La RLD a été identifiée originairement comme étant la région sous-thalamique locomotrice chez le chat (Orlovsky 1970; revue par Grillner *et al*., 1997; revue par Jordan, 1998) et comme l'hypothalamus latéral chez le rat (Milner & Mogenson, 1988; Sinnamon, 1993). En effet, à la suite des stimulations électriques et chimiques au niveau de l'aire préoptique latérale et au niveau de l'hypothalamus latéral; l'aire périforniculaire et la *zona incerta,* Sinnamon (1993) a montré

l'importance de ces groupes neuronaux dans l'initiation de la locomotion motivationnelle chez le rat.

Région locomotrice mésencéphalique

La RLM a d'abord été décrite chez le chat par Orlovsky et ses collaborateurs en 1966. Ils ont observé qu'une stimulation électrique de la région à la jonction du mésencéphale et du rhombencéphale donnait naissance à une activité de marche ou de course contrôlée. Ils ont observé qu'à de basses intensités de stimulation de la RLM, ceux-ci marchaient, alors qu'à de plus grandes intensités, ils trottaient et ensuite galopaient. Cette région serait donc responsable du contrôle de la sortie locomotrice. Elle fut alors nommée «*région locomotrice mésencéphalique*». Ce centre locomoteur a ensuite été identifié chez plusieurs autres espèces de vertébrés telles que la lamproie, la salamandre, le rat, le lapin, le singe, etc. (revue par Ryczko & Dubuc, 2013). Lorsqu'activée, la RLM produit des synergies musculaires à la base de la marche des mammifères, du vol chez les oiseaux et de la nage chez les animaux aquatiques (revue par Grillner *et al*., 1997). La RLM agirait comme un rhéostat en contrôlant l'amplitude et la fréquence des mouvements locomoteurs (revue par Jordan, 1998; Cabelguen *et al*., 2003; Le Ray *et al.*, 2011).

Il y a très peu d'information jusqu'à ce jour sur les entrées provenant des structures supérieures à la RLM. Il a été révélé que la RLM reçoit surtout des projections des GB, de l'hypothalamus latéral et médian, ainsi que de la matière grise périaqueductale (revue par Jordan, 1998; Le Ray *et al.,* 2011). De plus, il a été démontré chez la lamproie en 2007 par Ménard et ses collaborateurs que le PT,

région homologue à la SNc et à la VTA chez les mammifères, projette aussi à la RLM. La RLM reçoit également des projections, par le PT, de la partie médiane du bulbe olfactif (Derjean *et al.,* 2010). En effet, ils ont observé qu'une stimulation du bulbe olfactif engendrait une activité des cellules RS. Or en inhibant le PT, l'activité des cellules RS et de la RLM était abolie. Ceci montre donc qu'il existe un sous-système spécifique dans le système nerveux central permettant de produire un comportement locomoteur à la suite d'une entrée olfactive (Derjean *et al.,* 2010).

La RLM a été identifiée chez la lamproie par Sirota et ses collaborateurs, (2000) suivant la stimulation électrique de la région périventriculaire du mésencéphale caudal sur des lamproies semi-intactes (le bas du corps est conservé permettant la nage et une partie du haut du corps est retirée permettant ainsi d'exposer le cerveau). Des mouvements rythmiques ont été observés tout au long de cette stimulation. Ces mouvements locomoteurs augmentaient avec l'intensité et la fréquence de la stimulation. De plus, suivant leurs expériences électrophysiologiques et un marquage rétrograde à partir du MRRN, ils ont observé que la RLM projette directement vers cette région de la formation réticulée.

Le Ray et ses collaborateurs (2003) ont identifié des entrées monosynaptiques glutamatergiques et cholinergiques de la RLM, responsables de l'excitation des cellules RS, qui, elles, activent le réseau moteur de la moelle épinière. En effet, la RLM de la lamproie excite les cellules RS de manière monosynaptique, non seulement ipsilatéralement, mais aussi contralatéralement (Brocard *et al.,* 2010). Les cellules RS projettent ensuite au réseau de la moelle épinière nécessaire

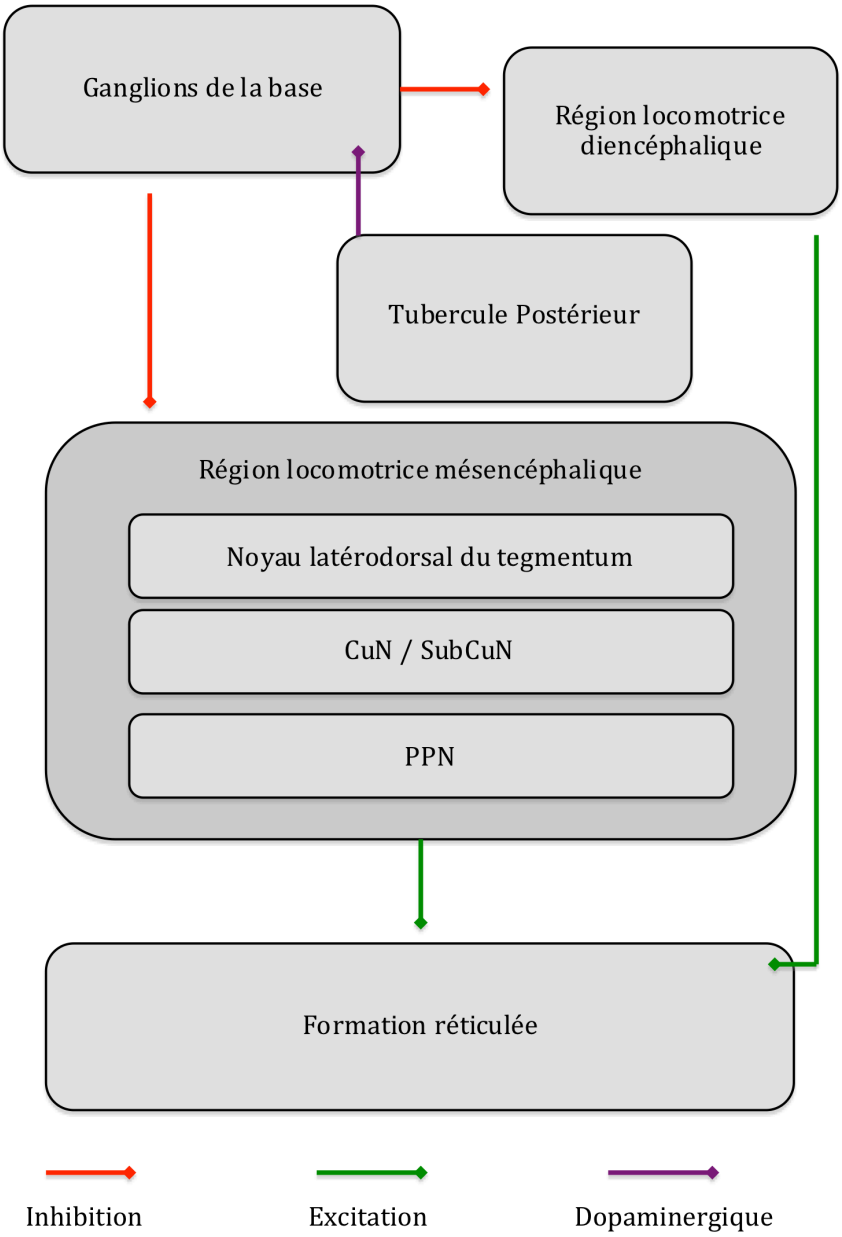

Figure 4

(Cf légende page suivante)

Figure 4

Schéma illustrant les structures de la région locomotrice mésencéphalique et ses connexions en lien avec la locomotion chez la lamproie. Le tubercule postérieur (PT) envoie des projections DA+ aux GB. Ces derniers envoient des projections inhibitrices à la RLM et la RLD. Celles-ci envoient par la suite des projections excitatrices à la formation réticulée.

à la locomotion (Rovainen, 1974; Buchanan *et al*., 1987; Ohta & Grillner, 1989; Viana Di Prisco *et al*., 1995) (Figure 4). En plus de projeter aux cellules RS, la RLM active un groupe de cellules muscarinoceptives dans le tronc cérébral qui envoie une forte entrée excitatrice aux cellules RS afin d'amplifier la sortie locomotrice (Smetana *et al*., 2010; Le Ray *et al*., 2011). De plus, il semblerait que la RLM ne contrôle pas seulement l'activité motrice, mais filtre également l'influx sensoriel durant la locomotion (Le Ray *et al*., 2011). En 2012, Gariépy et ses collaborateurs ont montré l'existence de projections glutamatergiques de la partie dorsale de la RLM vers les générateurs de la respiration en utilisant des techniques électrophysiologiques et anatomiques. Ces projections montrent que la RLM joue aussi un rôle important dans les changements respiratoires liés à la locomotion.

Un fait très intéressant est observé chez le triton. Cet amphibien est capable de nager à la manière d'une lamproie, et de marcher sur terre. Les membres sont activés toniquement durant la nage et rythmiquement durant la marche (Delvolvé *et al*. 1997). Cabelguen et ses collaborateurs (2003) ont montré que les deux modes de locomotion différents chez la salamandre sont contrôlés selon l'intensité de l'activation de la RLM. En effet, plus l'intensité de la stimulation de la RLM augmente, plus le mouvement de marche augmente en fréquence. À de plus grandes intensités, les membres se rapprochent du corps et le corps se contracte ensuite en alternance de chaque côté de manière rostrocaudale permettant ainsi la nage. La nage et la marche seraient possiblement produites par le même réseau spinal capable de coordonner les mouvements axiaux ainsi que les mouvements des membres. Le mécanisme permettant de passer d'un mode de locomotion à l'autre

n'est pas connu. Cependant, il pourrait reposer sur le recrutement de différents neurones spinaux et/ou le recrutement de différents types de cellules RS d'un mode locomoteur à l'autre (revue par Ryczko *et al.,* 2010).

Chez les mammifères, il est connu qu'une entrée GABAergique majeure provient des GB, plus particulièrement de différentes régions du pallidum. Ces neurones inhibent de manière tonique leurs cibles (Takakusaki, 2003). Ménard et ses collaborateurs (2007) ont montré que cette entrée GABAergique des GB est aussi présente chez la lamproie. Cependant, les mécanismes permettant l'activation de la RLM, lorsque les GB sont activés, restent peu compris. Il semblerait que la sélection d'un programme locomoteur pertinent par les GB dépendrait de la désinhibition de la RLM (Hikosaka, 1991). La projection GABAergique la plus abondante vers la RLM provient de la partie caudale du pallium médian, une région qui aurait des similarités avec l'amygdale des vertébrés plus évolués (Ménard *et al.,* 2007).

De plus, grâce à des observations faites chez la lamproie, il a été montré que la RLM reçoit également des projections GABAergiques provenant du Str, de la partie latérale du pallium, qui serait impliquée dans la sélection des programmes moteurs (Garcia-Rill *et al.,* 1990). Il a été proposé que le pallidum ventral et la *substantia nigra pars reticulata* (SNr) pourraient agir de manière similaire et inhiber la RLM (revue par Grillner *et al.,* 1998; Takakusaki, 2008; Le Ray *et al.,* 2011). D'autres projections GABAergiques proviennent également du thalamus et de l'hypothalamus qui pourraient jouer un rôle dans l'aspect motivationnel du comportement moteur chez la lamproie (Ménard *et al.,* 2007).

L'activation de la locomotion chez les mammifères à la suite de la stimulation de la RLM semble activer de manière mono ou di-synaptique les cellules RS de la formation réticulée pontique et médullaire, c'est-à-dire les noyaux *gigantocellularis*, *magnocellularis* et le noyau de raphé (Orlovsk*y,* 1970; Jordan, 1986; revue par Ryczko & Dubuc, 2013), mais des recherches sont encore nécessaires afin d'identifier les projections descendantes détaillées des mammifères (Jordan *et al.,* 2008; revue par Ryczko & Dubuc, 2013).

Les constituants anatomiques de la RLM restent encore un sujet de controverse dans le domaine des sciences neurologiques. Classiquement, la RLM est subdivisée en 3 sous-unités: le noyau pédonculopontin (PPN), le noyau cunéiforme (CuN) et le noyau sous-cunéiforme (SubCuN). Une quatrième sous-unité de la RLM, le noyau latérodorsal du tegmentum (LDT), pourrait aussi jouer un rôle selon des données chez la lamproie (Le Ray *et al.,* 2003) et certaines données anatomiques chez les mammifères (revue par Ryczko & Dubuc, 2013).

a. Noyau cunéiforme

Grillner et ses collaborateurs. (1995) ont proposé le CuN comme étant un des sites les plus efficace pour engendrer la locomotion. En effet, l'activation du CuN du chat, initialement en train de marcher engendre une accélération de sa vitesse de marche (Sterman & Fairshild, 1966). Le CuN reçoit des entrées de différentes structures du prosencéphale (Watanabe & Kawana, 1982) et du mésencéphale (Bernard *et al.,* 1989). Des études chez le chat (Steeves & Jordan,

1984) ont montré que ce noyau projette à différentes aires du système nerveux central dont le tegmentum ventromédian du tronc cérébral et la formation réticulée.

Il est important de mentionner que le CuN est subdivisé en CuN et en SubCuN chez certaines espèces comme le chat (Taber, 1961; Edwards, 1975) et chez l'humain (Olszewski & Baxter, 1954), mais pas chez tous les vertébrés (Alam *et al*., 2011). Cette subdivision décrite chez les humains est basée sur des différences cytoarchitecturales (Olzewski & Baxter, 1954).

b. Noyau pédunculopontin

Comparativement au CuN, l'activation chimique du PPN chez le rat engendre seulement de brefs épisodes de locomotion (Garcia-Rill *et al.,* 1985, 1990). Le PPN reçoit en général des entrées du cortex, de l'hypothalamus et des GB (la SNr, le globus pallidus interne (GPi), le Str et le noyau sous-thalamique (STN) majoritairement) (revue par Ryczko & Dubuc, 2013). Il projette ensuite vers la SNc et vers le thalamus. Le PPN projette également à la formation réticulée, lui permettant, de ce fait, de jouer un rôle stratégique dans la régulation de l'initiation des mouvements (Pahapill & Loranzo, 2000).

Ganglion de la base

Les GB sont connus pour leurs rôles multiples dont celui de déterminer quel programme moteur doit être activé à un instant précis (revue par Grillner *et al.,*

1997, 2008; Le Ray *et al.,* 2011) ou celui de l'apprentissage procédural (Redgrave *et al.,* 1999; Stephenson-Jones *et al.,* 2011, 2012; Ericsson *et al.,* 2013).

Les GB en lien avec la locomotion ont d'abord été le sujet d'une conférence (Annals of the Royal College of Surgeon of England) donnée en 1963 par Martin. Dans cette conférence, il a été mentionné que quatre éléments sont essentiels à la locomotion et qu'ils doivent être présents simultanément et continuellement: un support antigravitationnel du corps, la marche, un degré adéquat d'équilibre et un moyen de propulsion. Or, suite à leur étude sur des patients souffrant d'*encephalitis lethargica*, une maladie affectant les GB, tout comme la maladie de Parkinson, il a été observé que ces patients montraient des déficits locomoteurs et que cela semblait s'aggraver avec le temps (Martin, 1963).

Les GB sont constitués de 6 noyaux principaux: le Str, GPi et le globus pallidus externe (GPe), le STN et la SNr et la SNc (Stephenson-Jones *et al*., 2012).

Il a récemment été révélé que les circuits des GB sont conservés de la lamproie jusqu'à l'humain (Pombal *et al*., 1997a; Robertson *et al.*, 2012; revue par Ryczko & Dubuc, 2013). Les interactions entre les différents noyaux des GB sont conservées tout autant que les propriétés cellulaires et synaptiques, ainsi que les neurotransmetteurs. L'impact comportemental des GB dépend de ses entrées et sorties. Chez la lamproie, Stephenson-Jones et ses collaborateurs (2011) ont montré que la majorité des sorties des GB projette directement vers les aires motrices du tronc cérébral, incluant le tectum optique, le prétectum et la RLM, ce qui suggère que les fonctions de base des GB chez la lamproie sont de déterminer l'action locomotrice et d'envoyer cette information au tronc cérébral. Les GB projettent

aussi vers la RLD, permettant également un certain contrôle locomoteur à ce niveau. Grillner et ses collaborateurs (2013) considèrent que le rôle des circuits des GB est conservé tout au long de l'évolution, ce pour des activités locomotrices simples.

Le Str est séparé en trois subdivisions importantes: le noyau caudé, le putamen et le striatum ventral (qui inclut le noyau accumbens (NAcc)). Le Str constitue la porte d'entrée principale des GB. Il reçoit plusieurs projections de la majorité des aires du cortex. Celles-ci sont des projections excitatrices glutamatergiques dirigées aux portions spécifiques du Str. Celui-ci reçoit aussi des projections excitatrices du thalamus et des projections DA+ du mésencéphale (Hoover & Strick, 1993).

Chez les mammifères et les oiseaux, la sortie des GB est acheminée par deux noyaux: le GPi et SNr. La sortie des GB consiste en une activité tonique GABAergique qui cible les centres du tronc cérébral responsables de différents patrons de comportement comme le mouvement des yeux, le mouvement locomoteur, la posture et l'alimentation (Grillner *et al.,* 2013). Afin de pouvoir activer une commande motrice, l'inhibition GABAergique du GPi/SNr doit être temporairement diminuée. Cela peut être accompli par l'activation des neurones GABAergiques de la voie directe des GB, inhibant ainsi GPi/SNr. L'inhibition tonique des centres moteurs au repos permet de prévenir les différents programmes moteurs de devenir actifs lorsqu'ils ne sont pas sollicités.

Des études chez les amniotes ont caractérisé le striatum (caudé/putamen) et le NAcc par un dense plexus de fibres catécholaminergiques. Ce plexus consiste en des fibres et terminaisons DA+, noradrénergiques et adrénergiques. Les cellules

dont les fibres DA+ surgissent sont la VTA, la SNc et l'aire rétrorubrale (Parent, 1986). Le nombre de neurones DA+ projetant au NAcc (provient majoritairement de la VTA) est plus important que celui qui projette au Str (provient majoritairement de SNc) (Marín *et al*., 1997).

La DA est synthétisée dans les terminaisons présynaptiques à partir de la tyrosine qui est convertie en L-3,4- dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) à l'aide de l'enzyme TH. Ensuite, la L-DOPA est transformée en DA à l'aide de l'enzyme acide aromatique amino décarboxylase (Moore & Bloom., 1978). L'enzyme TH permet également la synthèse de deux autres catécholamines: la noradrénaline et l'adrénaline (Yamamoto & Vernier., 2011). La DA, la noradrénaline et l'adrénaline sont les principales catécholamines utilisées dans le système nerveux (Pombal *et al*., 1997b).

Les cellules qui sont TH-immunoréactives (TH+) et qui projettent au NAcc et au Str proviennent en effet de la VTA et de SNc, mais aussi de 2 autres centres: le locus coeruleus et le noyau du tractus solitaire (Fallon & Moore, 1978; Aston-Jones *et al.*, 1985; Kitt & Brauth, 1986; Siemen & Künzle, 1994).

Le Str a été décrit chez la lamproie et est une des masses cellulaires les plus importantes du télencéphale ventral. Il reçoit des projections du thalamus et du pallium latéral qui fournit une entrée glutamatergique excitatrice qui active les récepteurs acide α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique (AMPA) et NMDA des neurones striataux (Pombal *et al.* 1997b). Le Str reçoit des entrées de différentes structures incluant une importante innervation DA+ du diencéphale, plus précisément du PT (homologue à A9 et A10 chez les mammifères) (Pombal *et*

al., 1997b). En utilisant une technique d'hybridation *in situ* et des enregistrements *patch-clamp*, Ericsson et ses collaborateurs (2013) ont montré que les récepteurs DA+ de type D1 (D1) sont exprimés presque exclusivement sur les neurones striataux qui projettent directement à l'homologue de la SNr/GPi. Comme chez les mammifères, l'application d'agonistes des récepteurs DA+ augmente l'excitabilité des neurones exprimant les D1 et diminuant l'excitabilité des neurones exprimant les récepteurs DA+ de type D2 (D2) (Ericsson *et al.,* 2013). Les neurones du Str qui possèdent les D1 projettent directement au GPi (Stephenson-Jones *et al.,* 2011; Grillner *et al.,* 2013), alors que les neurones du Str qui possèdent les D2 projettent au GPi par le GPe et le STN (Stephenson-Jones *et al.,* 2011).

Les récepteurs DA+ sont des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G qui incluent deux classes majeures: type D1 et type D2 (Zawilska, 2003). Les récepteurs DA+ de type D1 incluent les récepteurs D1 et D5 (Emilien *et al.,* 1999) et activent l'adénylyl cyclase via les sous-unité Gsa (protéine Gs sous-unité alpha) qui mène à une augmentation de la concentration d'AMPc (acide α-Amino-3-hydroxy-5) (Kebabian & Calne, 1979). Ces récepteurs sont abondants dans le caudé-putamen, NAcc et le tubercule olfactif (OT) et également au niveau du cortex cérébral, du système limbique, de l'hypothalamus et du thalamus (Mengod *et al.,* 1989). Les récepteurs DA+ de type D2 incluent D2, D3 et D4 (Yamamoto & Vernier, 2011; Zawilska, 2003). Ils sont hautement exprimés de manière post-synaptique dans le caudé-putamen, NAcc et OT (Mengod *et al.,* 1989), et aussi comme autorécepteurs sur les dendrites DA+ dans les deux tiers de la partie médiane de la SNc et une partie dorsale de la VTA (Moore & Bloom, 1978; Akaoka *et al.,* 1992).

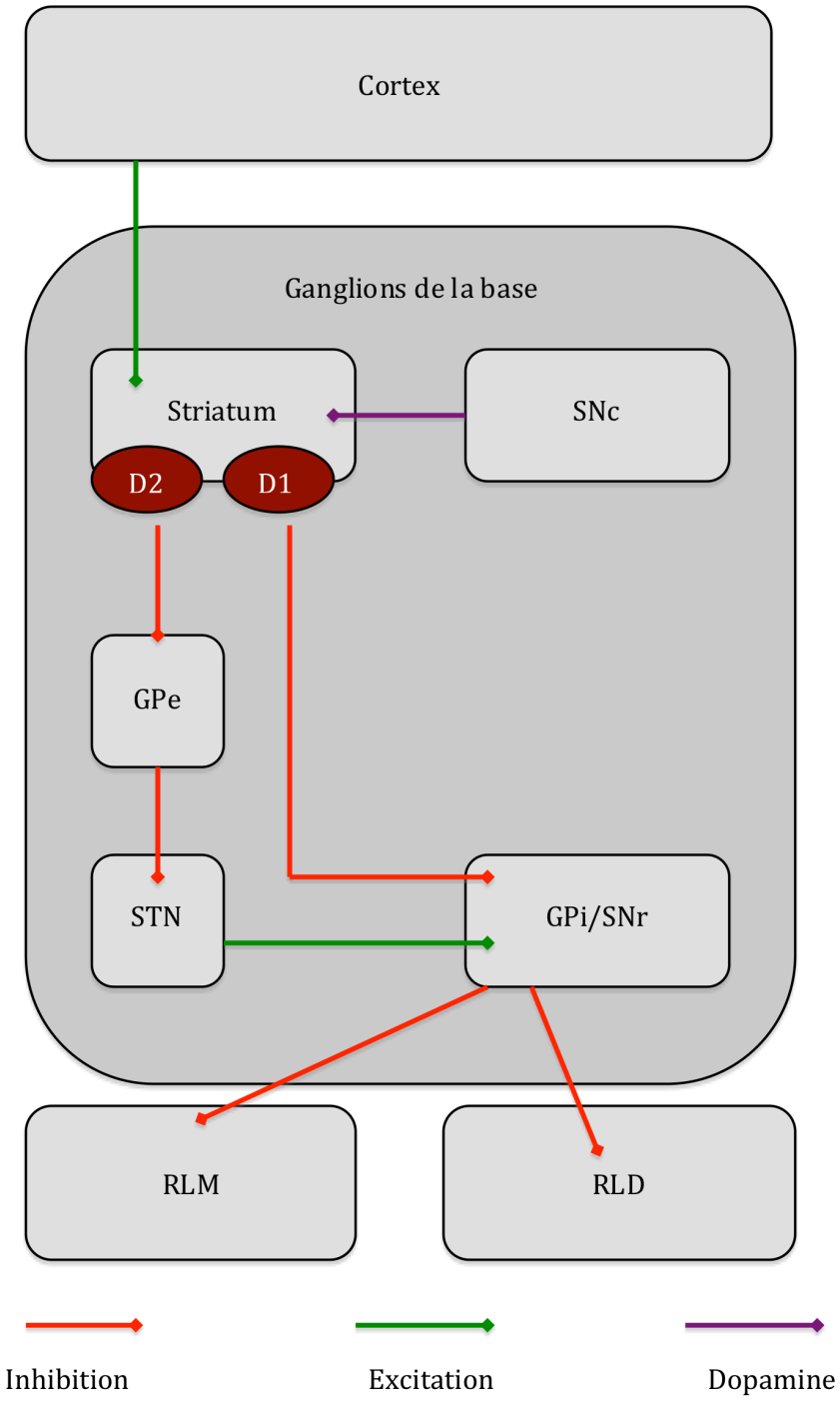

Figure 5

(Cf légende page suivante)

Figure 5

Schéma illustrant les voies directe et indirecte des ganglions de la base responsables du contrôle de la locomotion. Le Str reçoit des entrées excitatrices du cortex. La SNc envoie des projections DA+ au Str, qui permet de contrôler la voie directe et indirecte par les D1 et D2. Le Str projette vers le GPi/SNr selon deux voies différentes; directe et indirecte. La voie directe est influencée par D1 et inhibe directement le GPi par ses projections GABAergiques. Le GPi envoie des projections inhibitrices à la RLM et à la RLD. Le GPi étant inhibé, l'activité locomotrice est donc permise, car l'inhibition des régions locomotrices est inhibée par les projections provenant du Str. La voie indirecte est influencée par les D2 et inhibe le GPe qui lui ne peut plus inhiber le STN (Jeon *et al*., 2003). Le STN, alors désinhibé, envoie une projection glutamatergique plus forte sur le GPi/SNr et donc augmente l'activité de ces deux structures de sortie des GB, qui projettent aux régions locomotrices. La voie indirecte permet donc d'inhiber l'activité locomotrice.

Le Str projette aux différents noyaux des GB selon deux voies distinctes: la voie directe et la voie indirecte (Figure 5). La voie directe permet le mouvement locomoteur alors que la voie indirecte l'inhibe. Les neurones GABAergiques du Str qui projettent au GPi constituent le premier relais de la voie directe. Le GPi envoie ensuite des projections GABAergiques au thalamus et vers le PPN. La voie directe permet alors d'inhiber l'inhibition sur le thalamus et le PPN et ainsi de permettre le mouvement. Les interneurones GABAergiques du Str qui projettent au GPi via le GPe et le STN constituent le premier relais de la voie indirecte. Une fois le GPe inhibé, il ne peut plus inhiber le STN par ses projections GABAergiques sur celui-ci. L'activation du STN, qui envoie des projections glutamatergiques au GPi, permet ainsi une sur-activation du GPi et donc une plus grande inhibition du thalamus et du PPN. Les voies directe et indirecte sont contrôlées par des entrées DA+ provenant de la VTA et de la SNc (Ericsson *et al.,* 2013). La DA libérée à la synapse du Str permet ainsi d'agir sur les D1 et D2. Les D1 contrôlent la voie directe, alors que les D2 contrôlent la voie indirecte (Grillner *et al.,* 2013). En effet, la DA augmente l'excitabilité des neurones striataux de la voie directe par les D1 et diminuent l'excitabilité des neurones striataux de la voie indirecte par les D2 (Surmeier *et al.,* 2007; revue par Ryczko & Dubuc, 2013). Cela explique également les effets hypo-locomoteurs d'une déplétion de la DA, en cas de dégénérescence des neurones DA+, comme dans la maladie de Parkinson, ainsi que les effets hyper-locomoteurs d'une stimulation du système DA+ tant chez la lamproie (Thompson *et al.,* 2008; Ericsson et al., 2011; revue par Ryczko & Dubuc, 2013) que chez l'humain (Albin et al., 1989; revue par Ryczko & Dubuc, 2013). Bref, une balance fonctionnelle entre les voies

directe et indirecte des GB contrôle l'inhibition nette de la sortie de ceux-ci (Kravitz *et al.,* 2010; revue par Ryczko & Dubuc, 2013).

Aire tegmentaire ventrale et substance noire *pars compacta*

La VTA et la SNc sont deux composantes très importantes dans cette étude, puisqu'elles jouent un rôle très central dans la modulation de l'activité des GB, comme mentionné précédemment.

Les projections de la VTA vers les GB ont d'abord été identifiées chez le rat par Mogenson et ses collaborateurs (1979). À la suite d'injections d'antagonistes GABAergiques au niveau de la VTA, ceux-ci ont observé la provocation d'une activité locomotrice chez celle-ci. Cette activité induite se voyait atténuée lorsque le NAcc était prétraité avec un antagoniste DA+. Cette étude a donc permis de démontrer qu'il existe des projections DA+ de la VTA vers le Str qui contribuent à contrôler l'activité locomotrice. Ce groupe de neurones DA+ présent dans la VTA se nomme A10. Ces neurones sont regroupés en noyau au niveau du plancher du tegmentum mésencéphalique (le noyau interfasciculaire, le noyau linéaris, le noyau *parabrachial pigmentosus*, le noyau *paranigralis*) caudal et rostral (Oades & Halliday, 1987).

Proche de ces limites, d'autres groupes de neurones DA+ ont été définis; un au niveau de la formation réticulée dorsolatérale (A8), un au niveau de la SNc (A9) et un autre au niveau du noyau périventriculaire (A11) (Oades & Halliday, 1987).

Plusieurs des neurones de la SNc projettent au Str dorsal, contrôlant ainsi majoritairement les programmes sensori-moteurs (système nigro-strié). Les cellules

DA+ A10 projettent aux aires reliées au système limbique comme les GB, plus précisément le NAcc, ou amygdale (système méso-limbique) et au cortex préfrontal (système méso-cortical) (Yamamoto & Vernier, 2011).

Les projections DA+ de la SNc vers les GB ont d'abord été identifiées par Tennyson et ses collaborateurs (1975) chez le lapin. Des techniques biochimiques ont permis d'observer la maturation des axones de la SNc jusqu'au caudé/putamen du Str des GB.

Il est important de mentionner que les groupes DA+ A8 à A10 sont souvent nommés comme étant des groupes de cellules DA+ du mésencéphale. Par contre, elles ne sont pas restreintes seulement au mésencéphale, mais s'étendent jusqu'au territoire diencéphalique ventral (Yamamoto & Vernier, 2011).

La région mésodiencéphalique de la lamproie et du triton

La région mésodiencéphalique contenant des neurones DA+ chez la lamproie (Baumgarten, 1972) et le triton (Marín *et al.,* 1997) a été identifiée comme étant homologue à la VTA et la SNc précédemment discutées chez les mammifères (Pombal *et al.,* 1997a). Chez la lamproie, ces neurones sont situés entièrement et uniquement dans le PT (diencéphale ventral caudal), à la jonction du diencéphale et du mésencéphale (Figure 6). Chez le triton, ces neurones sont aussi situés dans le PT mais s'étendent également dans le mésencéphale. On peut les voir jusqu'au niveau du noyau des motoneurones oculomoteurs.

Baumgarten (1972), a mis en évidence, dans son étude, les limites rostro-caudales et dorso-ventrales qui définissent la région du PT chez la lamproie. De

manière rostro-caudale, le PT s'étend du thalamus ventral jusqu'au noyau du faisceau longitudinal médian (N.f.l.), alors que de manière dorso-ventrale, il s'étend du thalamus dorsal jusqu'au noyau de l'hypothalamus dorsal et la commissure du PT. Les Figures 7 et 8 illustrent la localisation du PT chez la lamproie. La Figure 7 montre une coupe para-sagittale du cerveau de la lamproie. Sur cette figure, il est facile d'identifier le PT par la bosse postérieure dans le ventricule (identifiée par un halo rouge sur la Figure 7). La Figure 8 montre une coupe transverse du cerveau de la lamproie qui passe au travers du PT.

Le cœur du sujet de ce travail était basé majoritairement sur les projections DA+ descendantes en provenance de la région mésodiencéphalique chez la lamproie et le triton. Il est donc très important de définir les différents noyaux DA+ de cette région chez ces deux espèces, ainsi que leurs projections, connues vers les GB.

Pombal et ses collaborateurs, (1997b) ont observé, sur la lamproie de rivière, *Lampetra fluviatilis*, à la suite d'immunohistochimie de la DA, et un marquage rétrograde à partir du Str, que la majorité des cellules DA+ qui projettent à celui-ci sont situées au niveau du noyau du PT (Figure 9, 10 et 11), du noyau postérieur paratuberculaire et du locus coeruleus.

Il est important de faire la nuance entre le PT et le noyau du PT, puisque l'étendue du PT reste plutôt imprécis, alors que l'étendue du noyau du PT a été définie anatomiquement de manière beaucoup plus précise. Les cellules DA+

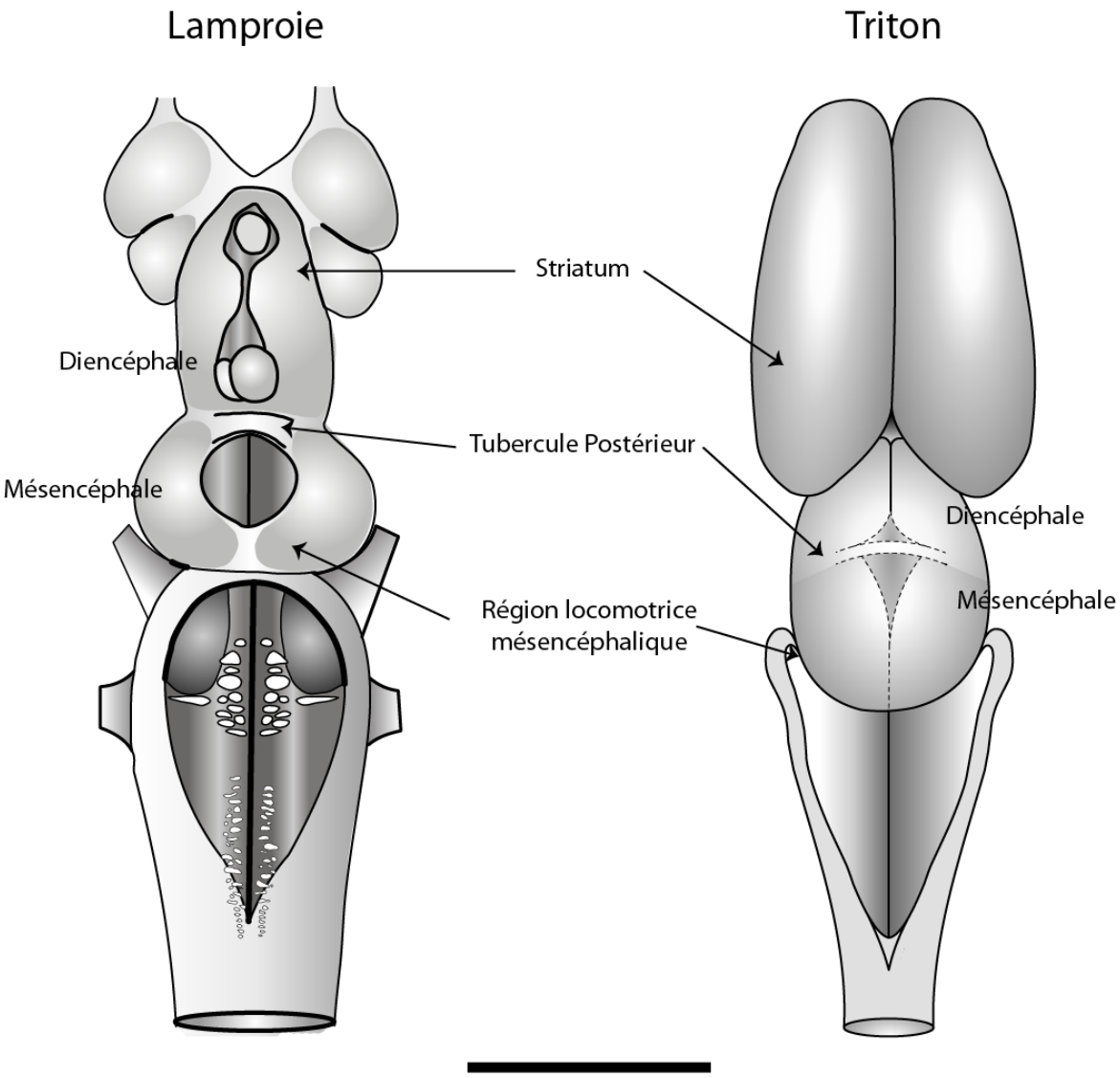

Figure 6

Schéma illustrant une vue dorsale des cerveaux de lamproie et de triton avec la localisation sommaire des régions principales à l'étude. Échelle: 250 µm.

.

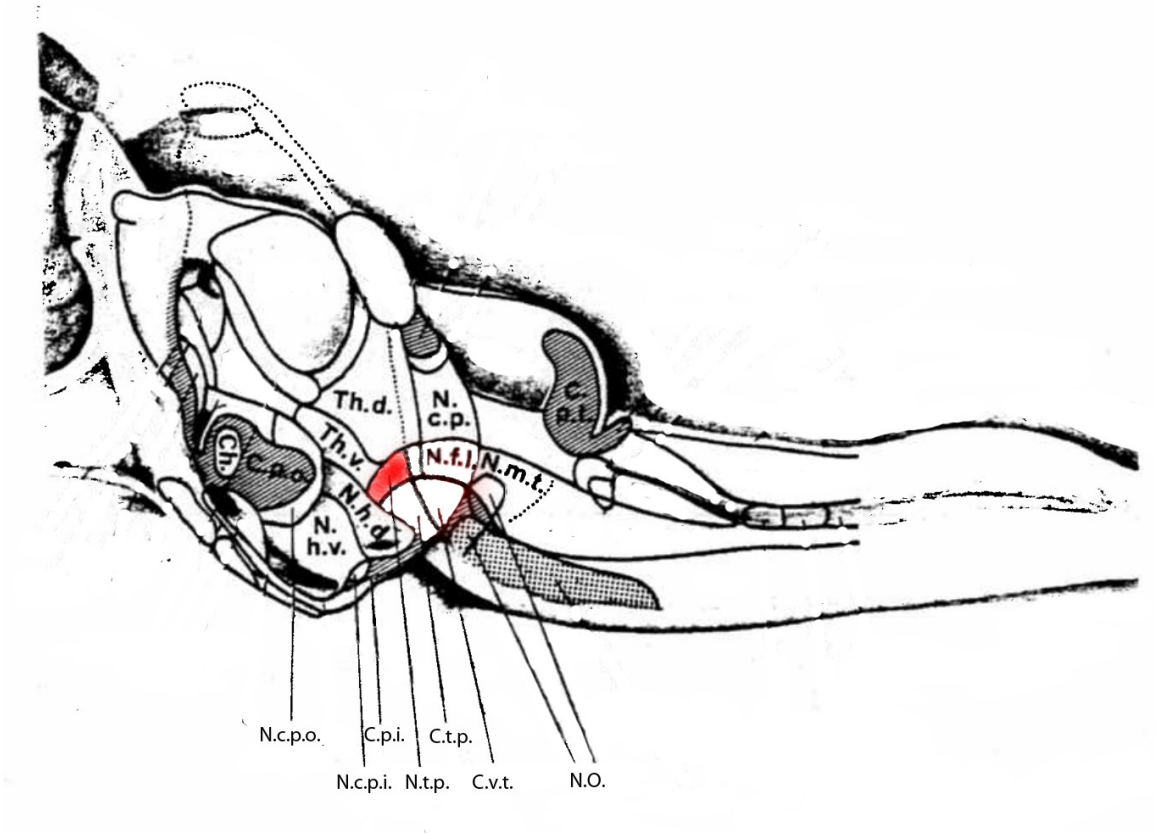

Figure 7

(Cf légende page suivante)

Figure 7

Section médio-sagittale du cerveau de lamproie, *Lampetra fluviatilis*. Cette figure est tirée de Baumgarten (1972). Le noyau du tubercule postérieur est présenté sur cette figure par l'abréviation N.t.p.. Il est bordé par Th.v (thalamus ventral), Th.d (thalamus dorsal), N.f.l. (noyau du faisceau longitudinal médian) et C.t.p. (commissure du tubercule postérieur). C.h.: chiasma optique; C.p.i.: commissure post-infundibulaire; C.p.o.: commissure post-optique; C.p.t.: commissure post-tectalis; C.v.t.: commissure du tegmentum ventral; N.c.p.i.: noyau de la commissure post-infundibulaire; N.c.p.: noyau de la commissure postérieure; N.c.p.o.: noyau de la commissure post-optique; N.h.d: noyau de l'hypothalamus dorsal; N.h.v: noyau de l'hypothalamus ventral; N.O.; noyau occulomoteur; N.m.t.: noyau du tegmentum moteur. Le halo rouge présente le PT.

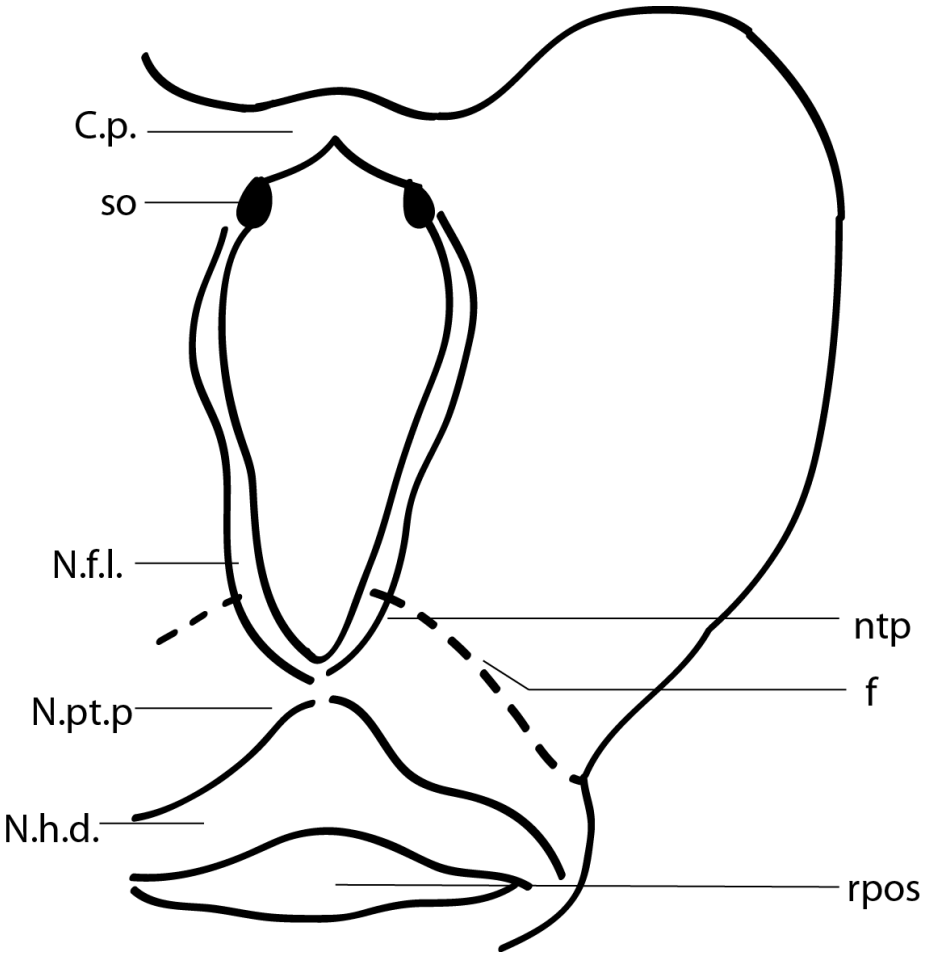

Figure 8

Coupe transverse du cerveau de lamproie, *Lampetra fluviatilis,* à la jonction entre le mésencéphale et le diencéphale et passant au travers du tubercule postérieur. Cette figure est tirée et adaptée de Baumgarten (1972). Le noyau du tubercule postérieur (ntp) est bordé dorsalement par le noyau du faisceau longitudinal médian (N.f.l.) et ventralement par le noyau de l'hypothalamus dorsal (N.h.d). C.p.: commissure postérieure; f: faisceau rétrofléchi; N.pt.p: noyau paratuberculaire postérieur; so: organe sous-commissural; rpos; récessus postérieur.

du noyau du PT sont petites (5-10 μm), rondes et sont situées autour de la ligne médiane, dorsalement au récessus postérieur. La région du récessus postérieur est également nommée par d'autres la région mamillaire.

La Figure 9 montre les cellules DA+ au niveau du PT chez la lamproie de rivière, alors que la Figure 10 montre les cellules marquées de manière rétrograde à partir du Str au niveau du PT. La Figure 11 montre des photos du PT qui illustrent les cellules TH+ marquées de manière rétrograde à partir du Str, confirmant ainsi les projections TH+ du PT au Str chez la lamproie. Il est à noter que Pombal et ses collaborateurs (1997) ont trouvé peu de cellules DA+ qui projetaient au Str à partir du PT. Le plus grand nombre de ces cellules qu'ils ont identifiées chez une lamproie est de 7.

Les mêmes auteurs mentionnent que chez une autre espèce de lamproie, *Petromyzon marinus*, celle à l'étude ici, le groupe DA+ situé au niveau du PT contient beaucoup plus de cellules (Pombal *et al.,* 1997b).

Il est important de noter deux types de populations DA+ au niveau de la région du PT chez la lamproie. Comme le montre la Figure 9, les corps cellulaires DA+ de la partie ventrale du PT et autour du récessus postérieur (triangles), sont en contact avec le liquide céphalo-rachidien, alors que d'autres corps cellulaires DA+ de la partie dorsomédiane du PT (ronds) ne sont pas en contact avec le liquide céphalo-rachidien (Pombal *et al.,* 1997b ;Pierre-Simons *et al.,* 2002). Les corps cellulaires qui font contact avec le liquide céphalo-rachidien, ont aussi été identifiés comme faisant partie de la région mamillaire. Il est important de noter qu'aucun corps cellulaire DA+ de la région mamillaire ne projette au Str (Pombal *et al*., 1997b).

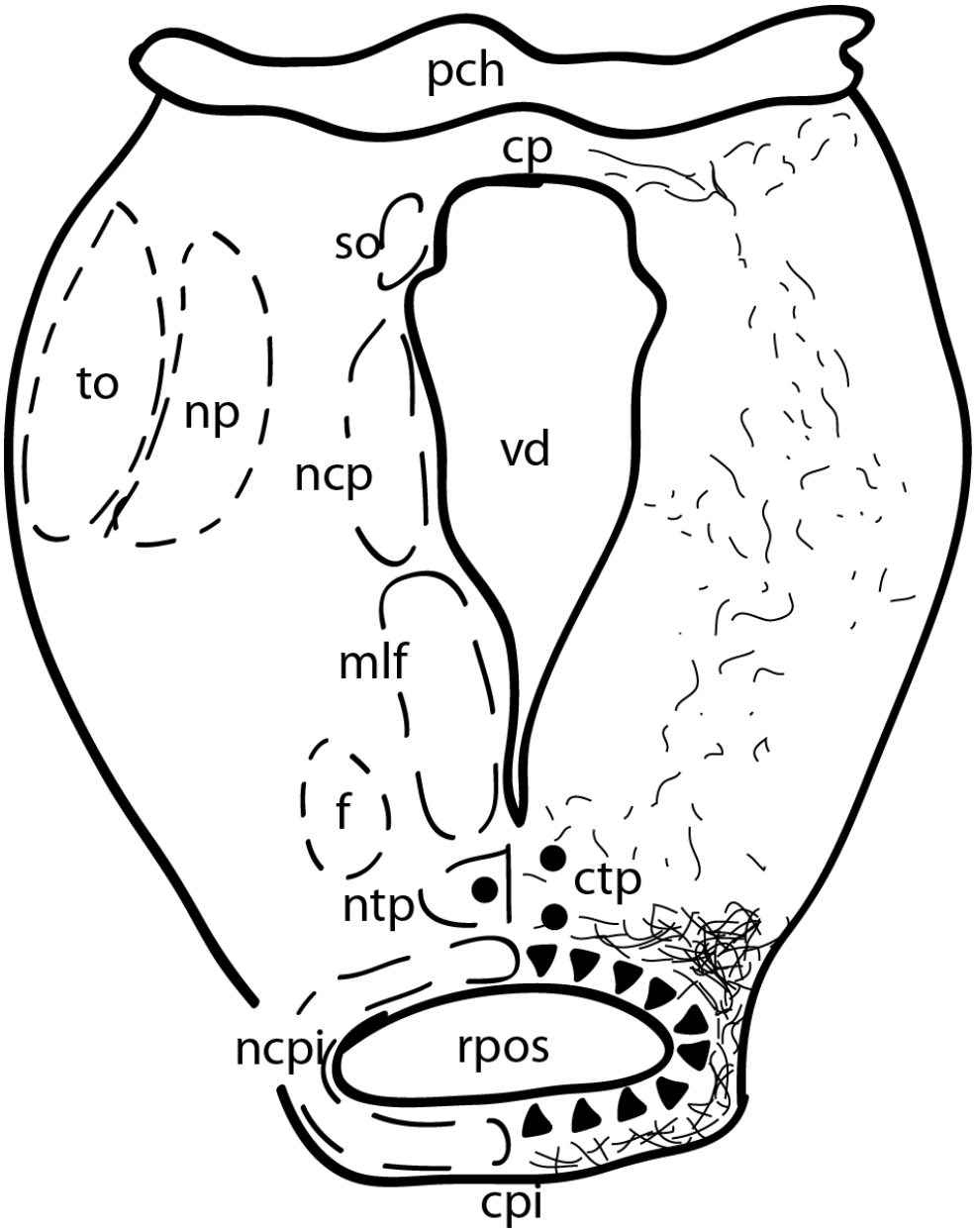

Figure 9

(Cf légende page suivante)

Figure 9

Coupe transversale du cerveau de lamproie, *Lampetra fluviatilis,* au niveau du tubercule postérieur présentant les cellules DA+ suivant une détection immunohistochimique de la DA. Cette figure est tirée et adaptée de Pombal *et al.,* (1997b). Les corps cellulaires dopaminergiques qui contactent le fluide cérébrospinal sont représentés par des triangles, alors que ceux qui ne contactent pas le fluide cérébrospinal sont représentés par des ronds. Les fibres dopaminergiques sont présentées par des lignes pointillées. Cp: commissure postérieure; cpi: commissure post-infundibulaire; ctp : commissure post-tectalis; f: faisceau rétrofléchi; mlf: faisceau longitudinal médian; ncp: noyau de la commissure postérieur; ncpi: noyau de la commissure post-infundibulaire; np: noyau pré-tectalis; ntp: noyau du tubercule postérieur; pch: plexus choroïdien; rpos: récessus postérieur; so: organe sous-commissural; to: tractus optique; vd: ventricule diencéphalique.

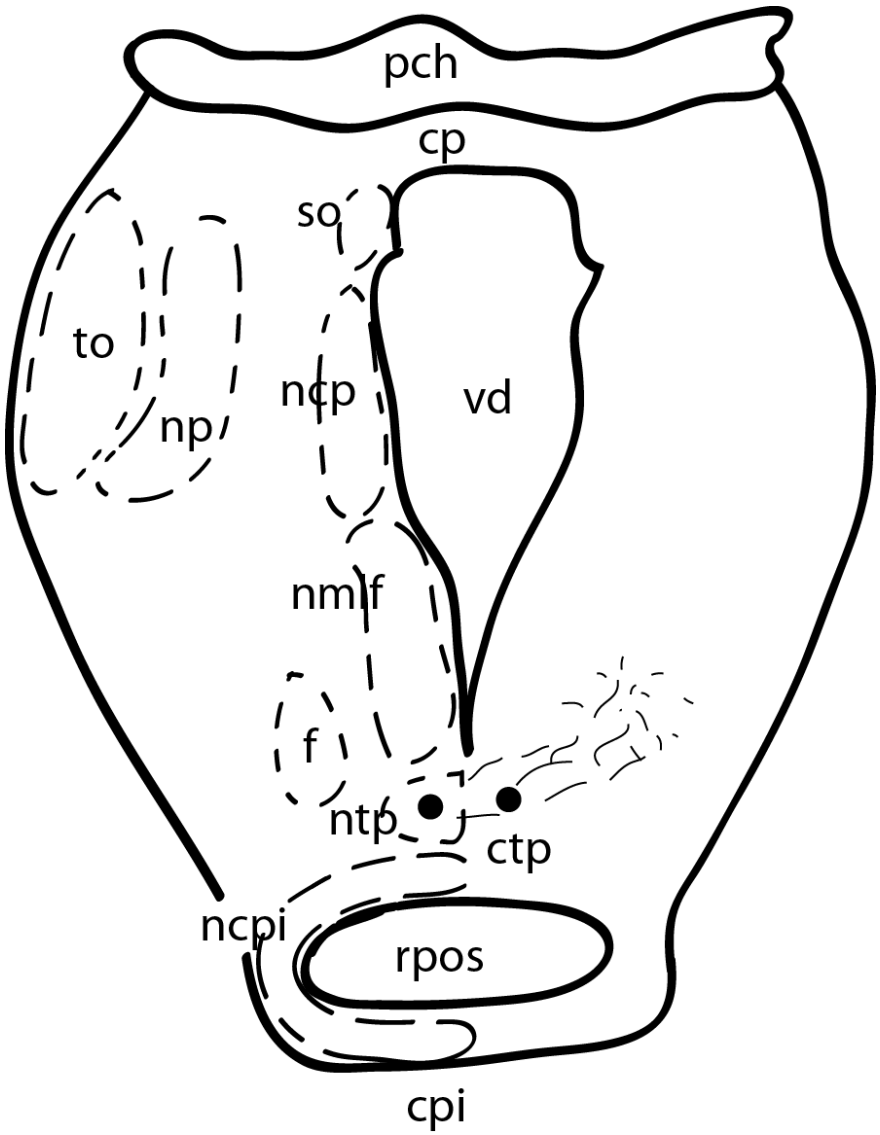

Figure 10

(Cf légende page suivante)

Figure 10

Coupe transversale du cerveau de lamproie, *Lampetra fluviatilis,* au niveau du tubercule postérieur présentant les cellules qui projettent au striatum. Cette figure est tirée et adaptée de Pombal *et al.,* (1997b). Les corps cellulaires marqués de manière rétrograde à partir du Str sont présentés par des ronds alors que les fibres sont présentées par lignes pointillées. Cp: commissure postérieure; cpi: commissure post-infundibulaire; cpt: commissure post-tectalis; f: faisceau rétrofléchi; mlf: faisceau longitudinal médian; ncp: noyau de la commissure postérieur; ncpi: noyau de la commissure post-infundibulaire; np: noyau pré-tectalis; ntp: noyau du tubercule postérieur; pch: plexus choroïdien; rpos: récessus postérieur; so: organe sous-commissural; to: tractus optique; vd: ventricule diencéphalique.

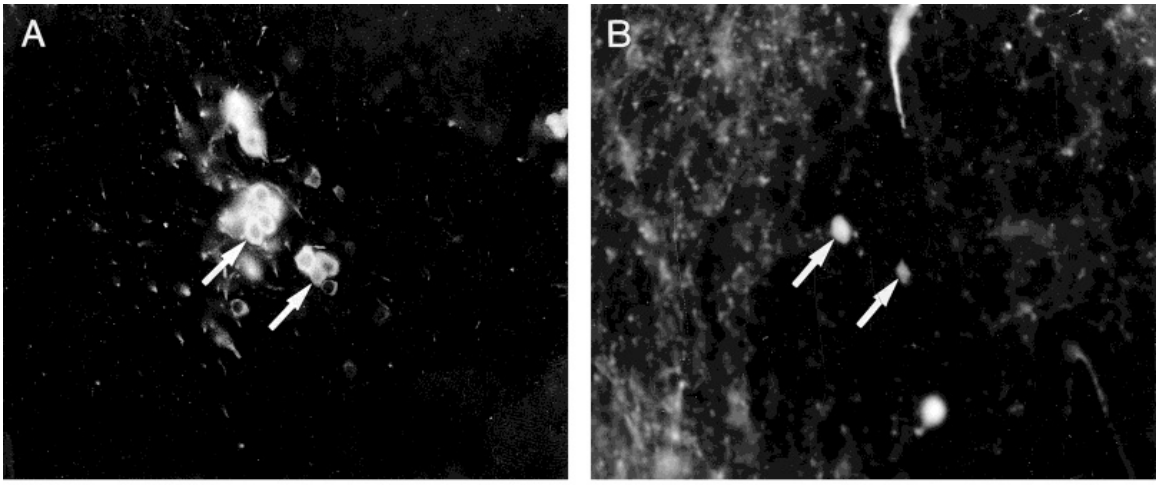

Figure 11

Photo d'une coupe transversale du cerveau de lamproie, *Lampetra fluviatilis,* au niveau du tubercule postérieur présentant les cellules DA+ qui projettent au striatum. Cette photo est tirée de Pombal *et al.,* (1997b). La photo A montre les corps cellulaires TH+ au niveau du PT. La photo B montre les corps cellulaires au niveau du PT marqués de manière rétrograde à partir d'une injection dans le Str. Les corps cellulaires TH+ au niveau du PT marqués de manière rétrograde à partir d'une injection dans le Str sont identifiés par des flèches. rpos: récessus postérieur. Échelle: 100 µm.

Des corps cellulaires glutamatergiques et GABAergiques au niveau du PT ont également été observés (Villar-Cervino *et al*., 2011).

La région mésodiencéphalique chez l'espèce à l'étude ici, *Notophthalmus viridescens,* n'a pas été décrite dans la littérature. Par contre, elle l'a été chez d'autres espèces de triton et salamandre assez proches, comme *Triturus alpestris* et *Pleurodeles Waltl*.

En effet, chez *Triturus alpestris*, une immunohistochimie de la TH a été faite par Corio et ses collaborateurs (1992). Dans la partie antérieure et médiane du diencéphale, des corps cellulaires TH+ sont situés au niveau du noyau suprachiasmatique, de l'*organum vasculosum laminae terminalis* et de l'organe du récessus préoptique. Les corps cellulaires TH+ dans ces trois régions sont en contact avec le liquide céphalo-rachidien. D'autres corps cellulaires TH+ qui ne sont pas en contact avec le liquide céphalo-rachidien, sont présents dans le noyau préoptique postérieur et dans le thalamus ventral. Au niveau du diencéphale postérieur, une grande population de neurones sérotoninergiques (5-HT) et DA a été observée au niveau de l'organe périventriculaire et au niveau du noyau infundibulaire dorsal. De plus, certains neurones TH+, DA et 5-HT ont été observés au niveau du noyau de l'hypothalamus ventral et dorsal.

Chez une espèce de salamandre, *Pleurodeles waltl,* Gonzalez & Smeets (1991) ont observé des corps cellulaires TH+ au niveau de la région mésodiencéphalique et qui étaient tous DA+. Ils ont aussi décrit des neurones DA+ qui n'étaient pas TH+

(identifiés par une flèche rouge sur la Figure 12). À noter que l'anatomie de la salamandre se rapproche grandement de celle du triton.

La Figure 12 montre bien la différence de marquage entre les cellules marquées par l'immunofluorescence DA ou TH. En effet, les cellules DA présentes dans l'organe périventriculaire (noté NPv sur la Figure 12) et qui sont en contact avec le liquide céphalo-rachidien, sont beaucoup plus nombreuses que les cellules TH+ présentes à cet endroit. Ceci est assez surprenant, puisque la TH est une enzyme nécessaire à la synthèse de la DA. Une des hypothèses proposées est que la DA ne serait pas synthétisée dans ces neurones, mais serait plutôt capturée à nouveau activement du liquide céphalo-rachidien (Smeets & Steinbusch, 1990). De plus, une autre différence est le nombre de cellules TH+ beaucoup plus nombreux au niveau des neurones plus latéraux, comparativement aux cellules DA+.

Marín et ses collaborateurs (1997) ont montré que des corps cellulaires DA+ de la région mésodiencéphalique projettent vers le Str et le NAcc chez la salamandre, *Pleurodeles waltl*. Les Figures 13 et 14 permettent de bien différencier les deux groupes de cellules DA+ situés au niveau du PT comme mentionné précédemment, en contact ou non avec le liquide céphalo-rachidien. La figure 13 permet de montrer ces groupes de cellules DA+ marqués de manière rétrograde à partir du Str, alors que la figure 14 permet de montrer ces groupes de cellules DA+ marqués de manière rétrograde à partir du NAcc.

Selon Marín et ses collaborateurs (1997) le nombre de cellules DA+ de la région mésodiencéphalique qui projette au NAcc serait plus important que le nombre de cellules qui projettent au Str.

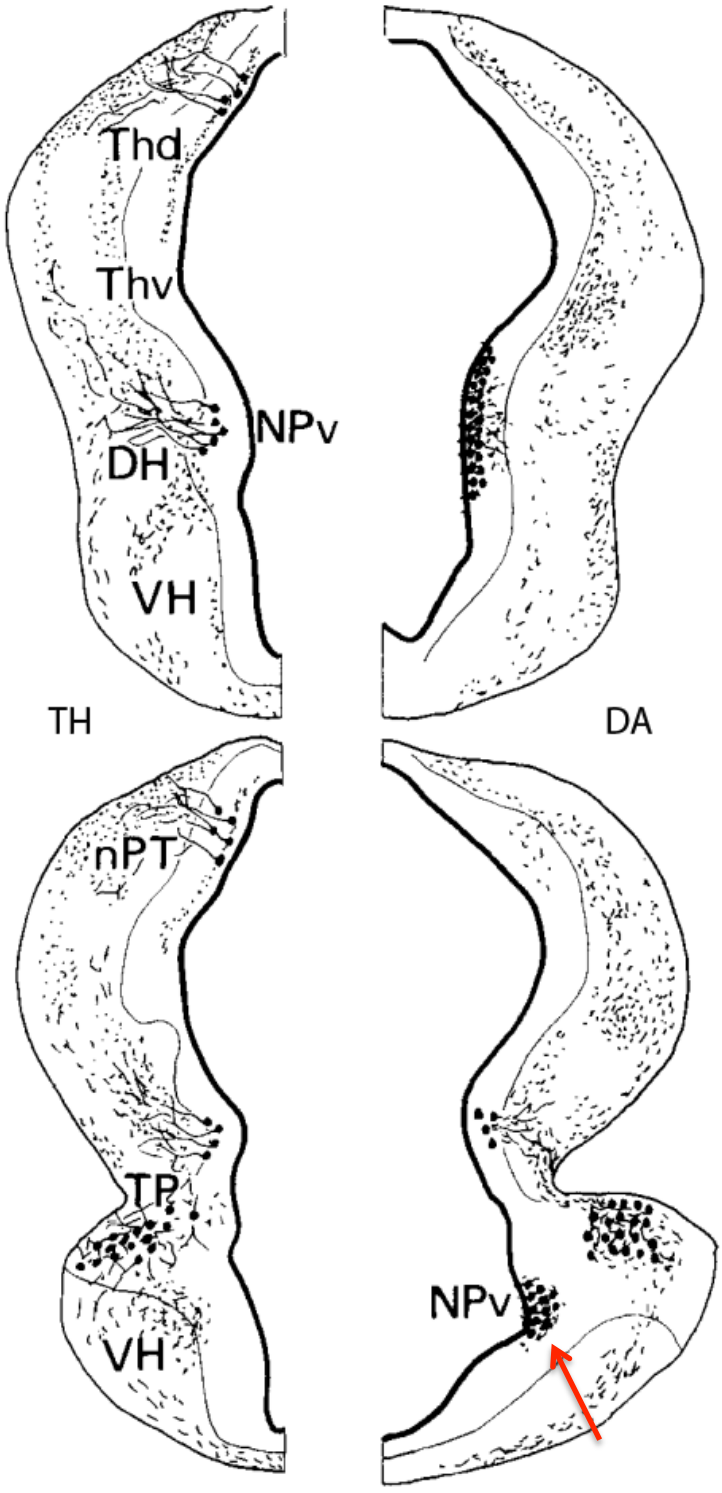

Figure 12

(Cf légende page suivante)

Figure 12

Hémi-sections de coupes transversales de salamandre, *Pleurodeles waltl,* présentant une immunohistochimie de la TH ou de la DA de la région mésodiencéphalique. Cette figure est tirée de Gonzalez & Smeets (1991). L'hémi-section des coupes à gauche présente une immunohistochimie de la TH, tandis que l'hémi-section des coupes à droite présente celle de la DA. Les corps cellulaires sont représentés par des points et les fibres par des traits. DH: hypothalamus dorsal; nPT: noyau pré-tectale; NPv : noyau de l'organe périventriculaire; Thd: thalamus dorsal; Thv: thalamus ventral; TP: tubercule postérieur; VH: hypothalamus ventral

Par immunohistochimie de la DA, Marín et ses collaborateurs (1997) ont montré deux subdivisions des cellules DA+ au niveau du PT; l'une ventrolatérale et l'autre dorsomédiane. Les cellules DA du groupe dorsomédian sont grosses, alors que celles du groupe ventrolatéral sont petites avec de longs prolongements dorsolatéraux. Les cellules DA+ du groupe dorsomédian du PT sont en continuité avec celles du tegmentum mésencéphalique. Les fibres DA+ qui projettent à partir du tegmentum mésencéphalique constituent une entrée catécholaminergique importante au télencéphale basal (où sont situé les GB) des amniotes.

Pour la présente étude, afin de simplifier l'interprétation des résultats, la région du tegmentum mésencéphalique présentant les neurones DA+ qui projettent aux GB, était considérée comme faisant partie de la région dorsomédiane du PT. Chez les amphibiens, ce sont généralement les neurones DA+ de la région du tegmentum mésencéphalique et ceux de la partie ventrolatérale du PT qui projettent aux GB qui sont observés et non ceux de la partie dorsomédiane du PT (González *et al.*, 1994) contrairement aux observations faites chez la lamproie. Considérer le tegmentum mésencéphalique et la partie dorsomédiane du PT comme un tout, n'est donc pas un problème, surtout qu'il est possible de les distinguer éventuellement étant donné que la région du tegmentum mésencéphalique est plus caudale que la région dorsomédiane du PT. Ces deux Figures (13-14) permettent de mettre en évidence les cellules afférentes du Str au niveau de la région mésodiencéphalique. En effet, des corps cellulaires DA+ ont été observés majoritairement du côté ipsilatéral de la partie dorsomédiane du PT et au niveau du tegmentum

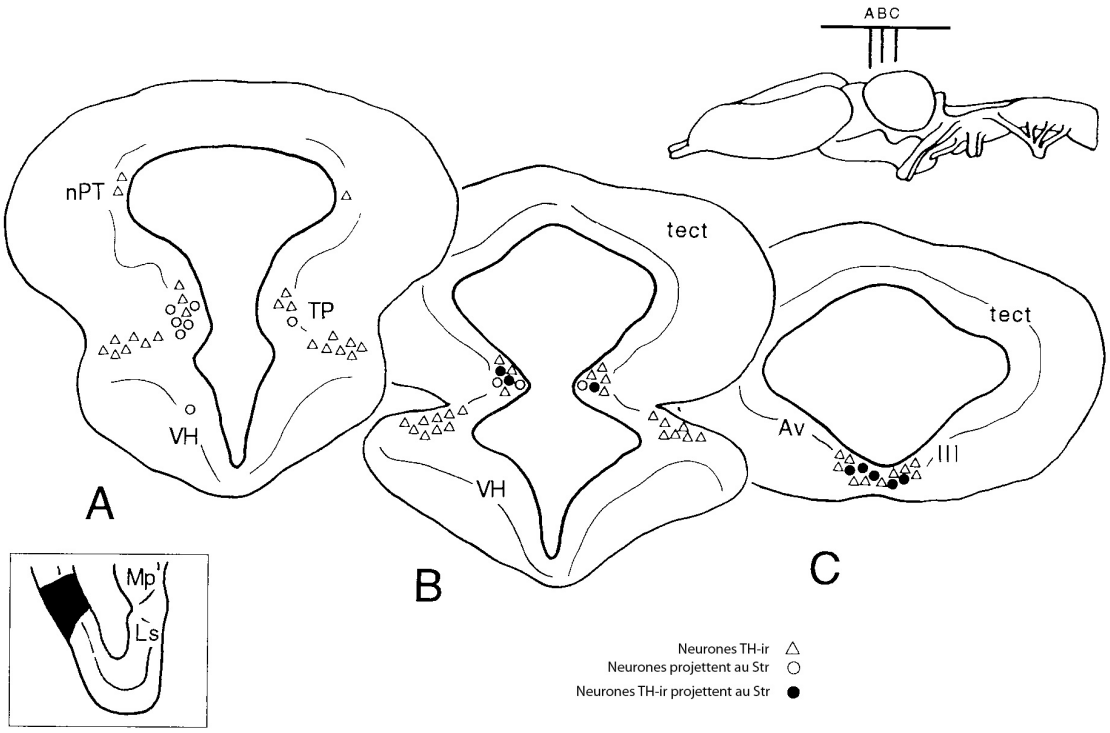

Figure 13

Schéma de coupes transverses de cerveau de salamandre, *Pleurodeles waltl,* à la suite d'une injection de traceur dans le striatum et une immunohistochimie de la TH. Ce schéma est tiré et adapté de Marín et ses collaborateurs (1997). A, B et C représentent des coupes transverses de la région mésodiencéphalique et le site d'injection est illustré dans l'encadré. Les triangles indiquent les corps cellulaires TH. Les ronds blancs indiquent les cellules qui projettent au Str et les ronds noirs indiquent les cellules qui projettent au Str TH+. Av: noyau du tegmentum antéroventral ; nPT: noyau pré-tectalis ; tect: tectum mésencéphalique ; TP: tubercule postérieur; VH: hypothalamus ventral.

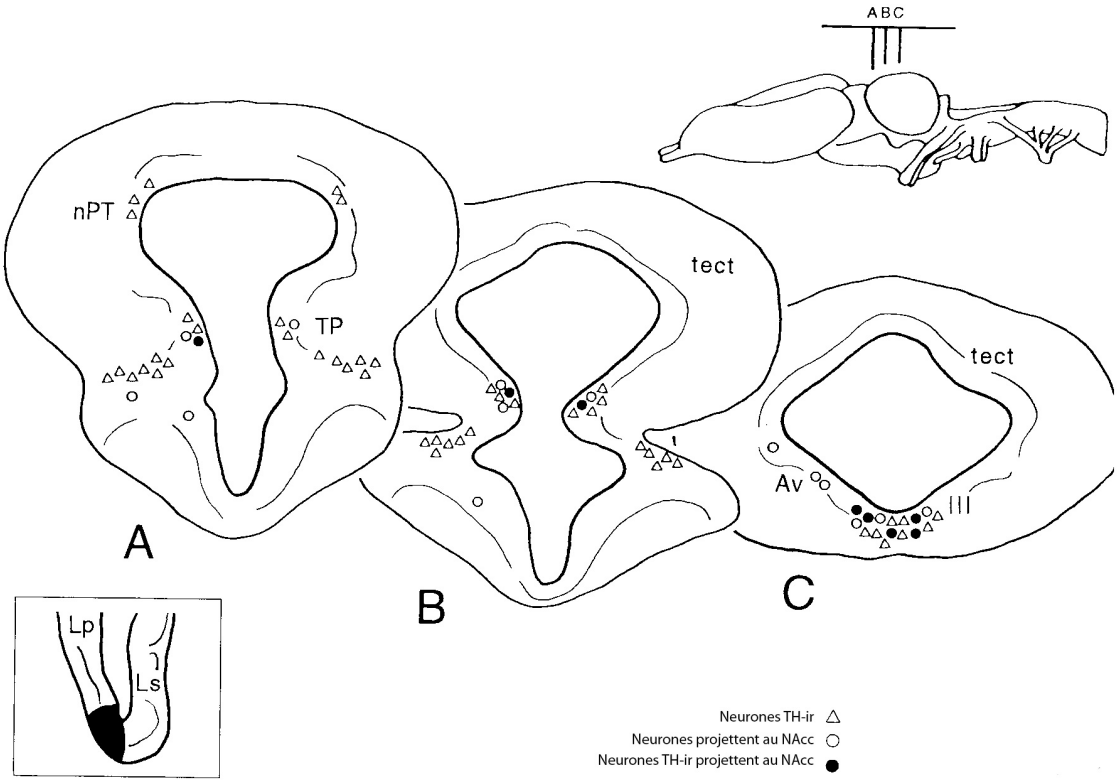

Figure 14

Schéma de coupes transverses de cerveau de salamandre, *Pleurodeles waltl,* suivant une injection de traceur dans le noyau accumbens et une immunohistochimie de la TH. Ce schéma est tiré et adapté de Marín et ses collaborateurs (1997). A, B et C représentent des coupes transverses de la région mésodiencéphalique. Le site d'injection est illustré dans l'encadré. Les triangles indiquent les corps cellulaires TH. Les ronds blancs indiquent les cellules qui projettent au NAcc et les ronds noirs indiquent les cellules qui projettent au NAcc TH+. Av: noyau du tegmentum antéroventral ; nPT: noyau pré-tectalis ; tect: tectum mésencéphalique ; TP: tubercule postérieur; VH: hypothalamus ventral.

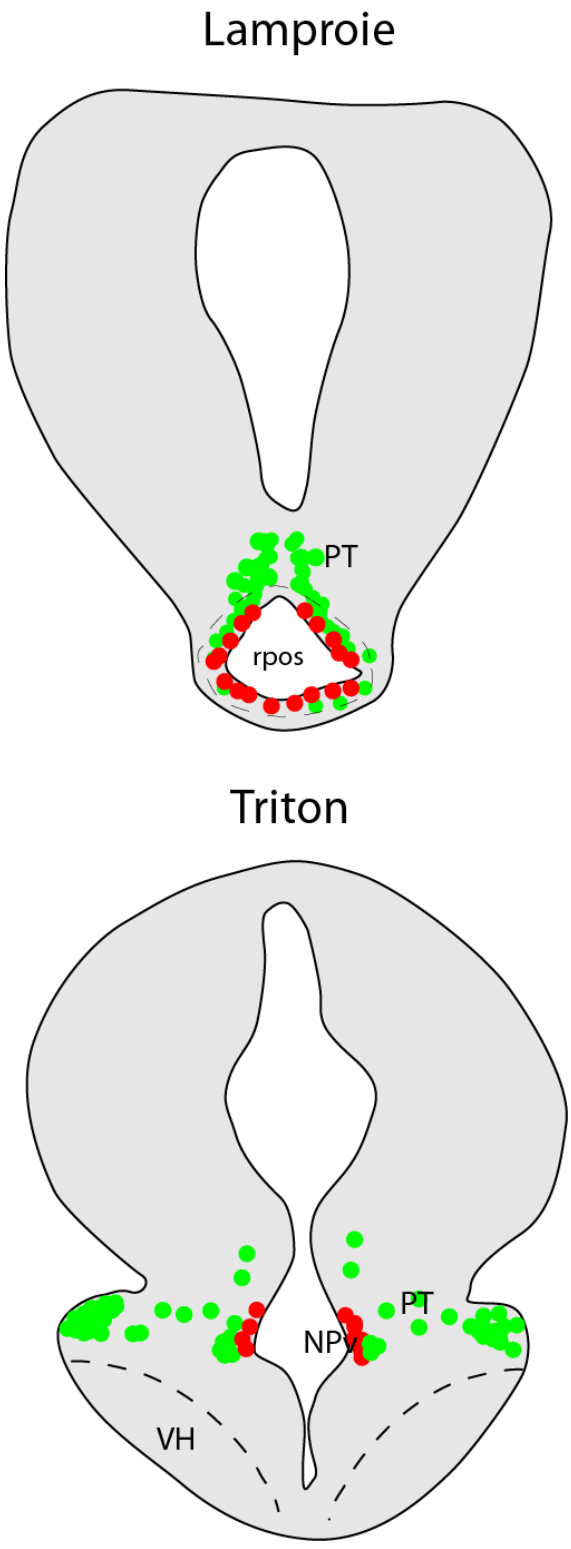

Figure 15

(Cf légende page suivante)

Figure 15

Schéma de coupes transverses de lamproie, *Petromyzon marinus,* et de triton, *Notophthalmus viridescens,* au niveau de la région mésodiencéphalique montrant des neurones immunoréactifs à la DA. Chez la lamproie, deux groupes de neurones DA+ sont observés: en contact avec le liquide céphalo-rachidien (points rouges) et sans contact avec le liquide céphalo-rachidien (points verts). Les cellules DA+ en contact avec le fluide cérébrospinal sont situées autour du récessus postérieur (rpos) et ne projettent pas aux GB (Str). Chez le triton, deux groupes similaires de neurones DA+ sont également présents. Le groupe de cellules DA+ en contact avec le liquide céphalo-rachidien est situé dans le noyau périventriculaire (NPv). Chez la lamproie, ce groupe de cellules montre généralement un faible marquage de la TH, contrairement à la DA.

mésencéphalique. Les cellules DA+ qui projettent au NAcc ont été observées dans ces mêmes régions.

La figure 15 illustre les différents groupes de neurones DA+ présents au niveau de la région mésodiencéphalique chez la lamproie et chez le triton.

Cervelet

Le cervelet permet d'apporter une précision des patrons locomoteurs en ajustant le séquençage temporel et l'intensité des signaux descendants. Une étude des lésions au niveau du cervelet a montré une anormalité marquée des mouvements locomoteurs dans la rapidité et la portée des mouvements (Lalonde & Strazielle, 2007). Le cervelet est impliqué dans la régulation des mouvements de marche et de la nage aussi (Burguière *et al.,* 2010). Il reçoit des informations des membres (entrées proprioceptives) sollicités dans le mouvement ainsi que du GCP (Boisacq-Schepens, 1998; Stecina *et al*., 2013). Le cervelet comparerait ainsi le mouvement actuel des membres avec le mouvement désiré (informations du GCP), calculerait les signaux qui doivent être corrigés et les enverrait ensuite vers différents systèmes sous-corticaux dont: plusieurs *loci* du tronc cérébral (via la formation réticulée médiane; structures clées dans l'entrainement tonique du réseau locomoteur spinal) et vers les noyaux vestibulaires et le noyau rouge (impliqués dans la modulation phasique des activités des muscles fléchisseurs et extenseurs). Le cervelet permettrait donc d'ajuster le patron locomoteur lorsque le mouvement effectué n'est pas le même que le mouvement commandé (Boisacq-Schepens, 1998).

Asanome et ses collaborateurs (1998) ont montré que la stimulation d'une région restreinte, au niveau de la ligne médiane de la matière blanche du cervelet génère une augmentation du tonus musculaire posturale sur une surface stationnaire et contrôle d'une certaine manière la locomotion sur un tapis roulant. En effet, la stimulation électrique de cette région du cervelet augmentait la tonicité musculaire au niveau des membres postérieurs et inférieurs. En 1999, Mori et ses collaborateurs ont précisé les limites physiologiques exactes de cette région par des stimulations dorsoventrales répétées à différents endroits et ont défini cette région comme étant la région locomotrice du cervelet.

Cortex moteur

Une des parties du prosencéphale jouant un rôle très important dans le contrôle de la locomotion est le cortex moteur. En effet, en 1944, Liddell et Phillips ont montré qu'une lésion du faisceau pyramidal chez le chat mène à l'incapacité de marcher au-delà des obstacles difficiles à franchir. Le cortex moteur est impliqué plus spécifiquement dans la précision des mouvements de locomotion selon un guidage visuel. Effectivement, des études ont démontré que l'inactivation du cortex moteur (Beloozerova & Sirota, 1988; Drew et al., 1996) mène à un déficit dans les modifications de la démarche qui sont guidées visuellement. Drew et ses collaborateurs (2002) ont observé la même chose après une lésion de la voie corticospinale. Plusieurs études d'enregistrements unitaires de neurones du faisceau pyramidal (Beloozerova & Sirota, 1988; Drew, 1988; 1993a;1993b;Amos *et al.* 1990; Marple-Horvat *et al.* 1993; Widajewicz *et al.* 1994; Drew *et al.* 1996, 2002)

ont appuyés ces résultats en montrant une augmentation dans la fréquence de décharge et la phase d'activité des neurones pyramidaux dans les situations où l'information visuelle était utilisée pour modifier la démarche motrice dans un environnement complexe. De plus, les changements dans l'activité du cortex moteur sont observés juste avant et pendant le changement de la démarche, suggérant ainsi que le cortex moteur contribue à l'exécution des modifications de la démarche plutôt qu'à sa planification (Drew *et al.,* 2008). Tout comme d'autres structures centrales, il permet de modifier la démarche rythmique déjà en cours. Ces modifications se font en douceur, de manière très précise, et sont incorporées dans le cycle de la démarche afin d'éviter certains obstacles sur le chemin (Drew et *al.*, 2008).

Le cortex moteur permet d'ajuster la démarche compte tenu de l'information visuelle. Il reçoit une entrée du cortex visuel et envoie directement un signal au système locomoteur spinal afin de modifier la démarche (Drew *et al.,* 2008). En plus de ces projections, il est lié à la majorité des régions impliquées dans la locomotion. Il est en boucle perpétuelle avec les GB et le thalamus. Les cortex moteur et prémoteur projettent aux GB qui eux projettent au thalamus, qui lui projette au cortex. Le cortex moteur envoie également des projections à la RLM et à la formation réticulée (Matsuyama *et al.,* 2004). Chez les humains, il a été proposé que le cortex moteur jouerait un rôle encore plus important que chez les autres quadrupèdes (Capaday, 2002; Nielsen, 2002; 2003).

Voie nigro-striée

La voie nigro-striée joue un rôle important dans le contrôle locomoteur. En effet, elle comprend une projection de la SNc vers le Str des GB (Figure 16). De manière plus détaillée, il s'agit des projections DA+ de la SNc vers les GB, qui ensuite projettent vers différents centres locomoteurs décrits précédemment, permettant ainsi la locomotion. Les projections DA+ de la SNc activent les D1 en lien avec la voie directe et les D2 en lien avec la voie indirecte. Il est important de se rappeler que la voie directe permet la locomotion, alors que la voie indirecte l'inhibe (Kravitz *et al.,* 2010). Par contre, l'activation des D2 diminue l'excitabilité des neurones de la voie indirecte, et donc permet ainsi la locomotion. À la suite de l'intégration de l'information de ces deux voies, les GB projettent vers la RLM et la RLD. La RLM et la RLD projettent ensuite vers les cellules RS qui contrôlent le GCP de la locomotion.

La dégénérescence des neurones DA+ de la voie nigro-striée engendre des symptômes hypolocomoteurs associés à la maladie de Parkinson (Obeso *et al.,* 2008).

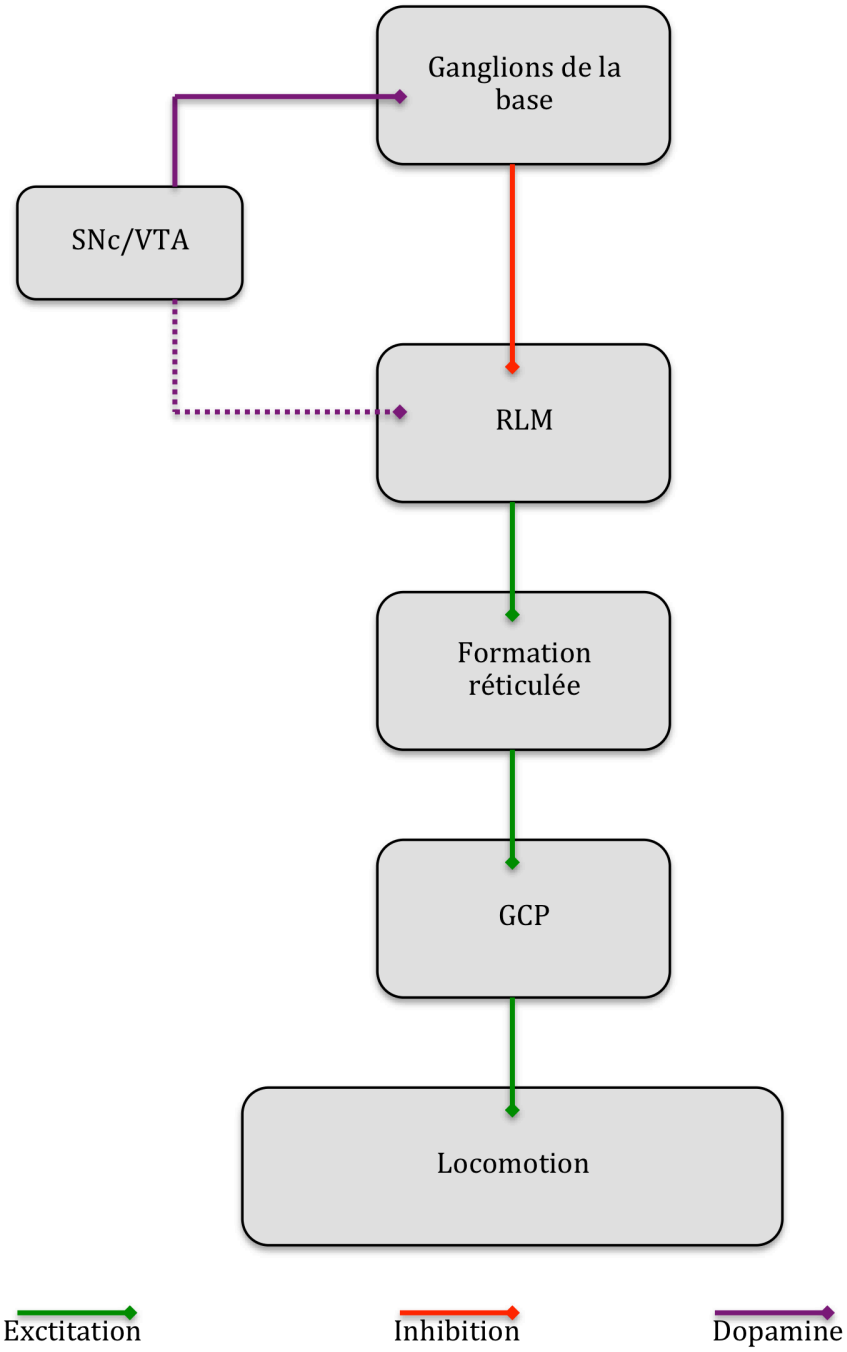

Figure 16

(Cf légende page suivante)

Figure 16

Schéma illustrant les différentes structures de la voie ascendante et de la voie descendante qui serait, elle aussi, hypothétiquement impliquée dans la locomotion. Cette figure est tirée et adaptée de Ryczko et ses collaborateurs (2013b). La voie ascendante est constituée des projections DA+ de la SNc et la VTA vers les GB, permettant ainsi d'activer la locomotion via les D1 et D2 du Str. Les GB envoient des projections inhibitrices sur la RLM. La RLM envoie ensuite des projections excitatrices vers la formation réticulée. La formation réticulée envoie des projections excitatrices vers le GCP, qui, lui, permet la locomotion. La voie descendante serait constituée de projections DA+ qui partiraient directement de la SNc et de la VTA vers la RLM sans passer par les GB.

Objectifs

Chez les mammifères, les neurones DA+ mésodiencéphaliques situés dans la SNc et la VTA modulent la locomotion par leurs projections ascendantes vers les GB, qui en retour projettent vers la RLM. Or, il a récemment été découvert chez le singe, que le PPN de la RLM, reçoit des terminaisons DA+ (Rolland *et al.,* 2009). Cependant, l'origine et le rôle de ces projections dans le contrôle locomoteur restent peu explorés. Il a été démontré récemment au sein du laboratoire Dubuc selon des données anatomiques que les neurones DA+ du PT chez la lamproie (homologue à A9 et A10 des mammifères) projettent non seulement vers le Str des GB, mais aussi directement vers la RLM (Ryczko *et al.,* 2013b), comme illustré à la figure 16.

Ryczko et ses collaborateurs (2013b) ont également démontré par des données électrophysiologiques que cette voie DA+ descendante participe au contrôle locomoteur chez la lamproie. Sur une préparation de tronc cérébral isolé (coupé des afférences des GB), ils ont observé que la stimulation électrique du PT excite les cellules de la RLM qui sont enregistrées en configuration *patch-clamp*, excitation qui est partiellement coupée par des bloqueurs des D1. De plus, ils ont observé, à la suite de cette même stimulation, une activité au niveau des cellules RS, cellules de commandes essentielles pour l'initiation de la locomotion. Ensuite, des enregistrements électrophysiologiques couplés à de la voltamétrie ont permis d'observer qu'à la suite d'une stimulation électrique du PT, il y a une relâche de DA au niveau de la RLM, concurrente avec une activité au niveau des cellules RS. Par la suite, sur une préparation semi-intacte de lamproie (le cerveau et la moelle très rostrale sont disséqués et exposés, alors qu'une grande partie du corps de l'animal

lui permettant de nager est conservée intacte; à noter, toujours, que les GBne sont pas présents), après à la stimulation du PT, les auteurs ont observé une activité des cellules RS et un mouvement de locomotion. Enfin, à la suite des injections d'antagonistes D1 ou de DA au niveau de la RLM, ils ont observé que la sortie locomotrice engendrée par la stimulation du PT était soit diminuée (antagoniste D1) ou augmentée (DA).

La présente étude vise à déterminer si cette voie est également présente chez d'autres vertébrés. Le triton sera utilisé comme second modèle animal, car il est phylogénétiquement proche de la lamproie et qu'il est à la jonction entre les milieux terrestre et aquatique. En effet, il utilise deux modes de locomotion différents: la nage et la marche. Les deux modes de locomotion se différencient quant à leur modèle d'activation de la musculature épiaxiale (modèle de coordination intersegmental) et des muscles des membres (Delvolvé *et al.,* 1997; Cabelguen *et al.,* 2003).

La lamproie est une des espèces de vertébrés les plus anciennes sur Terre. Elle existe depuis 560 millions d'années (Kumar & Hedges, 1998). Cet animal a un cycle de vie complexe qui inclut des périodes embryonnaires, larvaire et métamorphique qui se produisent dans la rivière et une période adulte qui se produit dans les lacs ou dans la mer où elle y vit comme parasite, se nourrissant sur des poissons. Le système nerveux central de la lamproie conserve certains traits anciens qui rendent cette espèce très intéressante pour l'analyse comparative des systèmes neurochimiques. On devrait s'attendre à des mécanismes communs dans l'organisation du système locomoteur de la lamproie et des mammifères, puisqu'elle

est présente depuis le début de l'évolution des vertébrés. En plus de posséder certaines similarités avec le système nerveux des mammifères, le système nerveux de la lamproie est beaucoup plus simple que certaines espèces animales plus évoluées. Il est, de ce fait, plus facile d'analyser les résultats obtenus chez la lamproie et de les comparer par la suite avec des espèces plus évoluées.

Le but de ce projet est de comparer l'organisation des projections ascendantes et descendantes des neurones DA+ mésodiencéphaliques chez la lamproie et le triton. Pour ce faire, des injections de traceurs rétrogrades dans la RLM et dans le Str seront couplées à des immunohistochimie de l'enzyme de synthèse de la DA, la TH. Ces projections ascendantes et descendantes seront ensuite analysées et quantifiées.

Les résultats de cette recherche permettront d'identifier s'il y a eu une évolution de l'organisation anatomique de ces voies de projections ascendantes et descendantes des neurones DA+ mésodiencéphaliques chez le triton comparativement à la lamproie.

Méthodologie

Espèces à l'étude

Lamproies

Des lamproies marines (*Petromyzon marinus*, n=30) adultes mâles ou femelles longues de 40 à 55 centimètres (cm) et pesant de 165 à 310 grammes (g) ont été utilisées au cours de cette étude. Ces animaux ont été recueillis à la rivière *Great Chazy*, un affluent du lac Champlain (NY, USA) ou ont été donnés par le *US Fish and Wildlife Service of Vermont* (VT, USA) Elles ont été par la suite conservées à l'animalerie du pavillon Paul-G. Desmarais de l'Université de Montréal dans des aquariums d'eau douce maintenue à 4^{o}C.

Tritons

Des tritons verts (*Notophthalmus viridescens,* n=44) au stade juvénile terrestre (« red eft » en anglais) mâles ou femelles longs de 8 à 11 cm et pesant 3 à 6 g ont été utilisés au cours de cette étude. Ces animaux provenaient de *Connecticut Valley Biological* (Southampton, Massachusetts). Ils ont été par la suite conservés à l'animalerie du pavillon Paul-G. Desmarais de l'Université de Montréal dans des vivariums à 22^{o}C.

L'utilisation des lamproies et des tritons était conforme au CCPA (Conseil Canadien de la Protection des Animaux) et a été approuvée par le CDEA (Comité de déontologie de l'expérimentation animale). Ce protocole a été conçu pour minimiser

la souffrance des animaux ainsi que le nombre d'animaux utilisés pour cette recherche.

Dissection

Les animaux ont été anesthésiés dans de l'éthyl 3-aminobenzoate méthanesulfonate (MS-222; 100 mg/L d'eau aquarium, Aldrich, Oakville, ON, Canada) jusqu'à l'abolition complète des réflexes cutanés, signe d'une anesthésie profonde, dans le but de produire une préparation de cerveau complet isolé *in vitro*. Tout au long de la dissection, ils ont été conservés dans une solution de Ringer (NaCl 130 millimolaire (mM), KCl 2,1 mM, $CaCl_2$ 2,6 mM, $MgCl_2$ 1,8 mM, Hepes 4 mM, Dextrose 4 mM et NaHCO3 1mM) froide (lamproies; 4^{o}C) ou température pièce (tritons; 15^{o}C), saturée d'oxygène et calibrée à un pH de 7,4.

Les lamproies et les tritons ont été fixés sur le dos à l'aide d'aiguilles de seringue dans un récipient à dissection dont le fond est recouvert d'un polymère de silicone (Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning Corporation, Midland, USA). Les animaux ont été complètement disséqués ne laissant que le crâne et la colonne vertébrale rostrale (2-3 segments spinaux). La préparation était ensuite retournée sur sa partie ventrale pour exposer le cerveau en enlevant la partie dorsale des vertèbres et du crâne. Une fois le cerveau exposé, le plexus choroïdien et les méninges devaient être retirés du ventricule mésencéphalique et du 4^{ième} ventricule.

Traçage axonal

Deux sites d'injection différents ont été visés dans ce travail, le Str et la RLM, en combinaison ou en injection simple. Lors d'une première série d'expériences, une injection simple au niveau de la RLM a été faite (Tritons n= 4). Ce type d'injections avait déjà été fait chez la lamproie avant mon arrivée dans le laboratoire, il n'a donc pas été nécessaire de les refaire. Toutefois, les résultats de telles injections ont quand même été vérifiés chez la lamproie au cours des expériences où la RLM et le striatum étaient tous les deux injectés sur le même animal (voir la troisième série d'expériences ci-dessous). Lors d'une deuxième série d'expériences, une injection simple au niveau du Str a été faite (Lamproies n= 3; Tritons n= 6). Lors d'une troisième série d'expériences, deux injections différentes ont été faites simultanément et ipsilatéralement, l'une dans la RLM et l'autre dans le Str (Lamproies n= 22; Tritons n= 30).

Avant de procéder aux injections, des lésions ont été faites au niveau des sites d'injection afin de couper les axones. Les axones devaient être coupés pour permettre au traceur de les pénétrer et de voyager passivement de manière rétrograde jusqu'au corps cellulaires. Ce type de traçage *in vitro* permettait le transport rapide du traceur qui se fait alors en quelques heures. Ces lésions ont été faites à l'aide d'un capillaire de verre (1,0 millimètre (mm) x 0,58 mm, A-M Systems Inc, Carlsborg) étiré à l'aide d'un tireur de micropipettes (Flaming/Brown Model P-87, Suffer Instrument Co., USA) ou par un micro bistouri (Sichel Model, No. 10073-14. Fine Science Tools Inc, Canada).

Dans les secondes qui suivaient la lésion des axones, des cristaux de biocytine (B4261-100MG, Sigma-Aldrich, USA) ou de dextran amine couplés à du Texas Red (3000 MW, Lysine fixable, Life Technologies, Burlington, ON, Canada) ont été placés au site de la lésion (site d'injection) avec l'embout d'une micropipette. Avant de rincer le site d'injection avec la solution de Ringer, quelques minutes d'attente étaient requises pour permettre aux cristaux du traceur de se dissoudre complètement et de pénétrer les axones coupés. Les animaux qui recevaient deux injections simultanées de traceurs différents devaient recevoir une attention particulière pour ne pas que le deuxième traceur injecté contamine le site de la première injection. Dans ces cas, le deuxième traceur était toujours la dextran amine Texas Red (TRDA) car il était bien visible lorsqu'il passe en solution dans le Ringer. Une pipette pasteur était alors utilisée pour créer un léger courant qui poussait la TRDA en direction opposée au site de la première injection.

Il est aussi important de mentionner, que les traceurs utilisés ont été inter-changés selon le site d'injection afin de s'assurer que le marquage résultant dans les deux cas était semblable et que les deux traceurs marquaient tout aussi bien les corps cellulaires.

Une fois les injections terminées, le cerveau était conservé dans un bain réfrigéré de solution de Ringer oxygénée en continu pendant environ 12 heures, afin de permettre aux traceurs de bien diffuser passivement et de manière rétrograde dans les axones pour marquer leurs corps cellulaires.

Fixation, révélation de la biocytine et procédure d'immunofluorescence

Au terme de la période allouée pour le transport axonal des traceurs, les cerveaux étaient fixés en entier par immersion dans le fixateur. La procédure de fixation est différente selon que l'on voulait faire de l'immunofluorescence pour la TH ou pour la DA. Pour la TH, le cerveau était fixé dans une solution de paraformaldéhyde 4% (4 g/100 mL de solution saline tamponnée au phosphate sodique (PBS), pH = 7,4) durant 24h à 4°C. Pour la DA, le cerveau était d'abord immergé dans un tampon cacodylate 0,1 M (cacodylate trihydrate de sodium + métabisulfite de sodium à 0,9%, pH = 6,2) durant 5 minutes sur le glace et ensuite fixé durant 55 minutes sur la glace, dans ce même tampon ajusté cette fois à un pH de 7,5 et auquel 2% de glutaraldéhyde avait été ajouté. Les cerveaux étaient ensuite transférés dans une solution cryoprotectrice à base de 20% de sucrose (tamponnée au phosphate sodique à pH 7,4 pour la TH et tamponnée au Tris 0,05M à pH 7,5 contenant 0,9% de métabisulfite de sodium pour la DA) durant 12 heures à 4°C, afin d'éliminer l'apparition de gros cristaux lors de la congélation, ceux-ci pouvant endommager les tissus à l'étude. Les cerveaux étaient ensuite congelés rapidement dans du méthyl butane et fixés sur un support pour la coupe au cryostat. Les cerveaux étaient coupés de façon transverse à une épaisseur de 25 µm. Les coupes étaient récoltées sur des lames ColorFrost Plus et laissées à sécher sur une plaque à 37°C durant 12 heures.

La biocytine, lorsqu'utilisée comme traceur, était révélée avec de la streptavidine couplée à un fluorophore (diluée 1 :200 dans du PBS, Life Technologies). La couleur du fluorophore était choisie en fonction des autres

marqueurs présents dans le tissu (autres traceurs ou immunofluorescence). La streptavidine était ensuite lavée par 3 x 10 min dans du PBS. Les tissus étaient alors prêts pour la procédure d'immunofluorescence.

Les dextran amines couplées au Texas Red étaient déjà fluorescentes en rouge et n'avaient pas besoin d'autres traitements pour être visualisées.

Ensuite, les coupes étaient traitées pour la révélation de la TH ou la DA par immunofluorescence selon le cas. Pour la TH, la révélation était faite par une incubation du tissu nerveux avec un anticorps primaire anti-TH durant 12 h à 4°C. Dans cet ouvrage, un anticorps polyclonal produit chez le lapin contre la TH (dilué 1:400, Millipore, Etobicoke, ON, Canada AB152, lot: 2287151) a été utilisé. Il a été dilué dans une solution de PBS auquel du sérum normal de chèvre (NGS: 5%) et du Triton X-100 (0,3%) ont été ajoutés. Le NGS dans cette solution était très important afin de réduire les interactions protéines-protéines de l'anticorps primaire avec le tissu nerveux, éliminant ainsi une liaison non spécifique de l'anticorps. L'anticorps primaire pouvait ensuite être révélé par un anticorps secondaire auquel est liée une molécule fluorescente. Il est important de mentionner qu'avant l'incubation du tissu nerveux avec l'anticorps secondaire, celui-là était rincé 3 x 10 min dans le PBS. Un anticorps de chèvre dirigé contre les IgG de lapin, couplé au fluorophore Alexa Fluor 488 (1:200, Invitrogen A11008, lot : 1408830), a été utilisé ici comme anticorps secondaire. Le temps d'exposition du tissu nerveux à l'anticorps secondaire était de 60 min. Pour la DA, la révélation était faite de la même manière que pour la TH, par contre les anticorps primaire et secondaire n'étaient pas les mêmes, ni la solution de dilution. En effet, l'anticorps primaire monoclonal utilisé était produit chez la souris

contre la DA (1:200, Millipore MAB 5300, lot: NG1900311). L'anticorps secondaire utilisé ici était produit chez la chèvre contre la souris et était couplé au fluorophore Alexa Fluor 488 (1:200, Invitrogen A11001, lot: 1298479). La solution de dilution est la suivante : Tris 0,05M + métabisulfite de sodium 0,9%, auquel de NGS (5%) et de Triton X-100 (0,3%) ont été ajoutés (pH = 7,5).

Des cas témoins négatifs ont également été faits afin de nous assurer de la spécificité de l'immunohistochimie anti-TH ou anti-DA. En effet, afin de vérifier que l'anticorps secondaire (fluorescent) était bien spécifique à l'anticorps primaire, des révélations immunologiques ont été faites en suivant la procédure complète normale mais en omettant de mettre l'anticorps primaire.

Après la révélation avec les anticorps secondaires, les lames ont été rincées 3 x 10 min au PBS et ensuite rapidement rincées à l'eau déionisée pour se débarrasser des sels contenus dans le PBS. Les lames étaient ensuite laissées à sécher sur une plaque chauffante à 37^{o}C durant 5 min. Elles étaient ensuite couvertes de lamelles avec du Vectashield (H-1200, Vector Laboratories Inc, Burlington, ON, Canada) qui contient un agent anti-décoloration pour la fluorescence. Lorsque c'était possible, le Vectashield contenant du DAPI était utilisé. Le DAPI se lie à l'acide désoxyribonucléique (ADN) et devient alors fluorescent dans le bleu, ce qui permettait de visualiser les noyaux de toutes les cellules du cerveau et une meilleure identification des structures neurales.

Observations microscopiques et élaboration des figures

L'utilisation de différents jeux de filtres permettait d'observer sélectivement un à un les différents traceurs fluorescents injectés et les révélations immunofluorescentes. Nous avons utilisé un microscope Eclipse 600 équipé d'une caméra numérique DXM1200 de Nikon. Afin d'observer les traceurs rouges, un jeu de filtres pour le Texas Red (Alexa Fluor 594 ou Texas Red) était utilisé. Pour les traceurs verts, un jeu de filtres pour le FITC (Alexa Fluor 488) était utilisé et pour les traceurs bleus ou le DAPI, un jeu de filtre pour DAPI (Alexa Fluor 350 ou DAPI) était utilisé.

Analyse

Afin de schématiser les coupes transverses des deux espèces animales et de placer les neurones sur ces coupes schématisées, des photos des coupes entières (une coupe sur quatre) ont d'abord été prises. Ces photos ont été importées dans le programme Illustrator (Adobe, version CS5, San Jose, CA) où leur contour a été dessiné. Par la suite, l'emplacement des neurones marqués a été indiqué à l'aide de points de couleurs appropriées. Nous avons ensuite confirmé ces points et leur emplacement en retournant au microscope à plus fort grossissement. Nous avons aussi utilisé le jeu de filtres DAPI pour nous assurer que les éléments marqués contenaient bien un noyau marqué au DAPI. Ceci était pour nous assurer, entre autres, de ne pas compter des structures fluorescentes qui ne sont pas des corps cellulaires, par exemple les énormes axones des cellules RS chez la lamproie.

Les photographies et les schémas ont été assemblés dans des figures à l'aide d'Adobe Illustrator CS5 et Adobe Photoshop CS5.

Le comptage des cellules a été fait au microscope en observant une coupe sur deux et en différenciant les côtés ipsi et contralatéral à (aux) l'injection(s). Le comptage des cellules a été fait sur une coupe sur deux, afin de diminuer la possibilité de compter deux fois la même cellule. Cette technique n'était pas la plus précise de toute, par contre nous nous sommes intéressé plus particulièrement aux proportions relatives dans cette étude (par exemple : plus de neurones projettent à A qu'à B). Les neurones TH+ qui projettent vers la RLM ont été comptés sur une coupe sur deux pour les mêmes raisons. Par contre, vu leur faible densité et leur nombre peu élevé, les neurones TH+ qui projettent au Str ont été comptés sur chaque coupe. Idem pour les neurones TH+ qui projettent à la fois à la RLM et au Str.

Pour les analyses statistiques, la moyenne a d'abord été calculée sur chaque animal: en additionnant les cellules du côté gauche et du côté droit et en divisant le nombre total obtenu en 2. Ensuite, la moyenne globale des animaux a été faite par la somme des moyennes de chaque animal divisé par le nombre d'animaux.

Résumé des injections faites chez la lamproie et le triton

Tableau 1. Nombre de lamproies, *Petromyzon marinus,* et de tritons, *Notophthalmus viridescens,* qui ont reçu une injection simple de traceur dans la région locomotrice mésencéphalique ou dans le striatum.

	Injecté dans RLM*	**Injecté dans Str****
Lamproie	0	3
Triton	4	6

** RLM : Le traceur injecté est le Texas Red dextran amine.*

***Str : Le traceur injecté est la biocytine.*

L'immunohistochimie utilisée sur ces animaux est anti-TH.

Tableau 2. Nombre de lamproies, *Petromyzon marinus,* et de tritons, *Notophthalmus viridescens,* qui ont reçu des injections simultanées dans la région locomotrice mésencéphalique et dans le striatum.

	Biocytine Str et Texas Red RLM		**Biocytine RLM et Texas Red Str**	
	DA	TH	DA	TH
Lamproie	0	17	0	0
Triton	2	17	2	0

L'immunohistochimie utilisée sur ces animaux est anti-TH ou anti-DA.

Expériences additionnelles

Pour complémenter les expériences *in vitro*, des expériences *in vivo* ont été effectuées afin de nous assurer que le marquage rétrograde *in vitro* fonctionnait de manière optimale et que les temps de transport, limités par la durée de survie de la préparation *in vitro,* n'étaient aussi pas un facteur limitant. Pour ce faire, des lamproies (n=3) ont été anesthésiées comme précédemment. Par la suite, elles ont été fixées avec leur partie ventrale vers le bas à l'aide de fines aiguilles hypodermiques (30G) insérées au bout de la ventouse buccale et dans la nageoire dorsale, de manière à minimiser les dommages aux tissus et la souffrance de l'animal au réveil. Avec un scalpel, la peau, les muscles et le crâne au-dessus du cerveau ont été soulevés pour exposer la portion antérieure du cerveau. De la biocytine a été injectée dans le Str comme décrit plus haut. Les tissus qui recouvrent le cerveau ont été rabattus à leurs places initiales et fixées avec des points de suture. Les lamproies ont été conservées vivantes 2 à 3 jours dans du Ringer oxygéné (température pièce). Ensuite, les animaux ont été anesthésiés, puis stabilisés avec des aiguilles dans un récipient de dissection dont le fond était recouvert de polymère. Sous le binoculaire, avec des ciseaux et des pinces, le cœur a été mis à découvert pour y injecter un fixateur. À l'aide d'une seringue, une perfusion cardiaque a été faite avec du paraformaldéhyde (PFA : 4% ; 40 mL/15 minutes, sur glace). Afin de nous assurer que la perfusion s'effectue correctement, nous avons surveillé la raideur de la queue et la couleur blanchâtre de la ventouse. Les cerveaux ont par la suite été retirés et conservés dans le PFA 4% durant 2 jours (post-fixation). Ils sont ensuite traités de la même manière que les cerveaux *in vitro*.

Résultats

Dans la présente étude, nous avons utilisé deux traceurs différents, la biocytine et le TRDA. Dans chaque espèce, les deux sites, la RLM et le Str, ont reçu des injections de l'un ou l'autre des deux traceurs avec des résultats en tous points comparables. Les résultats illustrés proviennent donc de l'un ou l'autre des deux traceurs indifféremment.

Groupe de neurones dopaminergiques mésodiencéphaliques chez la lamproie et le triton

Afin de nous assurer que les cellules TH+ mésodiencéphaliques correspondaient bien aux neurones DA+ à l'étude et non à d'autres catécholamines, une comparaison entre le marquage des neurones DA et TH a été faite. La comparaison entre les neurones TH+ et les neurones DA+ a déjà été publiée en parallèle à ce travail (Ryczko *et al*., 2013b; Annexe (Figure S1:D-E-F)).

La distribution des neurones DA+ et TH chez la lamproie est sensiblement la même au niveau du PT. De grosses cellules ont été observées dans la partie dorsomédiane du PT, alors que de plus petites cellules ont été observées dans la partie ventrolatérale du PT. De plus, des cellules DA+ (peu marquées par l'immunofluorescence contre la TH) ont été observées au niveau du récessus postérieur. En rappel à l'introduction, aucune des cellules DA+ présentes dans le récessus postérieur n'était marquée par les traceurs rétrogrades.

Le comptage des neurones TH+ dans le PT de la lamproie, d'un seul côté du cerveau et sur une coupe sur deux, a donné 163,4 ± 62,4 cellules TH+ (DA); il s'agit

ici de la moyenne des deux côtés de l'animal (n= 10 animaux ou 20 côtés) (Tableau 5).

Chez le triton, l'immunofluorescence contre la TH et la DA a permis d'observer un premier groupe de cellules plutôt caudal marquées autant par la TH que par la DA, au niveau du tegmentum mésencéphalique (Figure 18), qui se poursuit dans la partie dorsomédiane du PT de manière rostrale (Figure 19). Un deuxième groupe a été observé dans la partie ventrolatérale du PT (Figure 20). Par contre, un groupe de cellules DA+ qui n'était pas marqué par l'immunofluorescence contre la TH a aussi été observé (illustré par des points oranges sur la figure 17 et par des flèches sur la figure 20). Ce groupe était en position plus caudale comparativement à celui des cellules TH+ et était situé très près du ventricule. Parmi ces groupes de cellules DA+, aucune ne projetait vers le Str ou la RLM, donc pour cette étude, l'utilisation de l'immunofluorescence de la TH afin d'identifier les neurones DA+ était donc amplement suffisante.

Le comptage des cellules dans le PT du triton, d'un seul côté du cerveau (calculé une coupe sur deux), a donné 80,3 ± 23,2 cellules TH+ (n = 15 animaux ou 30 côtés) (Tableau 4 et 6).

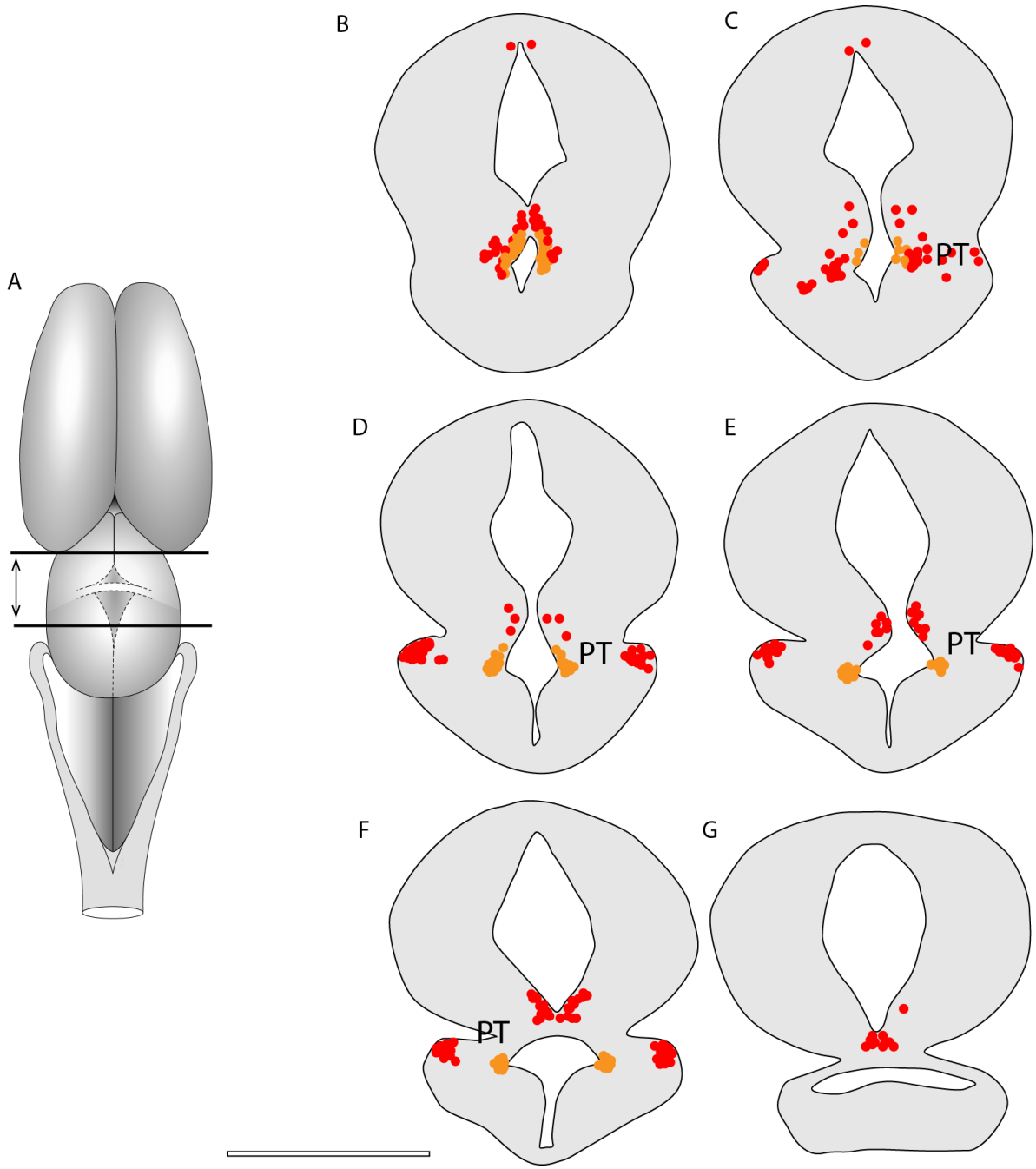

Figure 17

(Cf légende page suivante)

Figure 17

Schéma de coupes du cerveau de *Notophthalmus viridescens* montrant les groupes neuronaux du PT révélés par immunofluorescence de la DA. A) Schéma du cerveau du triton, il illustre l'endroit d'où proviennent les coupes du cerveau présentées ici. B –G) Coupes à divers niveaux de la partie du cerveau du triton illustrée en A). B) Coupe la plus rostrale. G) Coupe la plus caudale. Les cellules révélées par l'anticorps anti-DA mais ne contenant pas de TH sont représentées en orange. Les cellules révélées par l'anticorps anti-DA et contenant de la TH sont représentées en rouge. Le schéma illustre une coupe sur trois. Échelle: 1 mm

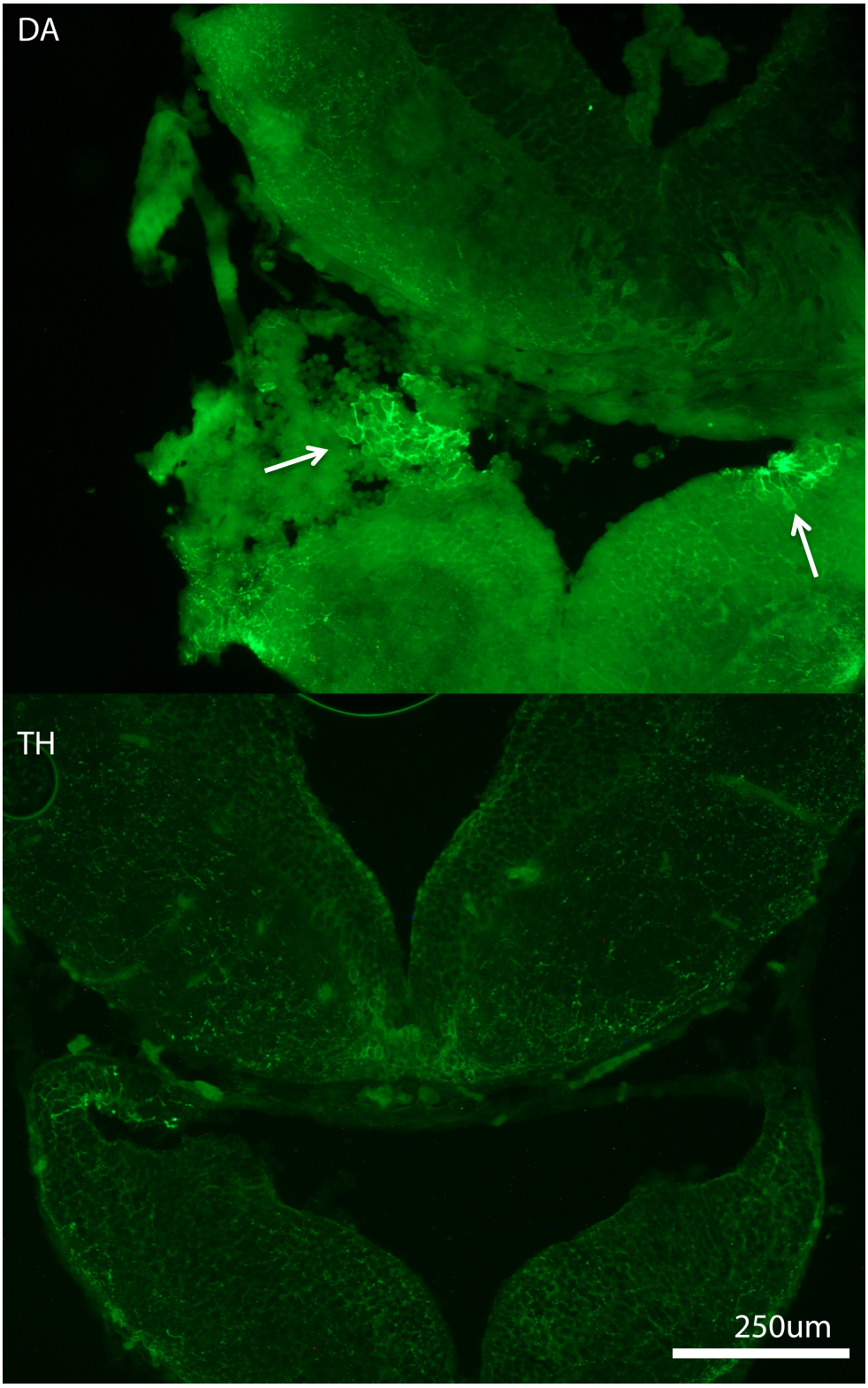

Figure 18

(Cf légende page suivante)

Figure 18

Neurones révélés par immunohistochimie de la DA ou de la TH dans la partie dorsomédiane la plus caudale du PT chez le triton, *Notophthalmus viridescens* (région considérée ici, pour simplifier l'analyse, comme faisant partie du PT, mais qui est en fait du mésencéphale rostral). L'image du haut montre les neurones DA+ de la partie dorsomédiane du PT, fortement marqués près du ventricule (identifiés par des flèches blanches). L'image du bas montre l'immunohistochimie de la TH de la partie dorsomédiane du PT, ne montrant pas de cellules fortement marquées près du ventricule. Échelle: 250µm.

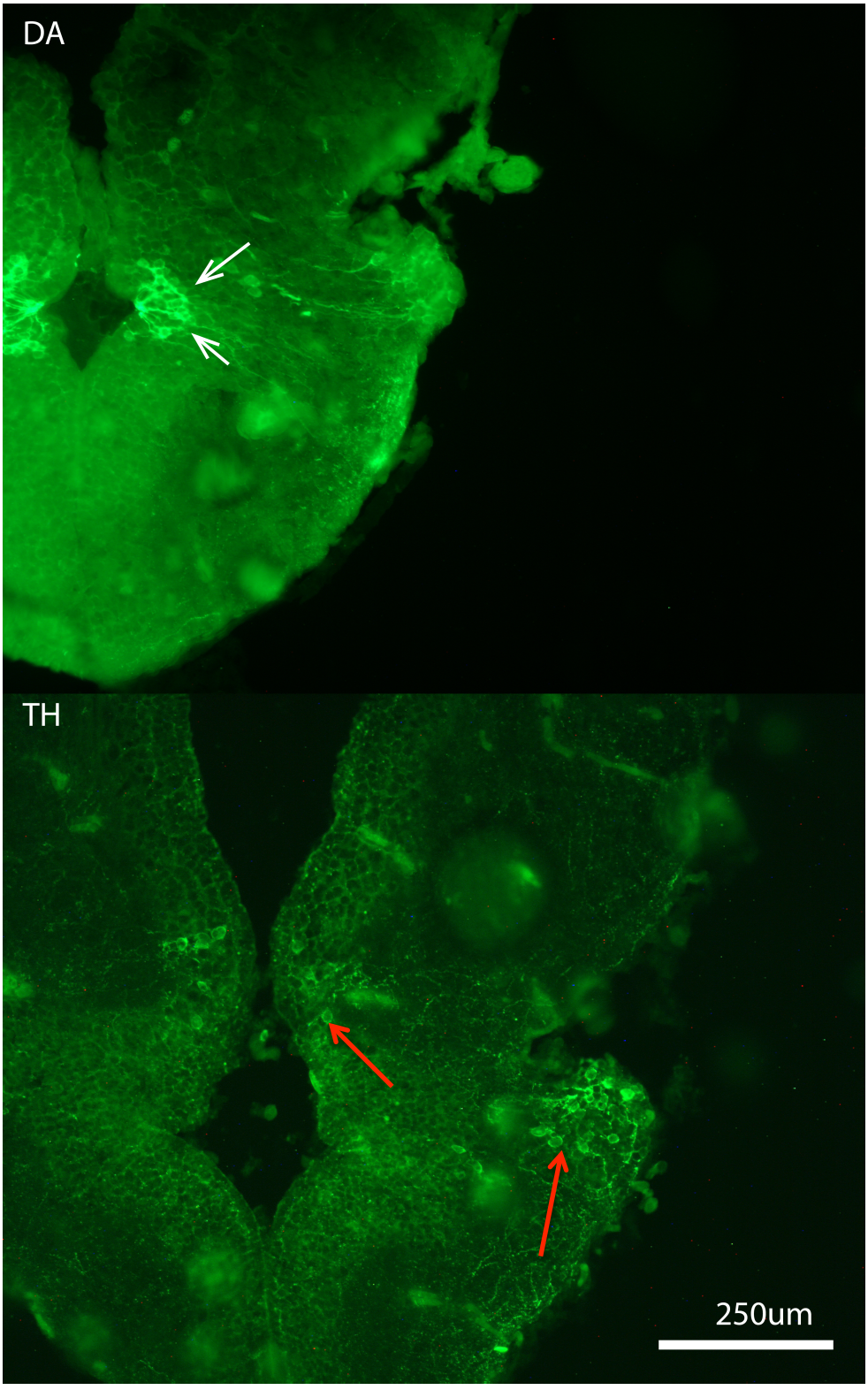

Figure 19

(Cf légende page suivante)

Figure 19

Neurones révélés par immunohistochimie de la DA ou de la TH dans la partie dorsomédiane et ventrolatérale du PT chez le triton, *Notophthalmus viridescens.* L'image du haut montre les neurones DA de la partie ventrolatérale du PT et des neurones DA+ très médians et plus dorsaux qui seraient en contact avec le fluide cérébrospinal. L'image du bas montre les neurones TH+ de la partie dorsomédiane et ventrolatérale du PT (identifiés par des flèches rouges). Les neurones DA+ situés proche du ventricule ne sont pas observés après la révélation de la TH (identifiés ici par une flèche blanche). Échelle: 250µm.

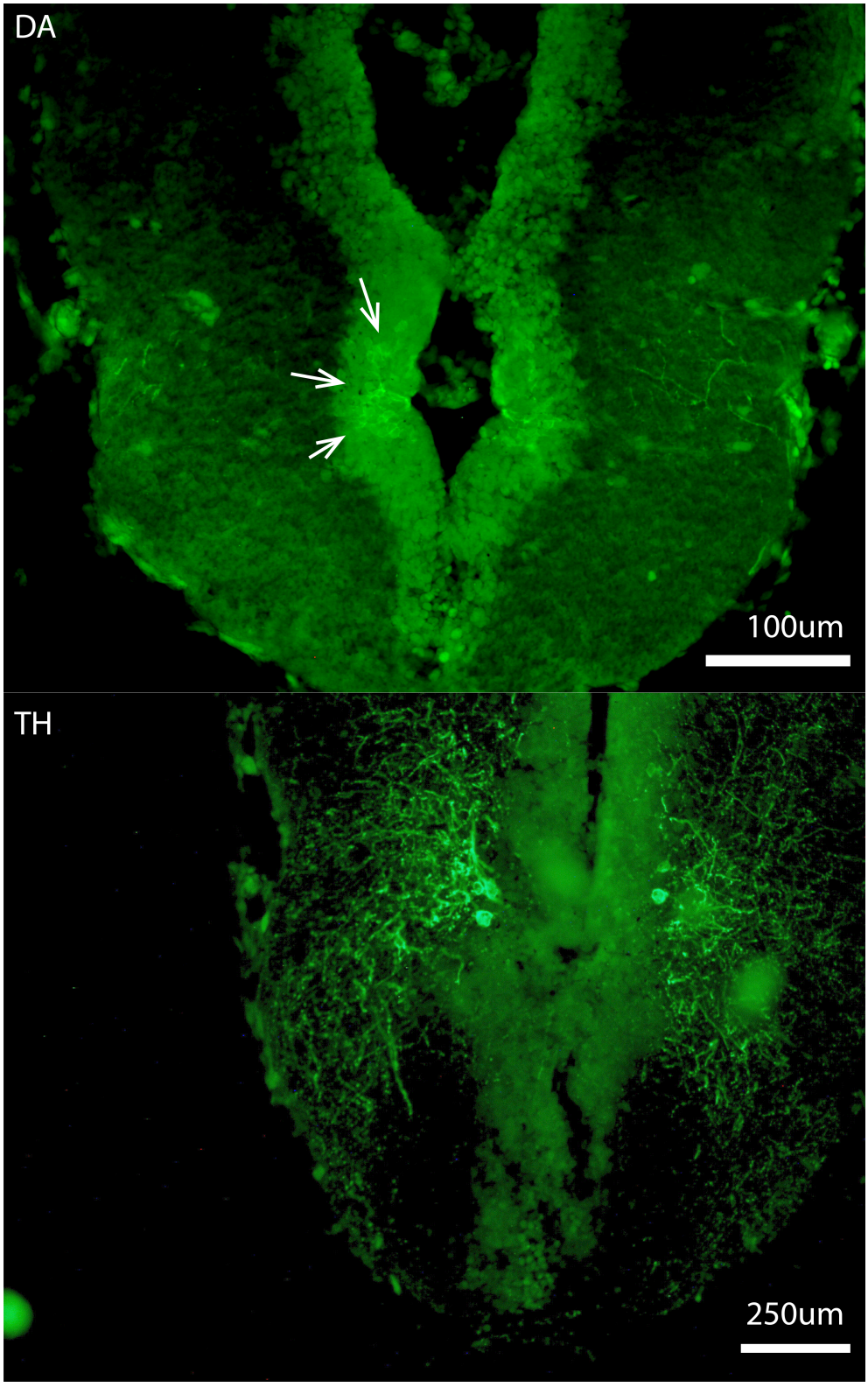

Figure 20

(Cf légende page suivante)

Figure 20

Neurones révélés par immunohistochimie de la DA ou de la TH dans la partie plus rostrale et médiane du PT chez le triton, *Notophthalmus viridescens*. L'image du haut montre les neurones DA dans la partie plus rostrale du PT qui seraient en contact avec le fluide cérébrospinal (pointés par des flèches). Ces neurones ne sont pas détectés par l'immunohistochimie de la TH (image du bas). L'image du bas montre les neurones TH plus rostraux dans le PT, mais aucun n'est marqué près du ventricule. Échelle: 100 et 250µm.

Tableau 3. Nombre de cellules TH+ total et de cellules TH+ marquées de manière rétrograde à partir du Str au niveau du tubercule postérieur chez la lamproie, *Petromyzon marinus.*

Animaux		Nombre cellules TH*/**	Nombre cellules rétrogradement marquées Str Ipsi ***	Nombre de cellules rétrogradement marquées Str Contra ***
	1	157,5	2	1
	2	320,5	5	0
	3	181,0	1	0
	4	82,5	2	0

**** Le comptage des cellules rétrogradement marquées à partir du striatum a été fait sur chaque coupe étant donné le nombre restreint de cellules comptées et la faible densité de neurones doublement marqués.** Le comptage des cellules TH+ a été fait une coupe sur deux afin d'éviter de compter deux fois la même cellule. * Le nombre de cellules TH+ affiché est pour un côté seulement et est une moyenne des deux côtés. Tous les animaux qui ont subi une immunohistochimie de la TH n'ont pas été pris en compte, car certains n'avaient pas tous des coupes complètes et ne présentaient pas une injection complète dans le Str. Seulement les cellules des animaux complets et ayant une injection complète dans le Str ont été comptées.*

Tableau 4. Nombre total de cellules TH+ et de cellules TH+ rétrogradement marquées à partir de la région locomotrice mésencéphalique au niveau du tubercule postérieur chez le triton, *Notophthalmus viridescens.*

		Nombre cellules TH**/***	Nombre cellules TH+ rétrogradement marquées RLM ipsi ***	Nombre cellules TH+ rétrogradement marquées RLM contra ***
Animaux	**1**	79,0	5	0
	2	49,0	2	0
	3	79,5	2	0
	4	56,5	2	0
	5	56,0	2	2
	6	70,0	6	0
	7	102,5	11	0

**** Le comptage des cellules a été fait une coupe sur deux afin d'éviter de compter deux fois la même cellule. ** Le nombre de cellules TH+ affiché est pour un côté du cerveau. Nous avons compté les cellules des deux côtés du cerveau et avons fait la moyenne des deux comptes obtenus. Tous les animaux qui ont subi une immunohistochimie de la TH n'ont pas été pris en compte, car certains n'avaient pas tous des coupes complètes et ne présentaient pas une injection complète dans la RLM. Seulement les cellules des animaux complets et ayant une injection complète dans le RLM ont été comptées.*

Projections dopaminergiques du PT vers la RLM chez la lamproie

Dans cette étude, toutes les lamproies utilisées pour étudier le marquage rétrograde de la RLM au niveau du PT, étaient des lamproies ayant reçu des injections à la fois dans la RLM et dans le Str.

La figure 21 résume le marquage rétrograde du traceur injecté dans la RLM. Les points verts représentent les corps cellulaires révélés par immunohistochimie de la TH. Les points rouges représentent les corps cellulaires marqués de manière rétrograde à partir de la RLM. Les points bleus représentent les corps cellulaires qui étaient à la fois TH+ et qui étaient marqués de manière rétrograde à partir de la RLM. Les corps cellulaires TH+ qui projetaient à la RLM sont situés dans la partie dorsomédiane et ventrolatérale du PT seulement. Ils ne sont pas présents au niveau du récessus postérieur, ni dans aucune autre population de cellules TH+ du cerveau ou de la moelle épinière.

Les photos de la figure 22 montrent des corps cellulaires TH+ marqués de manière rétrograde à partir de la RLM au niveau du PT chez la lamproie. La figure 22 présente des photos d'une coupe transverse du cerveau de la lamproie au niveau du PT après immunohistochimie de la TH et l'injection d'un traceur rétrograde dans la RLM permettant ainsi de voir les corps cellulaires doublement marquées. Les photos de cette figure sont cadrées sur la partie dorsomédiane du PT.

La densité de cellules TH+, en général au niveau du PT, est plus élevée que celle des cellules marquées par le traceur rétrograde à partir de la RLM. Les cellules doublement marquées sont grosses, de 20 à 30 μm, et rondes.

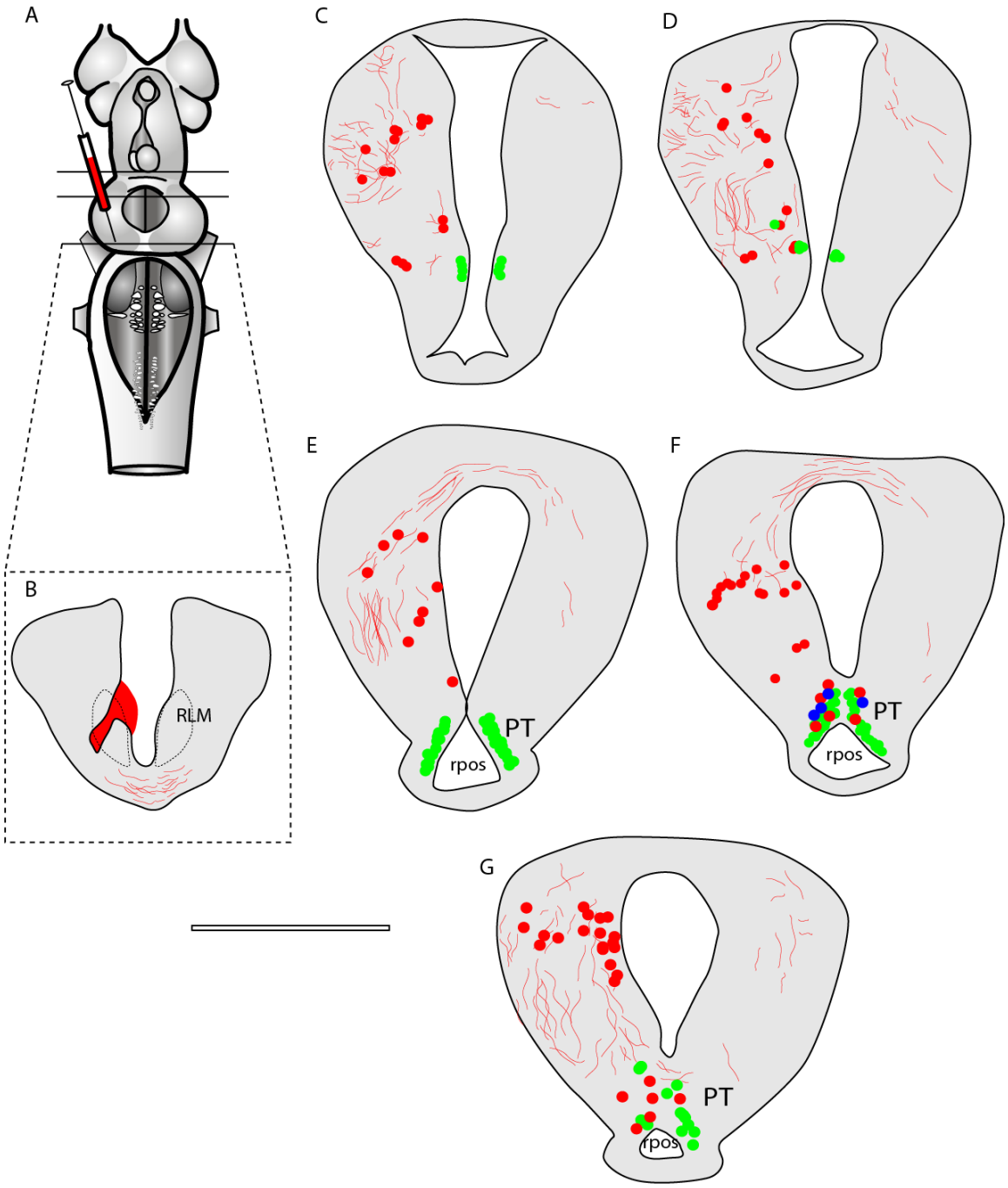

Figure 21

(Cf légende page suivante)

Figure 21

Schéma de coupes transverses du cerveau de *Petromyzon marinus* après une injection de traceur dans la région locomotrice mésencéphalique et l'immunohistochimie de la TH montrant des corps cellulaires TH+ projetant à la RLM. A) Schéma du cerveau de la lamproie, il illustre les niveaux des coupes du cerveau qui sont présentées en B-G ainsi que l'endroit exact de l'injection dans la RLM. B) Coupe au niveau du site d'injection de la RLM. C – G) Coupes de la partie du cerveau de la lamproie illustrée par les traits en A. C) Coupe la plus rostrale. G) Coupe la plus caudale. L'injection de traceur dans la région locomotrice mésencéphalique est représentée en rouge. Les fibres ainsi marquées sont représentées sur les coupes par des traits rouges, alors que les corps cellulaires marqués uniquement par le traceur rétrograde sont représentés par des points rouges. Les corps cellulaires TH+ sont représentés ici par des points verts. Les corps cellulaires qui sont à la fois TH+ et marqués par les traceurs rétrograde à partir de la RLM sont représentés par des points bleus. Le schéma illustre une coupe sur quatre. Échelle: 1mm

La majorité des neurones TH+ qui projetaient à la RLM sont situés du côté ipsilatéral à l'injection. En effet, les cellules TH+ contenant le traceur injecté dans la RLM étaient majoritairement ipsilatérales (24,9 ± 11,7 cellules i.e., 15,6 ± 4,8% des cellules TH+ totales) à l'injection. Tandis que seulement 1,5 ± 2 cellules TH+ étaient marquées contralatéralement à l'injection (i.e., 1,0 ± 1,3% des cellules TH+ totales; n = 10) (Tableau 5).

Projections DA+ du PT vers le Str chez la lamproie

À la suite des injections de traceurs dans Str chez la lamproie (n= 20; 17 avec deux injections simultanées dans la RLM et dans le Str, et 3 uniquement dans le Str), des corps cellulaires ont été observés au niveau du PT. Les neurones marqués de manière rétrograde à partir du Str étaient situés majoritairement dans la partie dorsomédiane du PT, entremêlés avec des corps cellulaires TH+. Un petit nombre de ces neurones rétrogradement marqués étaient aussi TH+ (Figure 23). Nous avons donc compté les neurones doublement marqués sur toutes les coupes et non seulement une coupe sur deux, pour arriver aux chiffres de 2,5 ± 2,0 cellules TH+ marquées de manière rétrograde à partir du Str du côté ipsilatéral à l'injection (i.e., 1,5 ± 0,8% des cellules TH+ totales), et 0,3 ± 0,5 cellules du côté contralatéral à l'injection (i.e., 0,2 ±0,3% des cellules TH+ totales; n=4; Tableau 3). Une seule cellule TH+ a été observée au niveau du PT comme projetant au Str, contralatéralement à l'injection, sur un total de 20 animaux examinés au microscope.

Tableau 5. Nombre de cellules TH+ total et de cellules TH+ rétrogradement marquées à partir de la région locomotrice mésencéphalique au niveau du tubercule postérieur chez la lamproie, *Petromyzon marinus.*

		Nombre cellules TH*/**	Nombre cellules rétrogradement marquées RLM ipsi**	Nombre cellules rétrogradement marquées RLM contra **
Animaux	**1**	157,5	17	0
	2	320,5	52	1
	3	181	21	0
	4	82,5	16	0
	5	164	34	1
	6	131,5	29	1
	7	155,5	18	0
	8	159	30	6
	9	114,5	19	3
	10	168	13	3

(Détails page suivante)

Détails tableau 5

*** Le comptage des cellules a été fait une coupe sur deux afin d'éviter de compter deux fois la même cellule.* Le nombre de cellules TH+ affiché est pour un côté du cerveau. Nous avons compté les cellules des deux côtés du cerveau et avons fait la moyenne des deux comptes obtenus. Tous les animaux qui ont subi une immunohistochimie de la TH n'ont pas été pris en compte, car certains n'avaient pas tous des coupes complètes et ne présentaient pas une injection complète dans la RLM. Seulement les cellules des animaux complets et ayant une injection complète dans la RLM ont été comptées.*

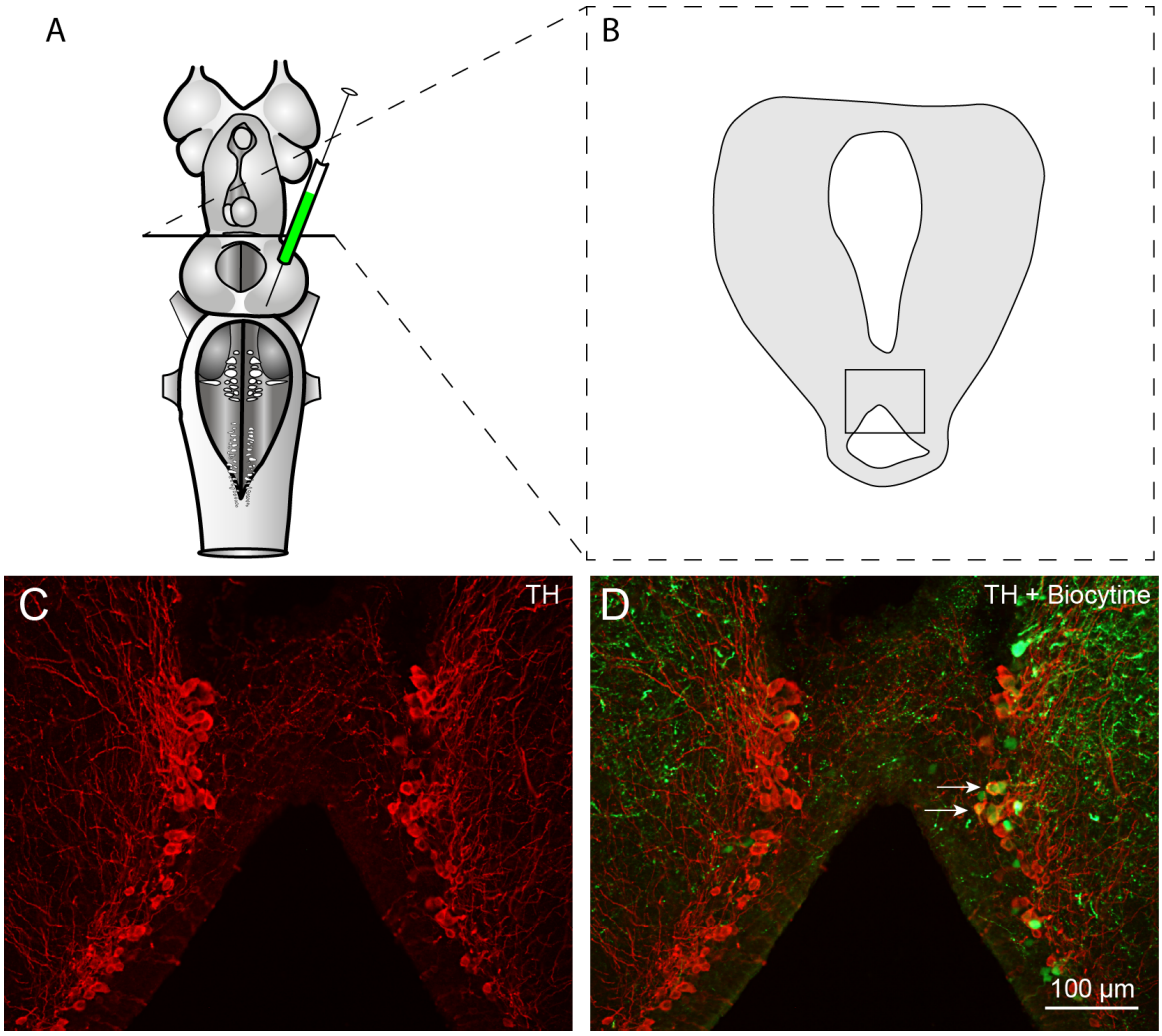

Figure 22

(Cf légende page suivante)

Figure 22

Schéma et photos illustrant des corps cellulaires marqués l'injection de traceur dans la région locomotrice mésencéphalique et marqués par immunofluorescence contre la TH chez la lamproie, *Petromyzon marinus*. A) Schéma de l'endroit du cerveau de la lamproie où les photos ont été prélevées. Le site d'injection au niveau de la RLM est indiqué par la seringue. B) Schéma de l'endroit où les photos ont été prises sur la coupe transverse. C) Exposition de la coupe à des longueurs d'ondes permettant d'illustrer le rouge (jeu de filtres pour Texas Red). De cette manière, il est possible de voir les corps cellulaires marqués par l'immunofluorescence contre la TH. D) Agencement de la photo C) avec la même région exposée à une longueur d'onde différente (jeu de filtres pour FITC) permettant d'illustrer le vert et de ce fait les cellules marquées de manière rétrograde à partir de la RLM. Cette superposition permet de faciliter l'identification des corps cellulaires doublement marqués (cellules TH+ qui projettent à la RLM) dans une teinte orangée. Certains d'entre eux sont identifiés par des flèches. Échelle: 100um.

Lors des expériences *in vitro* chez la lamproie, la proportion de cellules DA+ du PT marquées à partir du Str était très faible. Des expériences *in vivo* chez la lamproie ont alors été faites afin de nous assurer de la qualité des résultats que le nombre de cellules détectées dans la voie DA+ ascendante était comparable à celui observé lors des expériences *in vitro*.

Marquage dans le PT à la suite des injections combinées dans la RLM et dans le Str chez la lamproie

Les neurones TH+ du PT qui projetaient à la RLM ou au Str se retrouvent dans la même population de neurones du PT chez la lamproie (Figure 24). La taille des deux types de neurones est semblable: entre 5 et 10 μm. Elles ont toutes une forme ovale. La seule différence qui pouvait être notée entre les cellules qui projettent au Str ou à la RLM était la forme légèrement triangulaire que pouvaient avoir les cellules qui projetaient vers la RLM. De plus, les corps cellulaires qui projetaient vers le Str n'étaient observés que dans la partie dorsomédiane du PT, alors que les corps cellulaires qui projetaient à la RLM étaient observés autant dans la partie dorsomédiane que la partie ventrolatérale du PT.

Sur 17 lamproies, nous avons trouvé un total de 3 cellules triplement marquées dans le PT, c'est-à-dire TH+ qui projetaient à la fois au Str et à la RLM.

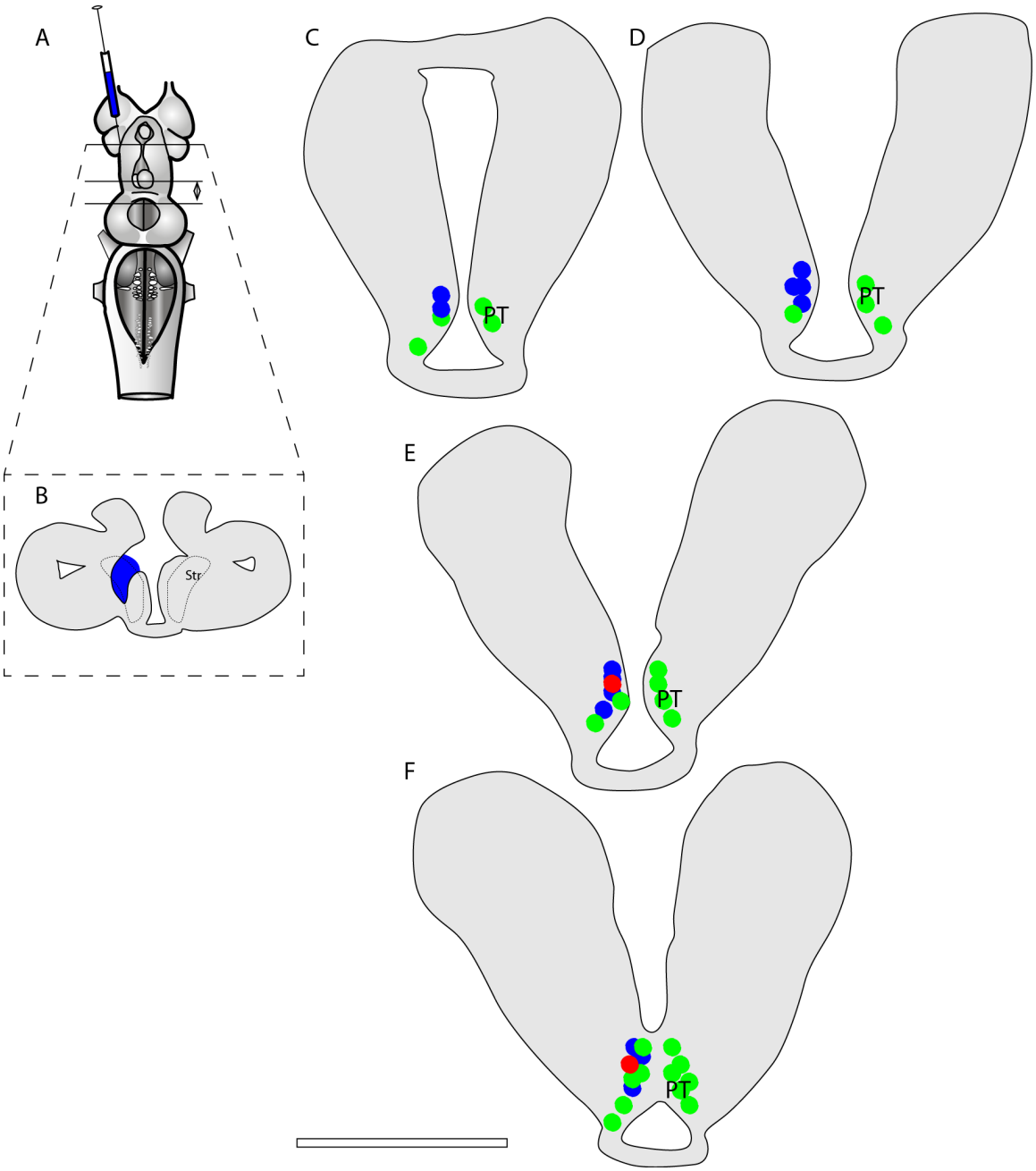

Figure 23

(cf légende page suivante)

Figure 23

Schéma de coupes du cerveau de lamproie, *Petromyzon marinus,* après une injection de traceur rétrograde dans le striatum et une immunohistochimie des corps cellulaires TH+ et les corps cellulaires marqués à partir du striatum. A) Schéma du cerveau de la lamproie illustrant la région d'où proviennent les coupes présentée en B-F ains que le site exact de l'injection dans le Str. B) Schéma d'une coupe au niveau de l'injection dans le Str. C – F) Coupes provenant de la partie du cerveau de la lamproie illustrée en A. C étant la coupe la plus rostrale et F la plus caudale. Les corps cellulaires marqués uniquement par le traceur injecté dans le Str sont représentés par des points bleus. Les neurones qui sont seulement TH+ sont représentés par des points verts. Les corps cellulaires qui sont à la fois TH+ et marqués à partir du Str sont représentés par des points rouges. Le schéma illustre une coupe sur quatre. Échelle: 1mm

En résumé, au niveau du PT, les neurones TH+ marqués par les traceurs rétrograde à partir de la RLM (n=17 animaux) sont environ 10 fois plus nombreux que ceux marqués à partir du Str (16,6 ± 6,1% (15,6 ± 4,8% + 1,0 ± 1,3%) vs 1,7 ± 1,1% (1,5 ± 0,8% + 0,2 ± 0,3%).

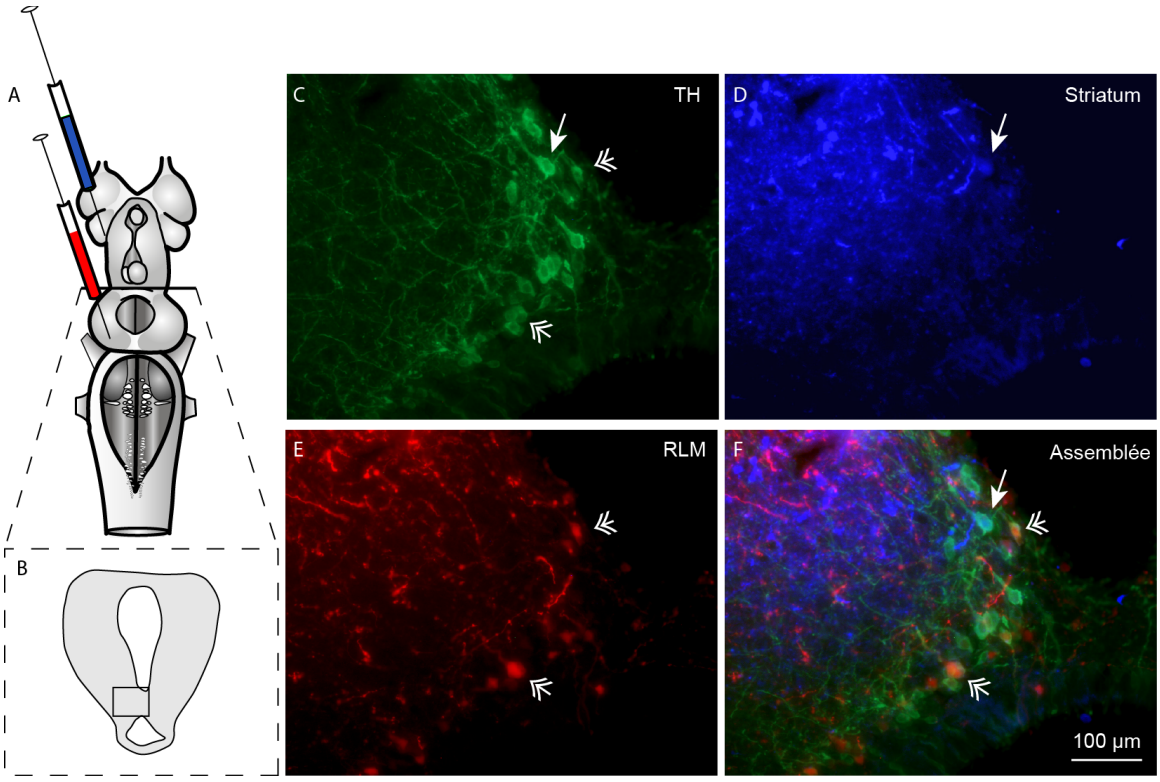

Figure 24

(cf légende page suivante)

Figure 24

Schéma et photos illustrant des corps cellulaires du PT marqués à partir de la région locomotrice mésencéphalique, du striatum et marqués par immunohistochimie de la TH chez la lamproie, *Petromyzon marinus.* A) Schéma de l'endroit du cerveau de la lamproie où les photos ont été prélevées et les sites d'injections des différents traceurs dans le Str (seringue bleu) et dans la RLM (seringue rouge). B) Schéma de la coupe transverse où les photos ont été prises. C) Photo avec une exposition à des longueurs d'ondes permettant d'illustrer le vert (jeu de filtres pour FITC). De cette manière, il est possible de voir les corps cellulaires marqués par l'immunofluorescence contre la TH. D) Photo avec une exposition à une longueur d'onde différente (jeu de filtres pour DAPI) permettant d'illustrer le bleu et de ce fait les cellules marquées à partir du Str. E) Photo avec une exposition à une autre longueur d'onde (jeu de filtres Texas Red) permettant d'illustrer le rouge et ainsi d'observer les neurones marqués à partir de la RLM. F) Superposition des photos C-E permettant ainsi d'observer les corps cellulaires doublement marqués, soit TH+ qui projettent au Str (identifié par une flèche) ou soit TH+ qui projettent à la RLM (identifié par une double flèche). Échelle: 100 μm.

Projections DA+ du PT vers la RLM chez le triton

Après avoir injecté un traceur au niveau de la RLM (n=25 ; 21 animaux avec des injections de traceurs à la fois dans la RLM et dans le striatum; 4 animaux avec une injection dans la RLM seulement), des corps cellulaires marqués ont été détectés au niveau du PT.

Il est important de mentionner qu'en comparant les résultats obtenus des animaux avec une seule injection dans la RLM ou dans le Str et ceux avec deux injections simultanées de traceurs différents dans la RLM et le Str, il était possible d'utiliser les animaux qui sont marqués par deux traceurs simultanément pour analyser le marquage rétrograde de l'une ou l'autre des différentes injections, puisque les cellules à l'étude n'étaient pas influencées par le marquage de l'une ou l'autre des injections.

À la suite de l'injection du traceur dans la RLM, 3 fois plus de cellules étaient observées au niveau du PT ipsilatéralement (293,4 ± 191,2 cellules) à l'injection que contralatéralement (73,2 ± 48,8 cellules) à l'injection (n= 8). Les corps cellulaires du PT marqués de manière rétrograde à partir de la RLM formaient deux groupes différents. Le premier groupe était situé dans la partie dorsomédiane du PT, dans sa partie diencéphalique et non pas dans sa partie mésencéphalique (voir introduction). Les corps cellulaires de ce groupe sont petits, allongés avec une forme triangulaire (Figure 26). Environ 3 à 6 cellules de ce groupe marquées à partir de la RLM étaient aussi TH+. Le deuxième groupe était situé dans la partie ventrolatérale du PT. Les cellules marquées étaient surtout ipsilatérales à l'injection dans la RLM

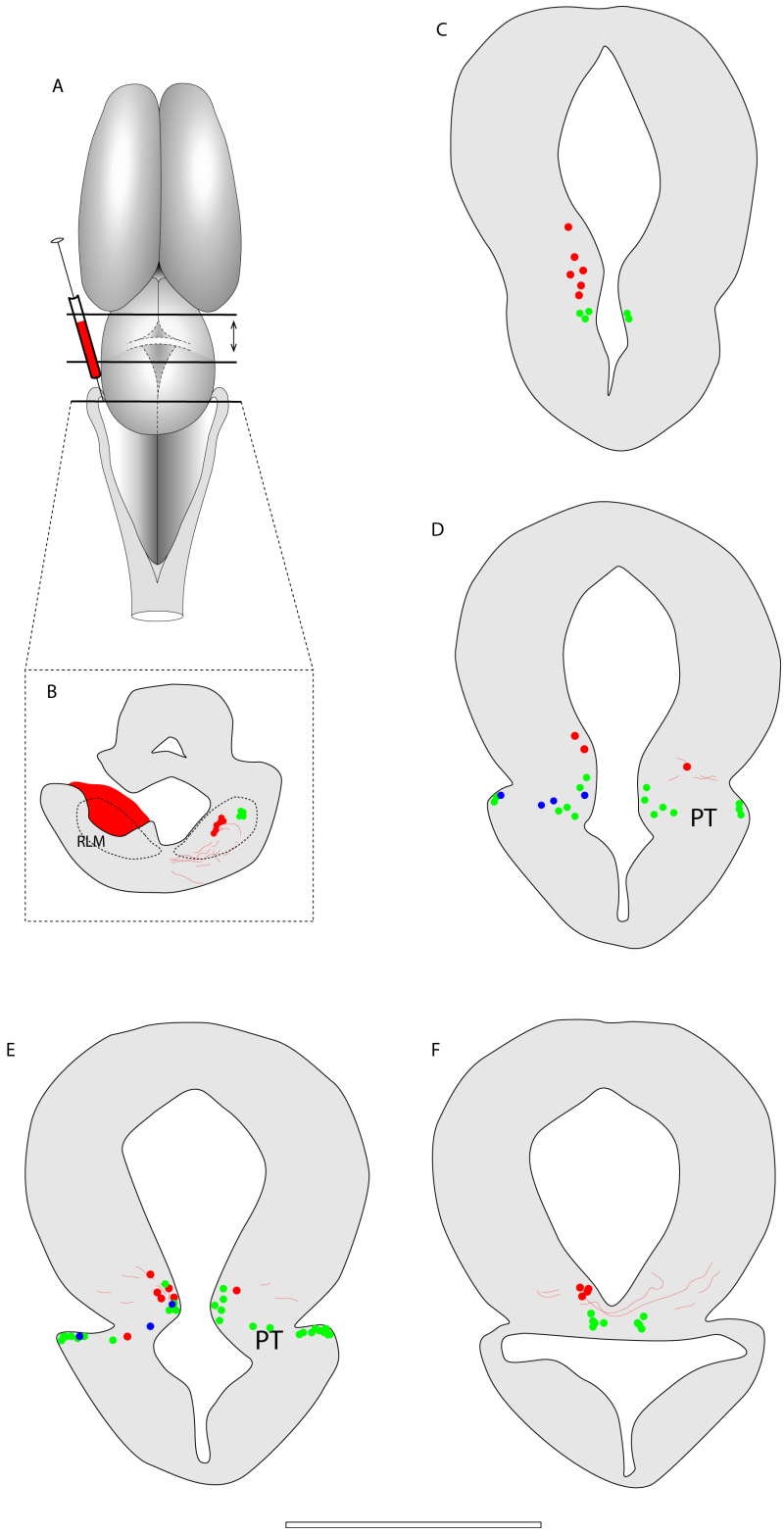

Figure 25

(Cf légende page suivante)

Figure 25

Schéma de coupes transverses du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* montrant le marquage dans le PT suite à une injection de traceur dans la région locomotrice mésencéphalique et l'immunohistochimie de la TH. A) Schéma du cerveau du triton, il illustre l'endroit où les coupes du cerveau sont présentées ainsi que l'endroit exact de l'injection au niveau de la RLM. B) Schéma de la coupe au niveau de l'injection de la RLM. C-F) Coupes provenant de la partie du cerveau du triton illustré en A. C étant la coupe la plus rostrale et F la plus caudale. Les neurones marqués seulement avec le traceur sont représentés en rouge. Les neurones marqués uniquement avec l'immunohistochimie de la TH sont représentés en vert. Ceux qui contiennent de la TH et qui projettent à la RLM sont représentés en bleu. Le schéma illustre une coupe sur quatre. Échelle: 1 mm

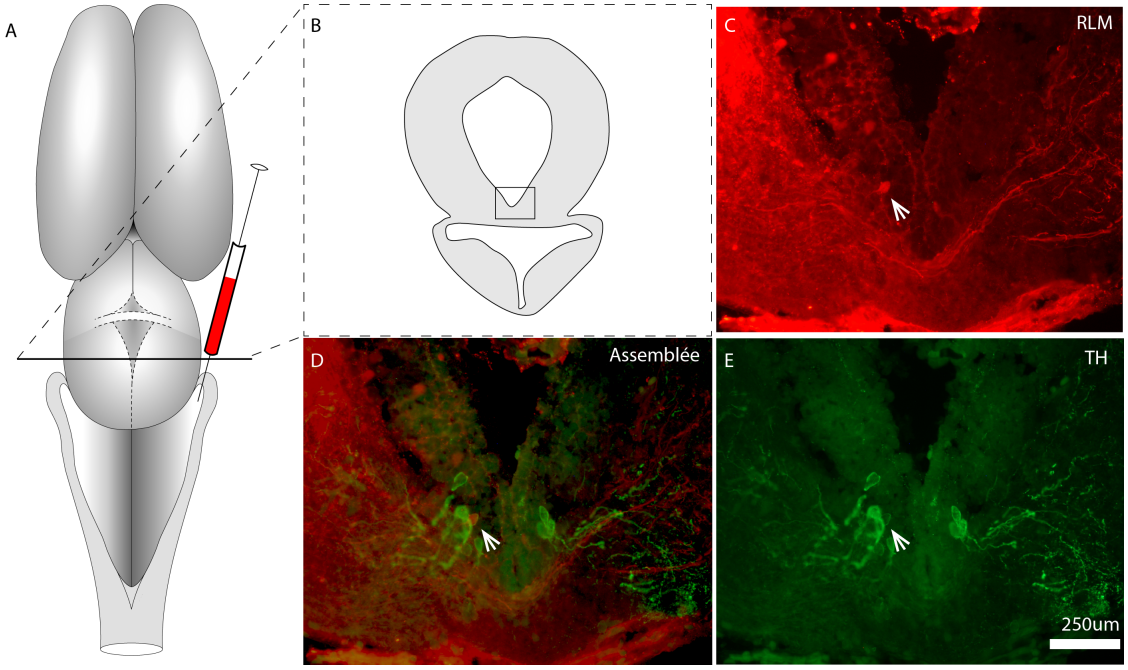

Figure 26

(Cf légende page suivante)

Figure 26

Schéma et photos de coupes du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* suite à une injection de traceur dans la région locomotrice mésencéphalique et l'immunohistochimie montrant les corps cellulaires TH+ et rétrogradement marqués à partir de la RLM au niveau dorsomédian du PT. A) Schéma de l'endroit du cerveau de la lamproie où les photos ont été prélevées et le site d'injections du traceur dans la RLM (seringue rouge). B) Schéma de la coupe transverse où les photos ont été prises. C) Photo avec une exposition à des longueurs d'ondes permettant d'illustrer le rouge (jeu de filtres pour Texas Red). De cette manière, il est possible de voir les corps cellulaires marqués par le traceur injecté à la RLM. E) Photo avec une exposition à une longueur d'onde différente (jeu de filtres pour FITC) permettant d'illustrer le vert et de ce fait les cellules marquées l'immunofluorescence de la TH. D) Superposition des photos C et E permettant ainsi d'observer les corps cellulaires doublement marqués, soit TH+ qui projettent à la RLM (identifié par une flèche). Échelle: 250um

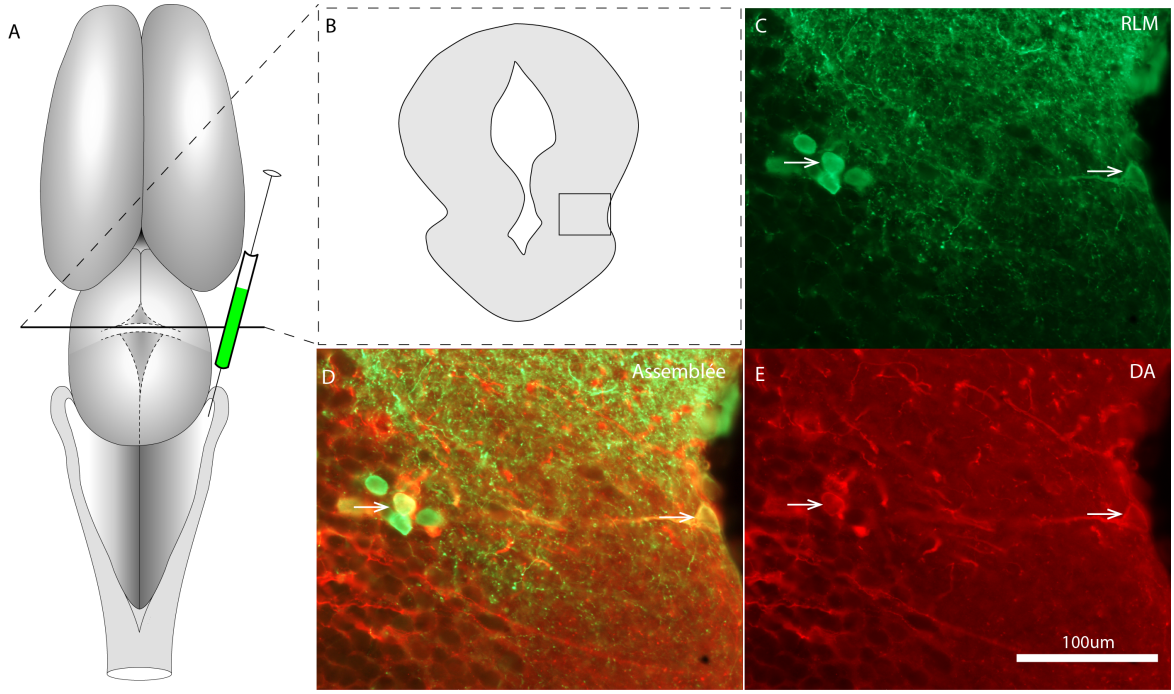

Figure 27

(Cf légende page suivante)

Figure 27

Schéma et photos de coupes du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* suite à une injection de traceur dans la région locomotrice mésencéphalique et une réaction immunohistochimique contre la DA montrant des corps cellulaires DAir et rétrogradement marqués à partir de la RLM dans la portion ventrolatérale du PT. A) Schéma de l'endroit du cerveau de la lamproie où les photos ont été prélevées et le site d'injections du traceur dans la RLM (seringue verte). B) Schéma de la coupe transverse où les photos ont été prises. C) Photo avec une exposition à des longueurs d'ondes permettant d'illustrer le verte (jeu de filtres pour FITC). De cette manière, il est possible de voir les corps cellulaires marqués par le traceur injecté à la RLM. E) Photo avec une exposition à une longueur d'onde différente (jeu de filtres pour Texas Red) permettant d'illustrer le rouge et de ce fait les cellules marquées l'immunofluorescence de la DA. D) Superposition des photos C et E permettant ainsi d'observer les corps cellulaires doublement marqués, soit DA+ qui projettent à la RLM (identifié par une flèche). Échelle: 100 µm

(Figure 27 et 28). Les corps cellulaires marqués de ce groupe ventrolatéral étaient gros et de forme arrondie. Environ aussi 3 à 6 des cellules de ce groupe marqué à partir de la RLM étaient TH+.

Les cellules TH+ du PT qui projetaient à la RLM dans la partie ventrolatérale ainsi que dans la portion diencéphalique de la partie dorsomédiane sont illustrés par les points bleus sur la figure 25 et sur les photos des figures 26, 27 et 28.

Parmi ces cellules qui projetaient à la RLM, on a compté en moyenne 8,3 ± 2,6 (15,0 ± 5,0% de cellules TH+ totales) cellules TH+ du côté ipsilatéral à l'injection et 1,1 ± 0,9 (1,7 ± 1,6% de cellules TH+ totales) cellules TH+ du côté contralatéral à l'injection. La majorité de ces cellules TH+ projetant à la RLM étaient situées dans la partie ventrolatérale du PT. Seulement, 1 à 2 cellules TH+ par animal étaient marquées de manière rétrograde à partir de la RLM dans la partie dorsomédiane du PT (n =7) (Tableau 4).

Projections DA+ du PT vers le Str chez le triton

À la suite d'injections de traceurs au niveau du Str chez le triton (n= 27; 21 avec deux injections combinées de traceurs différents dans la RLM et le Str, et 6 injectés uniquement dans le Str), des corps cellulaires marqués ont été observés au niveau du PT généralement du côté ipsilatéral à l'injection, dans la partie dorsomédiane du PT (points verts et bleus, figure 29). Certains des corps cellulaires du PT projetant au Str étaient TH+, surtout dans la portion mésencéphalique de la partie dorsomédiane du PT (points bleus sur la figure 29).

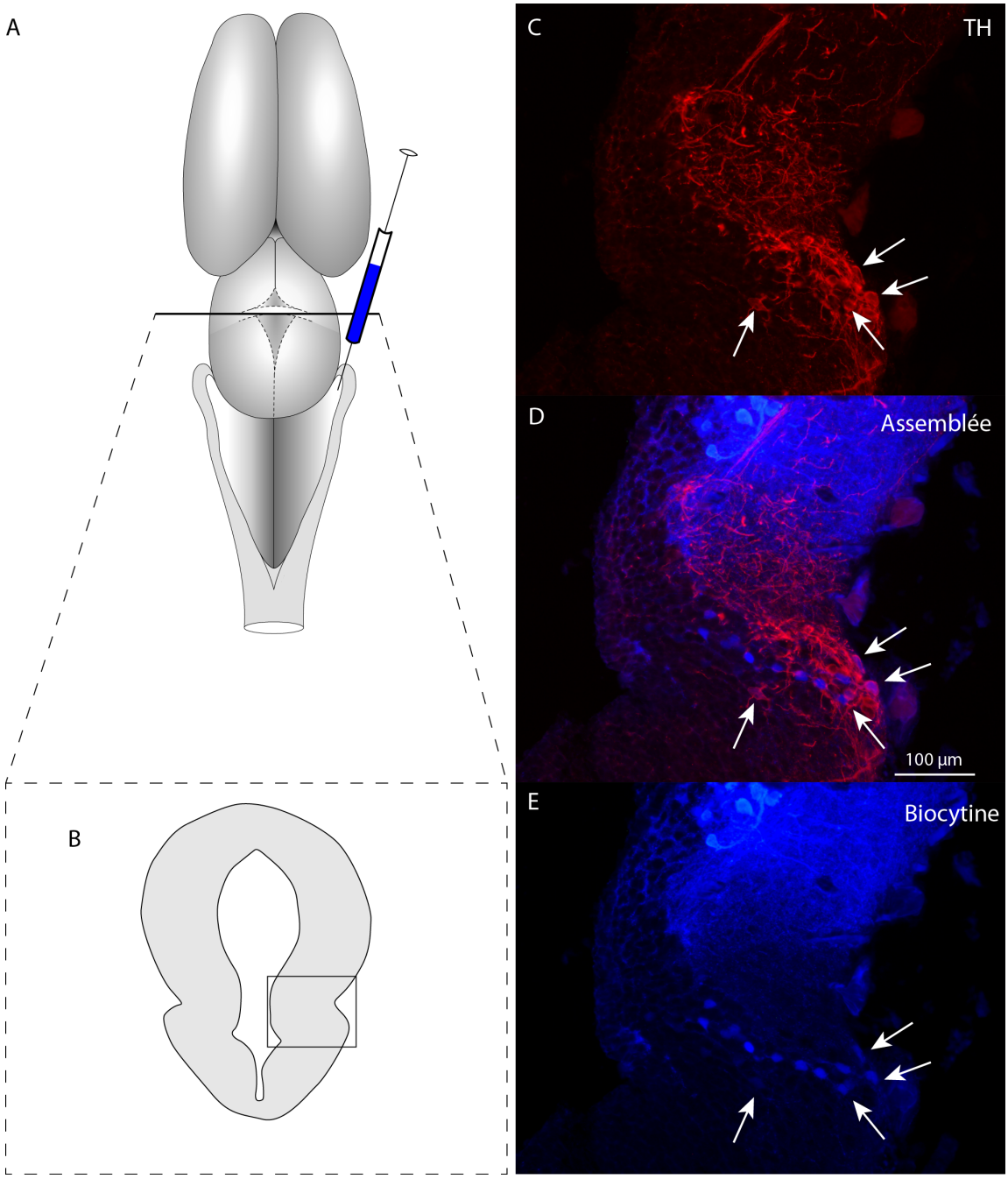

Figure 28

(Cf légende page suivante)

Figure 28

Schéma et photos de coupes transverses du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* montrant des cellules marquées dans le PT, portion ventrolatérale, après une injection de traceur rétrograde dans la région locomotrice mésencéphalique et une immunohistochimie de la TH. A) Schéma de l'endroit du cerveau de la lamproie où les photos ont été prélevées et le site d'injections du traceur dans la RLM (seringue bleu). B) Schéma de la coupe transverse où les photos ont été prises. C) Photo avec une exposition à des longueurs d'ondes permettant d'illustrer le rouge (jeu de filtres pour Texas Red). De cette manière, il est possible de voir les corps cellulaires marqués par l'immunofluorescence de la TH. E) Photo avec une exposition à une longueur d'onde différente (jeu de filtres pour DAPI) permettant d'illustrer le bleu et de ce fait les cellules marquées par l'injection de traceur dans la RLM. D) Superposition des photos C et E permettant ainsi d'observer les corps cellulaires doublement marqués, soit TH+ qui projettent à la RLM (identifié par des flèches). Échelle: 100 µm

La figure 30 illustre les corps cellulaires TH+ marqués par des traceurs rétrogrades à partir du Str dans la partie dorsomédiane caudale du PT. En effet, c'est uniquement à ce niveau que les corps cellulaires TH+ projetant au Str ont été observés. De plus, il est important de mentionner que ces corps cellulaires étaient situés dans la partie mésencéphalique du PT (voir introduction).

Les corps cellulaires du PT marqués à partir du Str étaient localisés ipsilatéralement et contralatéralement à l'injection. On a compté 2 fois plus de cellules ainsi marquées du côté ipsilatérale (18,3 ± 11,4 cellules) à l'injection que du côté contralatérale (9,5 ± 5,6 cellules) à l'injection (n= 9).

On a obtenu en moyenne, 4,3 ± 1,2 (i.e., 5,0 ± 1,4% de cellules TH+ totales) cellules marquées à la fois par l'immunofluorescence de la TH à partir du Str ipsilatéral. Du côté contralatéral à l'injection, une seule cellule doublement marquée a été détectée chez les 8 animaux (0,1 ± 0,4 cellule; i.e., 0,1 ± 0,3 % de cellules TH+ totales; n=8; Tableau 6).

Marquage dans le PT à la suite des injections simultanées dans la RLM et le Str chez le triton

Les corps cellulaires TH+ marqués à partir du Str ou de la RLM ont été visualisés pour la plupart dans des régions distinctes du PT. Ceux projetant au Str se trouvaient dans la portion mésencéphalique du groupe dorsomédian du PT alors que ceux projetant à la RLM étaient dans la portion diencéphalique du groupe dorsomédian ou dans le groupe ventrolatéral du PT. Ce n'est qu'à la transition

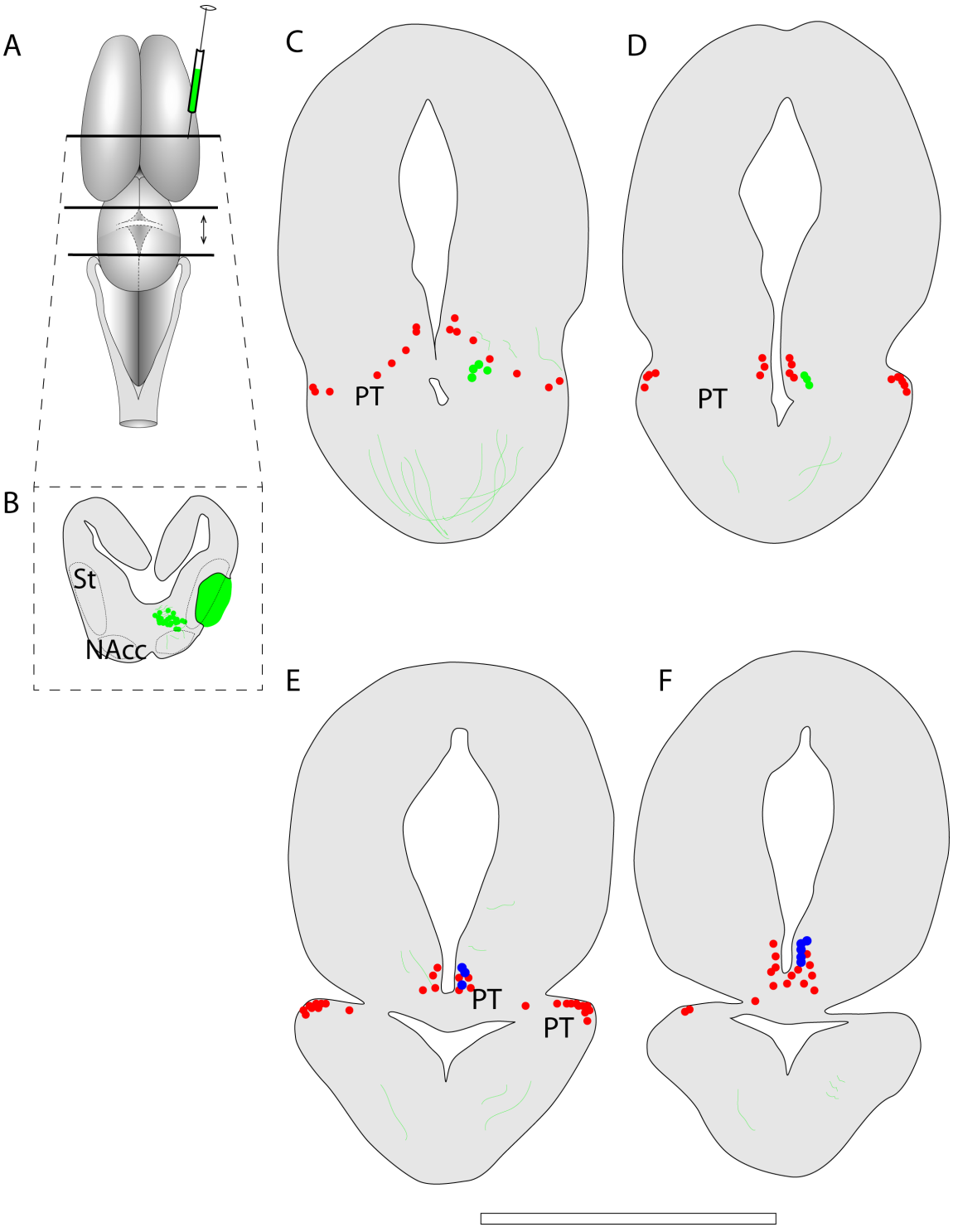

Figure 29

(Cf légence page suivante)

Figure 29

Schéma de coupes transverses du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* montrant le marquage dans le PT suite à une injection de traceur dans le striatum et une immunohistochimie de la TH. A) Schéma du cerveau du triton et des niveaux des coupes ainsi que le site d'injection dans le Str. B) Schéma de la coupe au niveau de l'injection dans le Str. C-F) Coupes des niveaux illustrés en A. C étant la coupe la plus rostrale et F la plus caudale. Les fibres marquées par l'injection sont représentées sur les coupes par des traits verts, et les corps cellulaires qui sont uniquement marqués par le traceur rétrograde sont représentés par des points verts. Les corps cellulaires qui sont uniquement TH+ sont représentés par des points rouges et ceux qui sont à la fois TH+ et marqués par le traceur sont représentés par des points bleus. Le schéma illustre une coupe sur quatre. Échelle: 1mm

entre les portions mésencéphalique et diencéphalique du groupe dorsomédian du PT que l'on retrouvait un mélange de neurones TH+ qui projetaient au Str ou à la RLM (Figures 31 et 32). Chez le triton, nous n'avons trouvé aucun neurone TH+ qui projetait à la fois au Str et à la RLM.

Il est important de mentionner que les neurones TH+ qui projetaient au Str et ceux qui projettent à la RLM n'ont pas les mêmes caractéristiques morphologiques. Ceux qui projetaient au Str étaient plus petits et contiennent très peu de cytoplasme, ce qui donne souvent l'impression qu'ils sont moins immunoréactifs à la TH (Figure 30C). À l'opposé, ceux qui projetaient à la RLM étaient plus gros, souvent plus éloignés du ventricule, et contiennent souvent davantage de cytoplasme (Figure 27D).

Chez le triton, il y a environ 3 fois plus de cellules TH+ qui projetaient à la RLM qu'au Str. En effet, 5,1 ± 1,7% des cellules TH du PT projetaient au Str (5,0 ± 1,4 % ipsilatérales à l'injection et 0,1 ± 0,3% contralatérales à l'injection) et 16,7 ± 6,6% des cellules TH du PT projetaient à la RLM (15,0 ± 5,0% ipsilatérales à l'injection et 1,7 ± 1,6% contralatérales à l'injection).

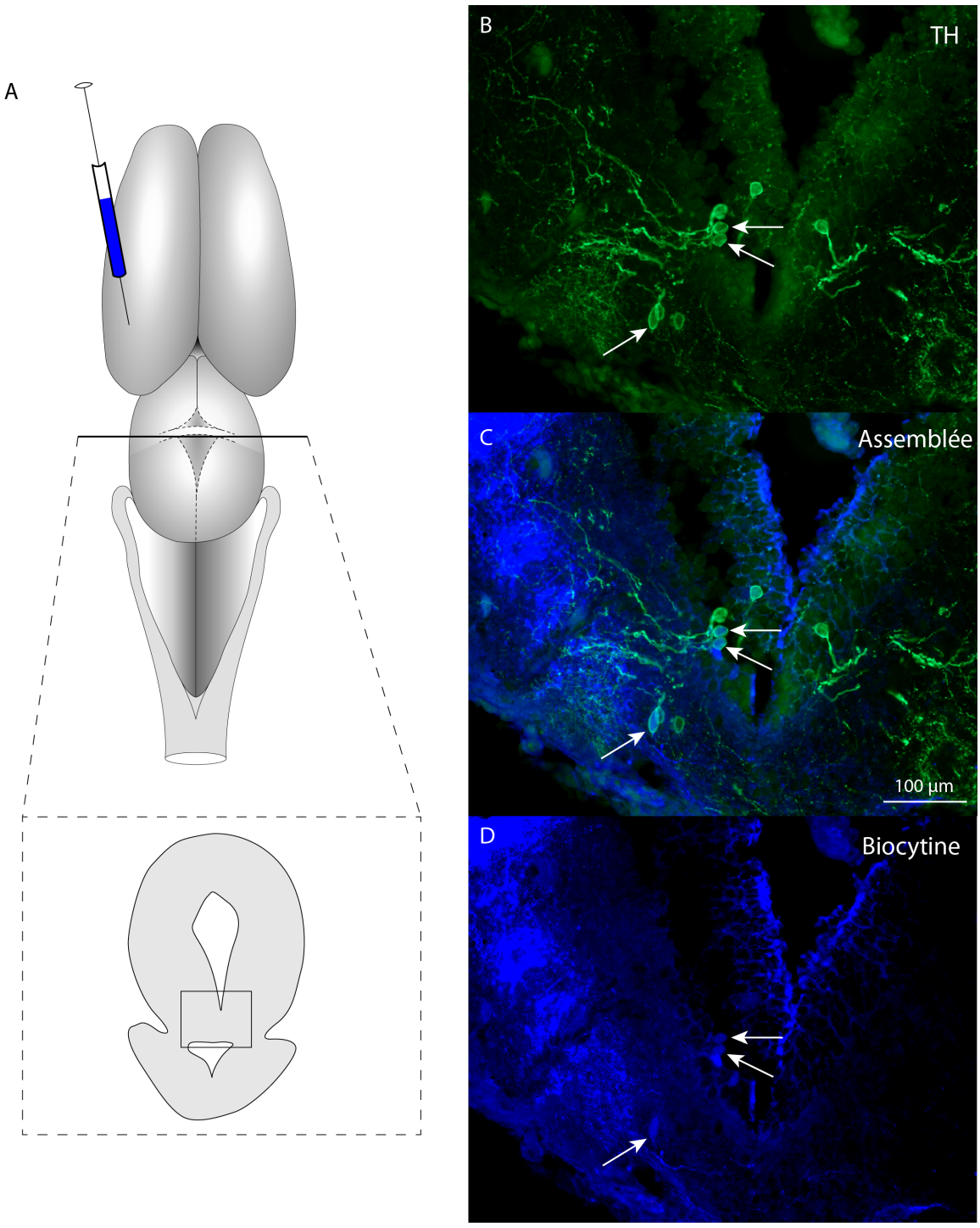

Figure 30

(Cf légende page suivante)

Figure 30

Schéma et photos de coupes du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* au niveau du PT suite à une injection de traceur dans le striatum et une réaction immunohistochimique contre la TH. A) Schéma de l'endroit du cerveau de la lamproie où les photos ont été prélevées et le site d'injections du traceur dans le Str (seringue bleu). B) Schéma de la coupe transverse où les photos ont été prises. C) Photo avec une exposition à des longueurs d'ondes permettant d'illustrer le vert (jeu de filtres pour FITC). De cette manière, il est possible de voir les corps cellulaires marqués par l'immunofluorescence de la TH. E) Photo avec une exposition à une longueur d'onde différente (jeu de filtres pour DAPI) permettant d'illustrer le bleu et de ce fait les cellules marquées par l'injection de traceur dans le Str. D) Superposition des photos C et E permettant ainsi d'observer les corps cellulaires doublement marqués, soit TH+ qui projettent au Str (identifié par des flèches). Échelle: 100 µm

Tableau 6. Nombre de cellules TH+ total et de cellules TH+ rétrogradement marquées à partir du striatum au niveau du tubercule postérieur chez le triton, *Notophthalmus viridescens.*

		Nombre cellules TH*/**	Nombre cellules rétrogradement marquées Str ipsi***	Nombre cellules rétrogradement marquées Str contra***
Animaux	**1**	87,0	4	0
	2	124,0	4	1
	3	79,5	6	0
	4	66,5	3	0
	5	70,0	4	0
	6	79,5	4	0
	7	87,0	3	0
	8	102,5	6	0

Détails page suivante

Détails tableau 6

**** Le comptage des cellules rétrogradement marquées à partir du striatum a été fait sur chaque coupe étant donné le nombre restreint de cellules comptées et la faible densité de neurones doublement marqués.** Le comptage des cellules TH+ a été fait une coupe sur deux afin d'éviter de compter deux fois la même cellule. * Le nombre de cellules TH+ affiché est pour un côté seulement et est une moyenne des deux côtés. Tous les animaux qui ont subi une immunohistochimie de la TH n'ont pas été pris en compte, car certains n'avaient pas tous des coupes complètes et ne présentaient pas une injection complète dans le Str. Seulement les cellules des animaux complets et ayant une injection complète dans le Str ont été comptées.*

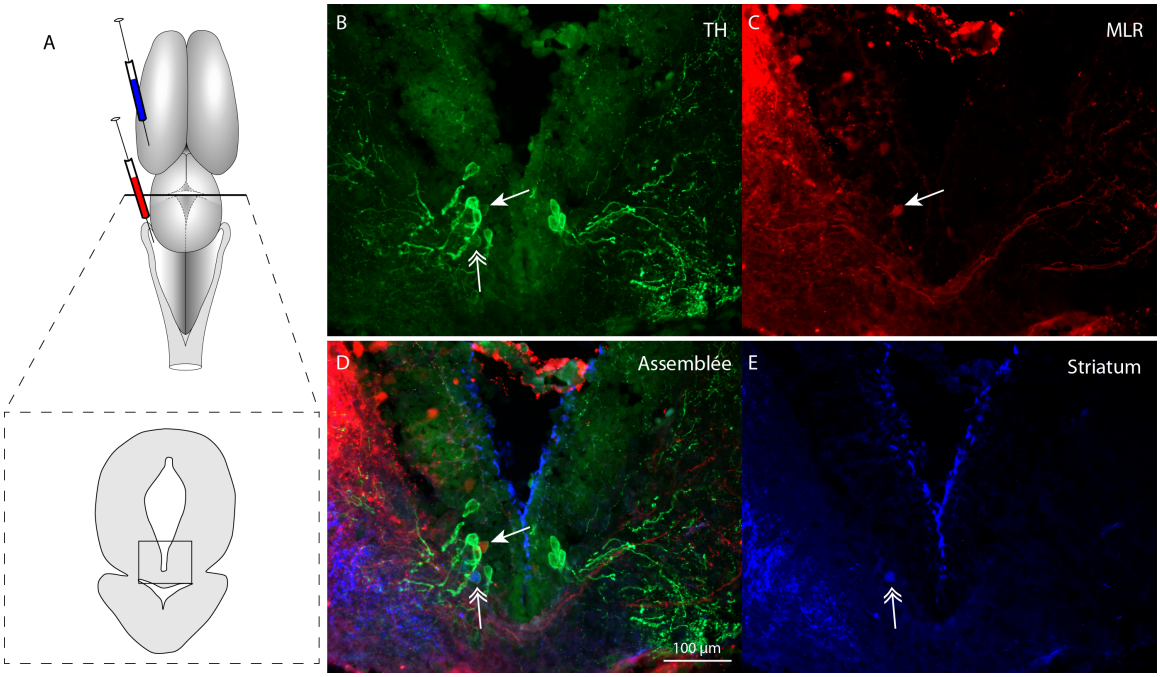

Figure 31

(Cf légende page suivante)

Figure 31

Schéma et photos d'une coupe transverse du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* au niveau du PT montrant des neurones TH+ qui projettent au Str et à la RLM. A) Schéma de l'endroit du cerveau de la lamproie où les photos ont été prélevées et le site d'injections du traceur dans le Str (seringue bleu) et dans la RLM (seringue rouge) avec un schéma de la coupe transverse où les photos ont été prises. B) Photo avec une exposition à des longueurs d'ondes permettant d'illustrer le vert (jeu de filtres pour FITC). De cette manière, il est possible de voir les corps cellulaires marqués par l'immunofluorescence de la TH. C) Photo avec une exposition à une longueur d'onde différente (jeu de filtres pour Texas Red) permettant d'illustrer le rouge et de ce fait les cellules marquées par l'injection de traceur dans la RLM. E) Photo avec une exposition à une longueur d'onde différente (jeu de filtres pour DAPI) permettant d'illustrer le bleu et de ce fait les cellules marquées par l'injection de traceur dans le Str. D) Superposition des photos B, C et E permettant ainsi d'observer les corps cellulaires doublement marqués, soit TH+ qui projettent au Str (identifié par une double flèche), soit TH+ qui projettent à la RLM (identifié par un flèche). Échelle: 100 µm

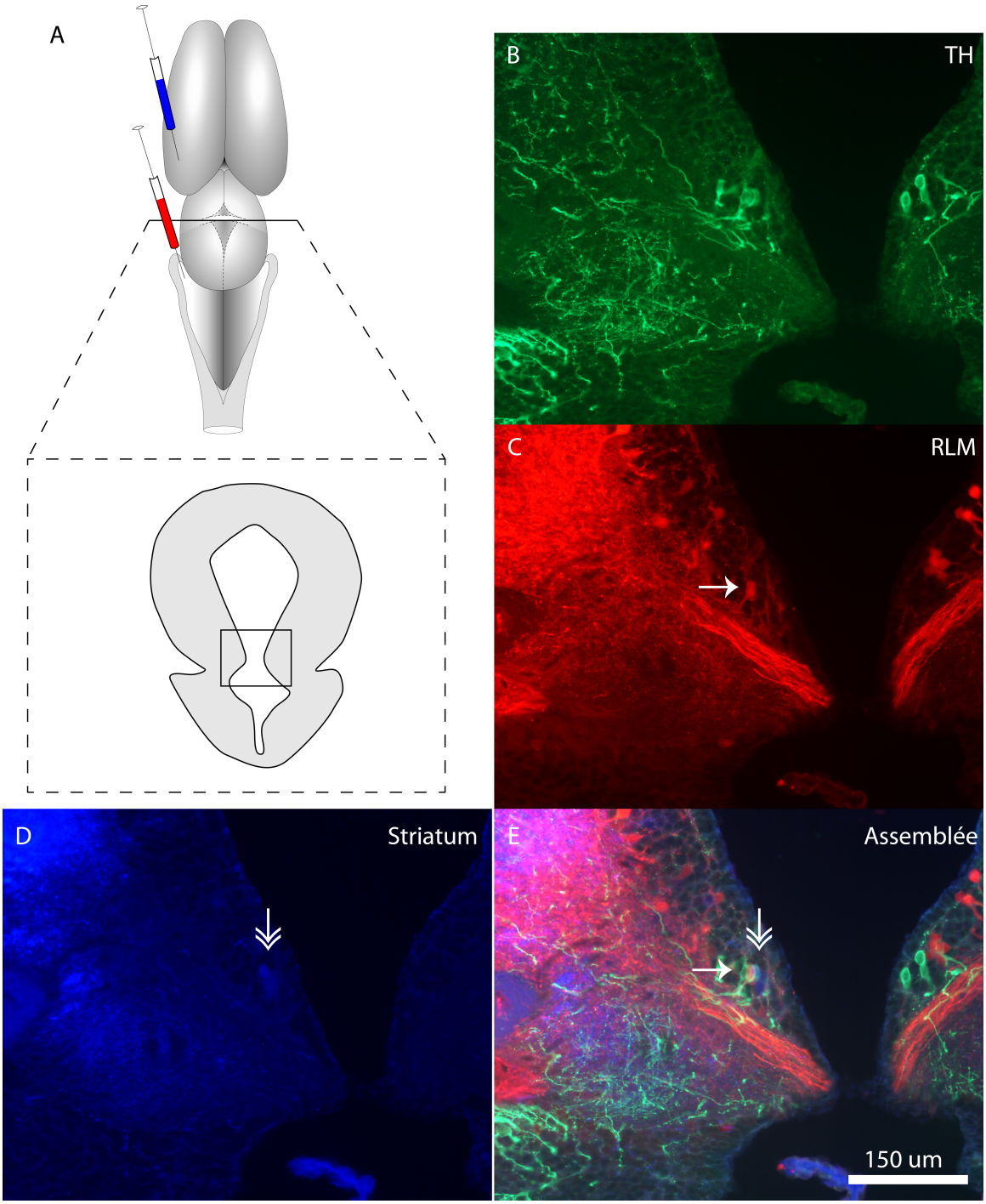

Figure 32

(Cf légende page suivante)

Figure 32

Schéma et photos d'une coupe transverse du cerveau de triton, *Notophthalmus viridescens,* au niveau du PT suite à une injection de traceur dans le striatum et dans la région locomotrice mésencéphalique montrant les cellules TH+ rétrogradement marquées à partir du striatum ou de la région locomotrice mésencéphalique. A) Schéma de l'endroit du cerveau de la lamproie où les photos ont été prélevées et le site d'injections du traceur dans le Str (seringue bleu) et dans la RLM (seringue rouge) avec un schéma de la coupe transverse où les photos ont été prises. B) Photo avec une exposition à des longueurs d'ondes permettant d'illustrer le vert (jeu de filtres pour FITC). De cette manière, il est possible de voir les corps cellulaires marqués par l'immunofluorescence de la TH. C) Photo avec une exposition à une longueur d'onde différente (jeu de filtres pour Texas Red) permettant d'illustrer le rouge et de ce fait les cellules marquées par l'injection de traceur dans la RLM. D) Photo avec une exposition à une longueur d'onde différente (jeu de filtres pour DAPI) permettant d'illustrer le bleu et de ce fait les cellules marquées par l'injection de traceur dans le Str. E) Superposition des photos B, C et D permettant ainsi d'observer les corps cellulaires doublement marqués, soit TH+ qui projettent au Str (identifié par une double flèche), soit TH+ qui projettent à la RLM (identifié par un flèche). Échelle: 150 µm

Aspects comparatifs.

Chez la lamproie, environ 10 fois plus de cellules du PT projetaient vers la RLM que vers le Str, tandis que chez le triton, environ 3 fois plus de cellules du PT projetaient vers la RLM que vers le Str.

En comparant le ratio du nombre de cellules TH+ du PT projetant vers le Str de la lamproie (1,7 ± 1,1% des cellules TH+ totales du PT) avec celui du triton (5,1± 1,7% des cellules TH+ totales du PT), on observait que le nombre de cellules TH+ du PT qui projetaient vers le Str était environ 5 fois plus élevé chez le triton que chez la lamproie.

Contrairement au triton, la lamproie n'avait pas de neurones DA+ dans le mésencéphale. Chez les deux espèces, des neurones DA+ mésodiencéphaliques projetaient vers le Str mais ils n'étaient pas situés au même endroit. Chez le triton, les cellules DA+ qui projetaient au Str étaient surtout dans le mésencéphale et ségrégées des cellules DA+ qui projetaient à la RLM (davantage diencéphaliques), alors que chez la lamproie, elles étaient dans le diencéphale caudal et entremêlées avec celles qui projetaient à la RLM.

De plus, les projections des cellules du PT vers le Str, chez le triton comme chez la lamproie, n'étaient qu'ipsilatérales à l'injection, tandis que pour les projections vers la RLM, chez le triton comme chez la lamproie, elles étaient ipsilatérales et contralatérales à l'injection.

Discussion

Le but de cette étude était double. D'abord, elle visait à démontrer l'existence d'une voie DA+ descendante du PT, région homologue à la SNc et à la VTA chez les mammifères (Pombal *et al.,* 1997b), vers la RLM chez un autre vertébré que la lamproie (où cette projection était déjà connue; Ryczko *et al*., 2013). Ensuite, l'étude visait à décrire la relation anatomique entre ces neurones DA+ et ceux dans la même région qui projettent aux GB.

Groupes de neurones DA+ mésodiencéphaliques chez la lamproie et le triton

Les résultats obtenus par la réaction d'immunohistochimie de la DA chez la lamproie au niveau du PT (Voir Annexe; Ryczko *et al*., 2013b) confirment très bien ceux de Pombal et ses collaborateurs (1997; Figure 9). En effet, deux groupes de cellules DA+ étaient illustrés dans la présente étude : un groupe de petites cellules DA en contact avec le liquide céphalo-rachidien dans la partie ventrolatérale du PT et un groupe de grosses cellules DA qui ne sont pas en contact avec le liquide céphalo-rachidien dans la partie dorsomédiane du PT.

En comparant l'immunohistochimie de la DA et celle de la TH, on remarque que les petites cellules DA+ en contact avec le liquide céphalo-rachidien dans la partie ventrolatérale du PT, étaient beaucoup plus nombreuses que les TH+ (Voir Annexe; Ryczko *et al.,* 2013b). Pour le groupe de cellules DA+ de la partie dorsomédiane du PT, le nombre de cellules TH+ et DA+ était le même.

Les résultats obtenus par immunohistochimie de la DA chez le triton sont comparables à ceux obtenus chez la salamandre par Gonzalez & Smeets (1991; Voir Figure 12). En effet, deux groupes de cellules DA étaient illustrés chez le triton. Le premier groupe de cellules DA était plutôt caudal et débutait au niveau du tegmentum mésencéphalique (Figure 18) et se poursuivait rostralement dans la partie dorsomédiane du PT (Figure 19). Le deuxième groupe de cellules DA était situé dans la partie ventrolatérale du PT (Figure 20). Cependant, il est important de mentionner que, différemment du triton, aucune cellule DA+ ou TH+ n'a été observée au niveau du mésencéphale chez la lamproie.

En comparant les cellules marquées par immunohistochimie de la DA et de la TH chez le triton, on constate que le nombre de cellules marquées est le même dans le groupe qui débute dans le tegmentum mésencéphalique et se poursuit dans la partie dorsomédiane du PT. Par contre, tout comme chez la lamproie, le groupe de cellules en contact avec le liquide céphalo-rachidien, de la partie ventrolatérale du PT, montrait un nombre de cellules marquées beaucoup plus faible avec une réaction d'immunohistochimie anti-TH qu'anti-DA. Cela serait bien expliqué, chez la lamproie et le triton, par une hypothèse proposée par Smeets & Steinbusch (1990). En effet, la DA serait capturée activement du liquide céphalo-rachidien, plutôt que synthétisée dans ces neurones, ce qui expliquerait le nombre beaucoup plus élevé de neurones marqués par l'immunohistochimie de la DA, que celle de la TH dans cette partie ventrolatérale du PT.

Des neurones DA+ qui n'étaient pas TH+ ont également été observés au niveau du mésencéphale chez les mammifères. En effet, ce phénomène a été

rapporté chez le rat au niveau de la VTA par Jerzemowska et ses collaborateurs (2012), et au niveau de la SNr par Stork et ses collaborateurs (1994). Ces deux études expliquent cependant leurs résultats par une hypothèse différente de celle de Smeets & Steinbusch (1990). En effet, Stork et ses collaborateurs (1994) croient que ces neurones ne produisent simplement pas assez d'enzyme TH pour être détectés. Il a été estimé, selon différentes études, que de tels neurones DA+ indétectable à la TH pourraient représenter de 2 jusqu'à 50% des neurones DA+ totaux de la substance noire (Bunney & Grace, 1978; Chiodo, 1988; Dai & Tepper, 1998).

Cette hypothèse pourrait aussi expliquer l'intensité du marquage plus faible avec l'immunohistochimie de la TH comparativement à celle de la DA. Cette faible intensité de marquage des neurones TH pourrait occasionner une sous-estimation du nombre de neurones TH et donc, du nombre de neurones TH marqués par transport rétrograde à partir de la RLM ou du Str.

En comparant les nombres de neurones DA+ de la région mésodiencéphalique de la lamproie (163,4 ± 62,4 cellules) et du triton (80,3 ± 23,3 cellules) on peut conclure que la lamproie contient plus de neurones DA+ que le triton, dans cette région. On aurait pu s'attendre intuitivement au contraire puisque les animaux plus complexes ont tendance à avoir plus de neurones en général, mais ça ne semble pas être le cas du triton.

On pourrait tenter d'expliquer cette différence par la néoténie du triton, c'est-à-dire qu'il conserverait des caractéristiques neurologiques juvéniles chez l'adulte. En effet, Gonzalez et ses collaborateurs (1994), suggèrent que la salamandre, une espèce qui se rapproche grandement du triton, soit une espèce

néoténique, Ils ont observé la présence de neurones TH+ au niveau du PT très tôt dans le développement de la salamandre. Ces neurones seraient donc conservés tel quel à l'âge adulte. La morphologie très rudimentaire de ces neurones TH+ (ronds pour la plupart et avec peu de cytoplasme) pourrait suggérer qu'ils atteignent la maturité fonctionnelle alors que leur morphologie est de type plus embryonnaire. Une morphologie semblable des neurones TH+ est également observée au niveau du PT chez le triton. Cela pourrait ainsi suggérer la néoténie présente également chez le triton, et donc expliquer le nombre plus petit de neurones DA+ au niveau du PT chez le triton comparativement à la lamproie.

Cette différence du nombre de cellules DA+ au niveau du PT entre la lamproie et le triton reste donc encore inexpliquée. Sachant qu'il puisse y avoir une sous-estimation du nombre de neurones TH+ détectés, il serait intéressant de comparer à nouveau le nombre de cellules DA+ par immunohistochimie pour la DA directement plutôt que pour la TH. Dans cette étude un test immunohistochimique contrôle de la DA a été effectué, mais les résultats immunohistochimique anti-DA n'ont pas été pris en compte dans le comptage des cellules DA+, il serait donc intéressant d'effectuer le comptage des cellules DA+ sur les coupes de cerveau avec ces animaux. Cette sous-estimation pourrait s'avérer être plus importante avec le triton qu'avec la lamproie, ce qui pourrait expliquer la différence du nombre de neurones TH+ entre les deux espèces. Ainsi d'autres expériences d'immunohistochimie pourraient permettre de confirmer les résultats obtenus dans notre étude pour la comparaison des neurones DA+ de la région mésodiencéphalique des deux espèces.

De plus, il est primordial de mentionner que les résultats rapportés par Ryczko et ses collaborateurs (2013b) montrent que deux injections faites simultanément dans des régions distinctes du cerveau n'affectent en aucun cas les résultats de l'une ou l'autre des injections.

Projections dopaminergiques du PT vers le Str chez la lamproie et le triton

Les résultats obtenus dans notre étude montrent des projections DA+ de la partie dorsomédiane du PT vers le Str chez la lamproie. Ces résultats confirment l'étude de Pombal et ses collaborateurs (1997b) qui a montré des projections DA+ de la partie ventrale et caudale du diencéphale (où se situe le PT) vers le Str. De plus, tout comme les résultats de notre présente étude, Pombal et ses collaborateurs (1997b) ont rapporté peu de cellules DA+ du PT qui projettent au Str. Ils ont observé un maximum de 7 cellules DA+ projetant au Str. Or, dans notre étude nous avons observé en moyenne 2,8 ± 2,2 cellules (ipsilatéral et contralatéral à l'injection faite au niveau du Str) TH+ projetant au Str, jusqu'à un maximum de 5 cellules sur le même animal. Pombal et ses collaborateurs (1997b) ont aussi utilisé des dextran amines afin d'effectuer leur marquage rétrograde à partir du Str. Par contre, ils ont utilisé un anti-sérum dirigé directement contre la DA plutôt que contre la TH. Les résultats de la présente étude obtenus par Pombal et ses collaborateurs (1997b) confirment qu'il n'y a pas beaucoup de neurones DA+ qui projettent au Str chez la lamproie. De plus, ces résultats mis ensemble montrent également que l'immunohistochimie anti-TH ou anti-DA dans l'étude des projections DA+ du PT au Str a peu d'influence sur les résultats du comptage cellulaire. L'intensité de

marquage de l'immunohistochimie anti-TH étant plus faible que l'anti-DA n'occasionne donc pas une sous-estimation du nombre de neurones TH marqués par des traceurs rétrogrades à partir du Str.

En comparant les injections faites dans le Str dans notre étude et dans celle de Pombal et ses collaborateurs (1997b), on remarque que celles de notre étude étaient situées plus rostralement que celles faites dans l'étude de Pombal et ses collaborateurs (1997b). Or, les fibres DA+ du PT projetteraient plus rostralement dans le Str que ce que Pombal et ses collaborateurs (1997b) ont pu rapporter. En effet, en faisant une injection plus rostrale, les fibres coupées étaient aussi nombreuses que si l'injection était faite de manière plus caudale, ce qui montrerait ainsi que les fibres coupées plus caudalement (comme dans l'étude de Pombal *et al.,* 1997b) seraient probablement les mêmes fibres coupées plus rostralement (comme dans la présente étude).

Les résultats obtenus chez le triton par marquage rétrograde à partir du Str ou du NAcc et par révélation de la TH, sont semblables à ceux observés chez la salamandre par Marín et ses collaborateurs (1997). En effet, des corps cellulaires DA+ qui projetaient au Str et au NAcc ont été observés au niveau de la région mésodiencéphalique. Tout comme pour la salamandre, le nombre de cellules DA+ de la région mésodiencéphalique qui projettent au NAcc est apparu plus important que le nombre de cellules qui projetaient au Str. En effet, lorsque l'injection était fait de manière plus ventrale soit dans le NAcc, le nombre de cellules DA+ marquées de manière rétrograde à partir du NAcc dans le PT était plus grand que lorsque l'injection était restreinte au Str exclusivement. Cela concorde avec les observations

chez d'autres espèces d'amphibiens par Gonzalez et ses collaborateurs (1994). En effet, ces auteurs ont montré qu'il y avait plus de neurones DA+ méso-diencéphaliques marqués à partir du NAcc par rapport au Str.

Or, des résultats obtenus chez des amphibiens (Thierry *et al.,* 1980; Gerfen *et al.,* 1987) ont montré que le Str, bien que ne recevant pas autant de projections DA+ de la région mésodiencéphalique que le NAcc, recevait d'autres projections non DA+. Ces projections non DA+ seraient beaucoup plus importantes dans le Str que dans le NAcc, marquant ainsi dans le PT autant de cellules projetant vers le NAcc ou vers le Str, ce sans considérer la nature de leurs neurotransmetteurs.

Il est important de noter que, selon la grosseur du site d'injection faite au niveau du Str (et NAcc) chez le triton, toutes les fibres provenant des cellules DA+ du PT n'étaient probablement pas marquées par l'injection. Ceci pourrait occasionner une sous-estimation du nombre de neurones DA+ de la région mésodiencéphalique qui projetaient au Str (et au NAcc).

Il est à noter que la technique de comptage utilisée dans cette présente étude n'est pas la technique de comptage la plus précise. En effet la technique de comptage décrite par Sterio (1984) tient compte de la forme, de la grosseur et de la largeur de chaque cellules et permet de cette manière un comptage beaucoup plus précis. Cependant, les plus grosses cellules à l'étude ici, sont entre 20 et 30 μm et l'épaisseur des coupes transverses est de 25 μm. Les cellules ne peuvent donc guère s'étirer sur plus de deux coupes. Le fait de compter les cellules qu'une coupe sur deux permet ainsi un comptage relativement précis pour ce genre d'étude.

Projections dopaminergiques du PT vers la RLM chez la lamproie et le triton

Les résultats obtenus dans cette étude montrent des projections DA+ de la partie dorsomédiane et ventrolatérale du PT vers la RLM, tout comme pour Ryczko et ses collaborateurs (2013b). Il est important de mentionner que la technique de marquage rétrograde utilisée dans la présente étude pourrait marquer des cellules qui projettent plus caudalement que la RLM. En effet, en coupant les fibres au niveau de la RLM, il était possible de couper également des fibres qui projetaient vers la moelle épinière, et donc de marquer des neurones collatérales au niveau du PT qui projetaient aussi vers la moelle épinière. Barreiro-Iglesias et ses collaborateurs (2008), ont identifié des neurones DA+ du diencéphale (récessus postérieur et noyau paratuberculaire) projetant à la moelle épinière chez la lamproie. Les neurones méso-diencéphaliques les plus rostraux que l'on marque après une injection dans la RLM chez la lamproie et le triton ressemblaient à ceux qui projetaient à la moelle épinière, identifiés par Barreiro-Iglesias et ses collaborateurs (2008). Ces projections vers la moelle épinière peuvent donc occasionner une sur-estimation du nombre de neurones qui projettent vers la RLM. Björklund & Skagerberg (1979), ont également montré des projections de neurones DA+ de la région mésodiencéphalique des noyaux DA+ A11 vers la moelle épinière chez le rat. Certains neurones de la région mésodiencéphalique les plus rostraux chez la lamproie pourraient être homologues au noyau DA+ A11 des mammifères, mais cela reste à démontrer. Il est important de mentionner que même si ces neurones existent, ils pourraient faire synapse à la fois dans la RLM et dans la moelle épinière. Il serait donc très intéressant par des études électrophysiologiques de vérifier si les

neurones DA+ projetant à la moelle épinière, lorsque stimulés, engendrent une activité également au niveau des cellules de la RLM.

Les résultats électrophysiologiques obtenus par Ryczko et ses collaborateurs (2013b) permettent d'affirmer qu'au moins une partie des projections DA+ descendantes observées dans cette étude font bel et bien contact dans la RLM, puisque la stimulation électrique du PT excitait les cellules de la RLM et que cette excitation pouvait être modifiée par des agonistes ou des antagonistes DA+ injectés au niveau de la RLM. De plus, les résultats de Ryczko et ses collaborateurs, (2013b) ont permis de démontrer que la stimulation du PT induisait une libération de DA dans la RLM.

Tout comme chez la lamproie, les neurones DA+ qui projettent vers la RLM chez le triton ont été identifiés dans deux groupes distincts: l'un au niveau de la partie dorsomédiane du PT et l'autre au niveau de la partie ventrolatérale du PT. On observe un nombre de cellules DA+ projetant à la RLM chez la lamproie (26,4 ± 13,7 cellules; 16,6 ± 6,1 %) beaucoup plus élevé que chez le triton (9,4 ± 3,5 cellules; 16,7 ± 6,6 %). Ce résultat n'est pas très surprenant puisqu'on observait un plus grand nombre de cellules DA+ dans le PT chez la lamproie comparativement au triton. Il est donc plus intéressant, et de ce fait même plus juste, de comparer le ratio des cellules DA+ qui projetaient à la RLM par rapport aux cellules DA+ totales au niveau du PT. En procédant ainsi, on observe des proportions similaires chez les deux espèces animales

Ryczko et ses collaborateurs (2013b) ont rapporté la juxtaposition des terminaisons des cellules TH+ provenant du PT avec les corps cellulaires

cholinergiques de la RLM. Sachant que les projections cholinergiques de la RLM vers la formation réticulée peuvent permettre la locomotion (Le Ray *et al*., 2003; Smetana *et al.,* 2010), cela permet de proposer que la voie DA+ descendante puisse directement moduler la sortie locomotrice.

Voies ascendante et descendante chez la lamproie et le triton

Chez la lamproie, le ratio des neurones DA+ de la région méso-diencéphalique projetant à la RLM est environ 10 fois plus important que celui qui projettent au Str. Selon nos observations, chez le triton, le ratio des neurones DA+ du PT qui projetaient à la RLM est environ 3 fois plus important que celui qui projetaient au Str. De plus, la proportion des neurones DA+ de la région méso-diencéphalique qui projetaient au Str est près de 5 fois plus élevée chez le triton (5,1 ± 1,7%) que chez la lamproie (1,7 ± 1,1%). Ces résultats suggèrent que le poids relatif des projections descendantes et ascendantes chez ces deux espèces est sensiblement différent. En effet, la projection descendante semble garder une importance assez stable au cours de l'évolution alors que la projection ascendante semble prendre de plus en plus d'ampleur. Grillner et ses collaborateurs, (2008) et Ericsson et ses collaborateurs (2011) ont rapporté que les circuits des GB (interactions entre différents noyaux, les propriétés cellulaires et synaptiques et les neurotransmetteurs) sont conservés de la lamproie jusqu'à l'humain. Grillner et ses collaborateurs (2013) ont aussi proposé que le rôle des circuits des GB est conservé tout au long de l'évolution, pour des activités locomotrices simples. Or, le passage de la vie aquatique à la vie terrestre chez le triton demande peut-être des afférences

plus importantes vers les GB. En effet, les activités locomotrices plus complexes observées chez le triton comparativement à la lamproie, pourraient expliquer pourquoi, selon la présente étude, le triton a 5 fois plus de projections DA+ du PT vers le Str.

Il a été démontré que l'utilisation des deux différents modes de locomotion chez le triton n'est pas influencée par les différentes voies neurologiques projetant à la RLM. En effet, Cabelguen et ses collaborateurs (2003) ont montré que les différents modes de locomotion sont engendrés par le degré d'intensité de la stimulation de la RLM. Le contrôle de l'intensité de la stimulation de la RLM, pour permettre différents modes de locomotion, serait donc peut être effectué au niveau des GB, puisqu'en effet les GB permettent de déterminer quel programme moteur doit être activé à un instant précis (Grillner *et al.,* 1997; 2008; Le Ray *et al*., 2011). Ceci expliquerait donc pourquoi la projection DA+ ascendante semble prendre de plus en plus d'ampleur au cours de l'évolution et pourquoi la voie DA+ descendante reste statique.

La voie DA+ descendante chez la lamproie, décrite par Ryczko et ses collaborateurs (2013b), se voit jouer un rôle important puisqu'elle potentialiserait l'activité locomotrice de la RLM. De ce fait, il serait très intéressant de reprendre les expériences électrophysiologiques (comme discuté plus tôt: stimulation électrique du PT, observation de l'activité de la RLM avec et sans antagonistes ou agonistes DA au niveau de la RLM) faites chez la lamproie dans l'étude de Ryzcko et ses collaborateurs (2013b) chez le triton afin de bien s'assurer que les fibres coupées qui ont permis le marquage rétrograde des cellules du PT dans notre étude sont

bien des projections vers la RLM et non vers d'autres régions plus caudales. De plus, ces expériences électrophysiologiques chez le triton, permettraient également de s'assurer du rôle de potentialisateur de l'activité locomotrice de la RLM, tout comme chez la lamproie.

D'autres observations importantes ont été faites dans la présente étude. Chez presque tous les spécimens de lamproie étudiés, un petit nombre des cellules DA+ méso-diencéphaliques (1 à 2 cellules par animal) projetaient à la fois au Str et à la RLM. Chez le triton, une seule cellule DA+ méso-diencéphalique projetant aux deux structures a été observée sur un total de 21 animaux. Cependant, il est important de se rappeler ici, que selon l'étendue couverte par l'injection a été faite au niveau du Str (et NAcc), la totalité des cellules n'était peut-être pas marquée au niveau du PT par le traçage rétrograde, et donc la possibilité d'identification d'une cellule qui projetait à la fois à la RLM et au Str est plus restreinte.

Ces cellules qui projettent à la fois à la RLM et au Str pourraient servir de réaction positive à l'une ou l'autre des structures, permettant ainsi de savoir quel signal a été envoyé soit à la RLM ou soit au Str et ainsi d'ajuster les autres signaux, de la RLM ou du Str, en conséquence. Par exemple, sachant que l'intensité de la stimulation de la RLM peut engendrer différents modes de locomotion chez le triton (Cabelguen *et al.,* (2003), une réaction positive de cette information au niveau des GB pourrait aussi permettre un ajustement du signal des GB, région qui a une très grande influence sur le contrôle moteur.

Conclusion

En conclusion, la voie DA+ descendante (du PT vers la RLM) a été observée chez le triton, tout comme chez la lamproie. L'importance de cette voie semble rester constante au cours de l'évolution, tandis que la voie DA+ ascendante (du PT vers le Str) semble prendre de l'ampleur. En effet, d'une espèce à l'autre (de la lamproie au triton, espèce plus complexe) le ratio de neurones DA+ du PT projetant à la RLM reste sensiblement le même, alors que le ratio de neurones DA+ du PT projetant au Str augmente. Il serait important de savoir si cette voie DA+ descendante est présente chez d'autres espèces plus complexes, comme les mammifères. Des études chez le rat présentées à la *Society of Neuroscience* (SfN) en 2013 (résumé: Ryczko *et al.,* 2013a) ont démontré l'existence de cette voie DA+ descendante. En effet, des stimulations électriques d'A10 engendrent la relâche de DA au niveau du PPN.

Tout comme l'ont mentionné Ryczko et ses collaborateurs (2013b), la présence de cette voie DA+ directe du complexe SNc/VTA à la RLM permettrait de mieux comprendre le rôle de la DA dans le contrôle moteur, dans des conditions normales ou pathologiques. Cette voie DA+ descendante directe pourrait être impliquée dans l'augmentation du comportement d'exploration suscitée par un nouveau stimulus (Schultz *et al.,* 1997, Ryczko *et al.,* 2013b). Cette voie pourrait également jouer un rôle dans les effets moteurs de drogues d'abus DA+, comme les effets hyperlocomoteurs des psychostimulants (Ryczko *et al.,* 2013b).

Une réduction du nombre de terminaisons DA+ a récemment été rapportée dans le PPN (noyau associé à la RLM chez les mammifères) de singes traités avec du 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP; Roland *et al*., 2009). Le MPTP est une molécule utilisée chez les mammifères qui affecte assez sélectivement les neurones DA+ méso-diencéphaliques et les détruit en grande partie (Lavoie & Parent, 1991). Ainsi, la diminution du nombre de terminaisons DA+ au niveau de la RLM chez le singe serait-elle en lien avec la diminution des neurones DA+ méso-diencéphaliques? Le singe présenterait-il lui aussi une voie DA+ descendante du complexe SNc/VTA vers la RLM?

Les effets du MPTP imitent les déficits moteurs observés dans la maladie de Parkinson (Javitch *et al.,* 1984). Chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, les neurones DA+ du complexe SNc/VTA dégénèrent en grande quantité, affectant ainsi les entrées ascendantes vers les GB, et peut-être, comme vu dans la présente étude, les entrées descendantes vers la RLM. Cette voie pourrait être une cible importante pour de futures recherches afin d'améliorer notre compréhension des déficits moteurs présents chez les patients atteints de la maladie de Parkinson.

Chez la lamproie, le MPTP induit aussi une réduction de la DA dans le prosencéphale et des déficits moteurs sévères, caractérisés par une diminution dans l'initiation et le maintien de l'activité motrice (Thompson *et al.,* 2008). Il serait donc très intéressant de déterminer la contribution relative de chacune des voies DA+ ascendante ou descendante d'une espèce moins complexe, comme la lamproie, à une espèce plus complexe, comme le singe. Pour ce faire, il serait intéressant de reproduire les expériences anatomiques de la présente étude chez le singe. D'une

part, en effectuant un marquage rétrograde à partir de la RLM et du Str au niveau de la SNc et de la VTA, permettant de comparer les ratios des voies DA+ ascendante et descendante. D'autre part, en reproduisant les expériences électrophysiologiques de l'étude de Ryczko et ses collaborateurs (2013b), afin d'observer les effets de la stimulation électrique de la SNc et/ou de la VTA au niveau de la RLM chez le singe, de voir les effets de cette même stimulation à la suite d'injections d'agonistes et d'antagoniste DA+ dans la RLM.

De plus, il serait très intéressant de comparer les résultats obtenus par suite de stimulations électriques de la RLM chez le singe avec ceux obtenus après l'administration de MPTP afin de voir si le MPTP atteint la même voie DA+. Il serait important de voir si l'ajout d'agonistes DA+ au niveau de la RLM, pourrait contrer les effets hypolocomoteurs du MPTP. Si cette même voie DA+ descendante (de la SNc/VTA vers la RLM) existe aussi chez le singe, tout comme chez la lamproie, ce serait très intéressant, puisqu'elle pourrait présenter une cible éventuelle afin de tenter de stabiliser les symptômes parkinsoniens dus à la dégénérescence des neurones DA+.

Plus nous en saurons sur ces projections chez les mammifères, plus nous serons en mesure de faire des homologies avec les différents groupes de neurones DA+ méso-diencéphalique que l'on retrouve chez la lamproie et le triton.

Un autre aspect qu'il serait important de prendre en considération au niveau des voies DA+ pouvant être affectées dans la maladie de Parkinson, est la possibilité d'une éventuelle voie DA+ directe du PT vers la RLD, sans passer via les GB. Tout comme pour la RLM, il serait intéressant de faire les mêmes expériences

anatomiques et physiologiques, chez la lamproie et/ou le triton avec la RLD, à savoir si elle aussi reçoit des projections directement du PT sans passer par l'intermédiaire des GB. Ménard & Grillner (2008) ont observé chez la lamproie des projections de la RLD directement vers la formation réticulée, tout comme pour la RLM. Ils ont testé sur une préparation semi-intacte de lamproie que la stimulation électrique de la RLD engendrait de la locomotion et que ce mouvement locomoteur était inhibé à l'ajout d'agonistes GABAergiques, tout comme pour la RLM. Ces résultats suggèrent alors que les entrées GABAergiques sur la RLD amènent une inhibition tonique continue, qui une fois levée pourrait permettre la locomotion. De plus, à la suite d'expériences de double-marquage immunohistochimique, ils ont observé que ces projections GABAergiques provenaient des GB, tout comme pour la RLM. Donc, en plus de savoir si la RLD reçoit directement des projections du PT, il serait important de savoir si ces projections sont DA+ et si elles jouent un rôle similaire à celles qui projettent à la RLM. Il est important de mentionner ici que la RLD est située rostralement au PT et serait ainsi tout de même une voie DA+ ascendante et non descendante comme celle observée avec la RLM.

Sources documentaires

Akaoka H, Charléty P, Saunier CF, Buda M, Chouvet G. (1992), *Inhibition Of Nigral Dopamine Neurons by systemic and Local Apomorphine: Possible Contribution of Dendritic Autoreceptors*. Neuroscience: Volume 49 pp. 879-891.

Alam M, Schwabe K, Krauss JK. (2011), *The Pedunculopontine Nucleus Area: Critical Evaluation of Interspecies Differences Relevant For its Use as a Target for Deep Brain Stimulation*. Brain Volume: 134 pp. 11-23.

Albin RL, Young AB, Penney JB. (1989), *The Functional Anatomy of Basal Ganglia Disorders.* Trends Neurosciences: Volume 12 pp. 366-375.

Amos A, Armstrong DM, Marple-Horvat DE. (1990), *Changes in The Discharge Patterns of Motor Cortical Neurones Associated With Volitional Changes in Stepping in the Cat.* Neuroscience Letters: Volume 109 pp. 107-112.

Antri M, Fénelon K, Dubuc R. (2009), *The Contribution of Synaptic Input to Subsained Depolarizations in Reticulospinal Neurons*. Journal of Neuroscience: Volume 29 pp. 1140-1151.

Arshavsky YI, Gelfand IM, Orlovsky GN, Pavlova GA. (1978), *Messages conveyed by spinocerebellar pathways during scratching in the cat. I. Activity of neurons of the lateral reticular nucleus.* Brain Research: Volume 151 pp. 479-491.

Asanome M, Matsuyama K, Mori S. (1998), *Augmentation of postural muscle tone induced by the stimulation of the descending fibers in the midline area of the cerebellar white matter in the acute decerebrate cat.* Neuroscience Research: Volume

30 pp. 257-269.

Aston-Jones G, Foote SL, Segal M. (1985), *Impulse conduction properties of noradrenergic locus coeruleus axons projecting to monkey cerebrocortex.* Neuroscience: Volume 15 pp. 765-777.

Barreiro-Iglesias A, Villar-Cervino V, Anadon R, Celina Rodicoco M. (2008), *Descending Brain-Spinal Cord Projections in a Primitive Vertebrate, the Lamprey: Cerebrospinal Fluid-Contacting and Dopaminergic Neurons.* The Journal of Comparative Neurology: Volume 511 pp. 711-723.

Baumgarten HG.(1972), *Biogenic monoamines in the cyclostome and lower vertebrate brain.* Progress in Histochemistry and Cytochemistry: Volume 4 pp. 1-90.

Beloozerova IN, Sirota MG. (1988), *Role of Motor Cortex in Control of Locomotion*. In: Gurfinkel VS, Ioffe ME, Massion J, Roll JP, editors. *Stance and Motion: Facts and Concepts.* Plenum Press: pp. 163-176.

Beloozerova IN, Sirota MG. (1993a), *The Role of The Motor Cortex in The Control Of Vigour of Locomotor Movements in The Cat*. Journal of Physiology: Volume 461 pp. 27-46.

Beloozerova IN, Sirota MG. (1993b), *The Role of The Motor Cortex in The Control of Accuracy of Locomotor Movements in The Cat.* Journal of Physiology: Volume 461 pp. 1-25.

Bernard JF, Peschanski M, Besson JM. (1989), *Afferents and Efferents of The Rat Cuneiformis Nucleus: An Anatomical Study With Reference to Pain Transmission*. Brain Research: Volume 490 pp. 181-185.

Björklund A, Skagerberg G. (1979), *Evidence for a major spinal cord projection from the diencephalic A11 dopamine cell group in the rat using transmitter-specific fluorescent retrograde tracing.* Brain Research: Volume 177 pp. 170-175.

Boisacq-Schepens N. (1998), *Motor control of gait*. Neurochirurgie: Volume 44 pp. 159-166.

Brocard F, Dubuc R. (2003), *Differential Contribution of Reticulospinal Cells to the Control of Locomotion Induced by the Mesencephalic Locomotor Region.* Journal of Neurophysiology: Volume 90 pp. 1714-1727.

Brocard F, Ryczko D, Fénelon K, Hatem R, Gonzales D, Auclair F, Dubuc R. (2010), *The Transformation of a Unilateral Locomotor Command Into a Symmetrical Bilateral Activation in The Brainstem*. Journal of Neuroscience: Volume 30 pp. 523-533.

Brodin L, Grillner S, Dubuc R, Ohta Y, Kasicki S, Hökfelt T. (1988), *Reticulospinal Neurons in Lamprey: Transmitters, Synaptic Interactions and Their Role During Locomotion.* Archives Italiennes de Biologie: Volume 126 pp. 317-345.

Buchanan JT, Cohen AH. (1982), *Activities of Identified Interneurons, Motoneurons, and Muscle Fibers During Fictive Swimming in The Lamprey and Effects of Reticulospinal and Dorsal Cell Stimulation.* Journal of Neurophysiology: Volume 47 pp. 948-960.

Buchanan JT, Brodin L, Hökfelt T, Van Dongen PA, Grillner S. (1987), *Survey of Neuropeptide-Like Immunoreactivity In the Lamprey Spinal Cord.* Brain Research: Volume 408 pp. 299-302.

Bunney BS, Grace AA. (1978), *Acute and chronic haloperidol treatment: comparison of effects on nigral dopaminergic cell activity.* Life Science: Volume 23 pp. 1715-1727.

Burguière E, Arabo A, Jarlier F, De Zeeuw CI, Rondi-Reig L. (2010), *Role of the cerebellar cortex in conditioned goal-directed behavior.* Journal of Neuroscience: Volume 30 pp. 13265-13271.

Bussières N, Dubuc R. (1992), *Phasic Modulation of Transmission From Vestibular Inputs to Reticulospinal Neurons During Fictive Locomotion in Lampreys.* Brain Research: Volume 582 pp. 147-153.

Bussières N. (1994), *Les systèmes descendants chez la lamproie. Etude anatomique et fonctionnelle* (PhD thesis). Université de Montreal.

Cabelguen JM, Bourcier-Lucas C, Dubuc R. (2003), *Bimodal Locomotion Elicited by Electrical Stimulation of The Midbrain in The Salamander Notophthalmus viridescens.* Journal of Neuroscience: Volume 23 pp. 2434-2439.

Capaday C. (2002), *The Special Nature of Human Walking and Its Neural Control.* Trends of Neurosciences: Volume 25 pp. 370-376.

Chiodo LA. (1988), *Dopamine-containing neurons in the mammalian central nervous system: electrophysiology and pharmacology.* Neuroscience and Biobehavioral Reviews: Volume 12 pp. 49-91.

Cohen AH, Wallén P. (1980), *The neuronal correlate of locomotion in fish. "Fictive swimming" induced in an in vitro preparation of the lamprey spinal cord.* Experimental Brain Research: Volume 41 pp. 11-18.

Corio M, Thibault J, Peute J. (1992), *Distribution of catecholaminergic and serotoninergic systems in forebrain and midbrain of the newt, Triturus alpestris (Urodela).* Cell Tissue Research: Volume 168 pp. 377-387.

Dai M, Tepper JM. (1998*), Do silent dopaminergic neurons exist in rat substantia nigra in vivo?* Neuroscience: Volume 85 pp. 1089-1099.

Davis GR Jr, McClellan AD. (1994), *Long distance axonal regeneration of identified lamprey reticulospinal neurons.* Experimental Neurology: Volume 127 pp. 94-105.

Deliagnina TG, Feldman AG, Gelfand IM, Orlovsky GN. (1975), *On the role of central program and afferent inflow in the control of scratching movements in the cat.* Brain Research: Volume 100 pp. 297-313.

Delvolvé I, Bem T, Cabelguen JM (1997), *Epaxial and Limb Muscle Activity During Swimming and Terrestrial Stepping in The Adult Newt, Pleurodeles waltl*. Journal of Neurophysiology: Volume 78 pp. 638-650.

Derjean D, Moussaddy A, Atallah E, St-Pierre M, Auclair F, Chang S, Ren X, Zielinski B, Dubuc R. (2010), *A Novel Neural Substrate for the Transformation of Olfactory Inputs Into Motor Output.* PLoS Biology: Volume 8 e1000567.

Dietz V, Colombo G, Jensen L, Baumgartner L. (1995), *Locomotor Capacity of Spinal Cord in Paraplegic Patients.* Annual Neurology: Volume 37 pp. 574-582.

Dobkin BH, Harkema S, Requejo P, Edgerton VR (1995), *Modulation of Locomotor-Like EMG Activity in Subjects With Complete and Incomplete Spinal Cord Injury.* Journal of Neurology Rehabilitation: Volume 9 pp. 183-190.

Drew T. (1988), *Motor cortical cell discharge during voluntary gait modification.* Brain Research: Volume 457 pp. 181-187.

Drew T. (1993), *Motor Cortical Activity During Voluntary Gait Modifications in the Cat. I. Cells Related to The Forelimbs.* Journal of Neurophysiology: Volume 70 pp. 179-199.

Drew T, Jiang W, Kably B, Lavoie S. (1996), *Role of the Motor Cortex in the Control of Visually Triggered Gait Modifications.* Journal of Physiological Pharmacology: Volume 74 pp. 426-442.

Drew T, Jiang W, Widajewicz W. (2002), *Contributions of the Motor Cortex to the Control of The Hindlimbs During Locomotion in the Cat*. Brain Research: Volume 40 pp. 178-191.

Drew T, Kalaska J, Krouchev N. (2008)*, Muscle Synergies During Locomotion in the Cat: a Model for Motor Cortex Control.* Journal of Physiology: Volume 586, pp. 1239-1245.

Dubuc R, Grillner S. (1989), *The Role of Spinal Cord Inputs in Modulating the Activity of Reticulospinal Neurons During Fictive Locomotion in The Lamprey*. Brain research: Volume 483 pp. 196-200.

Edwards SB. (1975), *Autoradiographic Studies of the Projections of The Midbrain Reticular Formation: Descending Projections of Nucleus Cuneiformis.* Journal of Comparative Neurology: Volume 161 pp. 341-358.

El Manira A., Pombal MA, Grillner S. (1997), *Diencephalic Projection to Reticulospinal Neurons Involved in the Initiation of Locomotion In Adult Lampreys*

Lampetra fluviatilis., The Journal of Comparative Neurology: Volume 389 pp. 603-616.

Emilien G, Maloteaux JM, Geurts M, Hoogenberg K, Cragg S. (1999), *Dopamine Receptors-Physiological Understanding to Therapeutic Intervention Potential.* Pharmacological & Therapeutics: Volume 84 pp. 133-156.

Ericsson J, Silberberg G, Robertson B, Wikstrom MA, Grillner S. (2011), *Striatal Cellular Properties Conserved From Lampreys to Mammals.* Journal of Physiology: Volume 589 pp. 2979-2992.

Ericsson J, Stephenson-Jones M, Pérez-Fernàndez J, Robertson B, Silberberg G, Grillner S. (2013), *Dopamine Differentially Modulates the Excitability of Striatal Neurons of the Direct and Indirect Pathways in Lamprey* The Journal of Neuroscience: Volume 33 pp. 8045-8054.

Fallon JH, Moore RY. (1978), *Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum.* Journal of Comparative Neurology: Volume 180 pp. 545-580.

Garcia-Rill E, Skinner RD, Fitzgerald JA. (1985), *Chemical Activation of the Mesencephalic Locomotor Region.* Brain Research: Volume 330 pp. 43-54.

Garcia-Rill E, Kinjo N, Atsuta Y, Ishikawa Y, Webber M, Skinner RD. (1990), *Posterior Midbrain-Induced Locomotion.* Brain Research Bulletin: Volume 24 pp. 499-508.

Gariépy JF, Missaghi K, Chartré S, Robert M, Auclair F, Dubuc R. (2012), *Bilateral connectivity in the brainstem respiratory networks of lampreys.* Journal of

Comparative Neurology: Volume 520 pp. 1442-1456.

Gerfen CR, Herkenham M, Thibault J. (1987), *The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems.* Journal of Neuroscience: Volume 7 pp. 3915-3934.

Gonzalez A, Smeets WJ. (1991), *Comparative analysis of dopamine and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the brain of two amphibians, the anuran Rana ridibunda and the urodele Pleurodeles waltlii.* Journal of Comparative Neurology: Volume 303 pp. 457-477.

Gonzalez A, Muñoz M, Muñoz A, Marin O, Smeets WJ. (1994), *On the Basal Ganglia of Amphibians: Dopaminergic Mesostriatal Projections*. European Journal of Morphology: Volume 32 pp. 271-274.

Grillner S. (1985), *Neurobiological Bases of Rhythmic Motor Acts in Vertebrates*. Science: Volume 228: pp. 143-149.

Grillner S, Deliagina T, Ekeberg O, El Manira A, Hill RH, Lansner A, Orlovsky GN, Wallén P. (1995), *Neural Networks That Coordinate Locomotion And Body Orientation in Lamprey.* Trends in Neuroscience: Volume 18 pp. 270-279.

Grillner S, Georgopoulos AP, Jordan LM. (1997), *Selection and Initiation of Motor Behavior. In*: Stein PSG, Grillner S, Selverston AI, StuartDG. Eds. Neurons, Networks, and Motor Behavior. The MIT Press pp. 3-19.

Grillner S, Parker D, El Manira A. (1998), *Vertebrate locomotion--a lamprey perspective.* Annual New York Academy of Sciences: Volume 860 pp. 1-18.

Grillner S. (2003), *The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks*. Nature Review Neurosciences: Volume 4 pp. 573-586.

Grillner S, Hellgren J, Ménard A, Saitoh K, Wikström M.A. (2005), *Mechanisms for Selection of Basic Motor Programs – Roles for the Striatum and Pallidum.* Trends of Neuroscience: Volume 28 pp. 364-370.

Grillner S, Wallén P, Saitoh K, Kozlov A, Robertson B. (2008), *Neural Bases of Goal-Directed Locomotion in Vertebrates—An overview.* Brain Research Reviews: Volume 57 pp. 2-12.

Grillner S, Robertson B, Stephenson-Jones M. (2013), *The Evolutionary Origin of the Vertebrate Basal Ganglia and Its Role in Action Selection.* The Journal of Physiology: Volume 591 pp. 5425-5431.

Hikosaka O.. (1991), *Basal Ganglia--Possible Role in Motor Coordination and Learning.* Current opinion in Neurology: Volume: 4 pp. 638-643.

Hikosaka O. (2007), *GABAergic Output of the Basal Ganglia.* Progress in Brain Research: Volume 160 pp. 209–226.

Holmes G. (1915), *The Goulstonian Lectures On Spinal Injuries Of Warfare: Delivered Before the Royal College of Physicians of London.* Brain Medical Journal: Volume 2 pp.815-821.

Hoover JE, Strick PL. (1993), *Multiple Output Channels in the Basal Ganglia.* Science: Volume 259 p. 819-821.

Illis LS. (1995), *Is there a central pattern generator in man?* Paraplegia: Volume 33 pp. 239-240.

Javitch JA, Uhl GR, Snyder SH. (1984), *Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: characterization and localization of receptor binding sites in rat and human brain.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA: Volume 91 pp. 4591-4595.

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.* Journal of Neurophysiology: Volume 97 pp. 162-167.

Jerzemowska G, Plucińska K, Kulikowski M, Trojniar W, Wrona D. (2012), *Locomotor response to novelty correlates with the number of midbrain tyrosine hydroxylase positive cells in rats.* Brain Research Bulletin: Volume 87 pp. 94-102.

Jordan LM. (1986), *Initiation of Locomotion From the Mammalian Brainstem. In: Grillner S, Stein PSG, Stuart DG, Forssberg H, Herman RM. Eds. Neurobiology of Vertebrate Locomotion.* London MacMillan: pp. 21-37.

Jordan LM. (1998), *Initiation of Locomotion in Mammals.* Annual NY Academy Science: Volume 860 pp. 83-93.

Jordan LM, Liu J, Hedlund PB, Akay T, Pearson KG. (2008), *Descending Command Systems For the Initiation of Locomotion in Mammals.* Brain Research Review: Volume 57 pp. 183-191.

Kebabian JW, Calne DB. (1979), *Multiple Receptors for Dopamine.* Nature: Volume 277 pp. 93-96.

Kitt CA, Brauth SE. (1986), *Telencephalic projections from midbrain and isthmal cell groups in the pigeon. I. Locus coeruleus and subcoeruleus.* Journal of Comparative Neurology: Volume 247 pp. 69-91.

Kuhn RA, Macht MB. (1949), *Some Manifestations of Reflex Activity in Spinal Man with Particular Reference to the Occurrence of Extensor Spasm.* Bulletin of Johns Hopkins Hospital: Volume 84 pp. 43-75.

Kumar S, Hedges SB. (1998), *A Molecular Timescale for Vertebrate Evolution.* Nature: Volume 392 pp. 917-920.

Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, Kraitzer AC. (2010), *Regulation of Parkinsonian Motor Behaviours by Optogenetic Control of Basal Ganglia Circuitry*. Nature: Volume 466 pp. 622-626.

Lalonde R, Strazielle C. (2007), *Brain Regions and Genes Affecting Postural Control.* Progress in Neurobiology: Volume 81 pp. 45-60.

Lavoie B, Parent A. (1991), *Dopaminergic neurons expressing calbindin in normal and parkinsonian monkeys.* Neuroreport: Volume 10 pp. 601-604.

Le Ray D, Brocard F, Bourcier-Lucas C, Auclair F, Lafaille P, Dubuc R. (2003), *Nicotinic Activation of Reticulospinal Cells Involved in The Control of Swimming in Lampreys*. European Journal of Neuroscience: Volume 17 pp. 137-148.

Le Ray D, Juvin L, Ryczko D, Dubuc R. (2011), *Supraspinal Control of Locomotion: The Mesencephalic Locomotor Region*. Progress in Brain Research: Volume 188 pp. 51-70.

Liddell EGT, Phillips CG. (1944), *Pyramidal Section in the Cat*. Brain: Volume 67 pp.1-9.

Marín O, Smeets W, Gonzalez A. (1997), *Basal Ganglia Organization in Amphibians: Catecholaminergic Innervation of the Striatum and the Nucleus Accumbens.* The Journal of Comparative Neurology: Volume 378 pp. 50-69.

Marple-Horvat DE, Amos AJ, Armstrong DM, Criado JM. (1993), *Changes in the Discharge Patterns of Cat Motor Cortex Neurons During Unexpected Perturbations of On-Going Locomotion.* Journal of Physiology: 462 pp. 87-113.

Martin JP. (1963), *Basal Ganglia and Locomotion.* Annals of the Royal College of Surgeon in England: Volume 32 pp. 219-239.

Matsuyama K, Mori F, Nakajima K, Drew T, Aoki M, Mori S. (2004), *Locomotor Role of the Corticoreticular-Reticulospinal-Spinal Interneuronal System.* Progress in Brain Research: Volume 143 pp. 239-249.

Ménard A, Auclair F, Bourcier-Lucas C, Grillner S, Dubuc R. (2007), *Descending GABAergic Projections to the Mesencephalic Locomotor Region in the Lamprey Petromyzon marinus*. The Journal of Comparative Neurology: Volume 501 pp. 260-273.

Ménard A, Grillner S. (2008), *Diencephalic locomotor region in the lamprey--afferents and efferent control*. Journal of Neurophysiology: Volume 100 pp. 1343-1353.

Mengod G, Martinez-Mir MI, Vilaró MT, Palacios JM. (1989), *Localization of the mRNA for the Dopamine D2 Receptor in the Rat Brain by in Situ Hybridization Histochemistry.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA: Volume 86 pp. 8560-8564.

Millhorn DE, Eldridge FL, Waldrop TG, Kiley JP. (1987), *Diencephalic regulation of respiration and arterial pressure during actual and fictive locomotion in cat.* Circulation Research: Volume 61 pp. 153-159.

Milner KL, Mogenson GJ. (1988), *Electrical and Chemical Activation of the Mesencephalic and Subthalamic Locomotor Regions in Freely Moving Rats.* Brain Research: Volume 452 pp. 273-285.

Mogenson GJ, Wu M, Manchanda SK. (1979), *Locomotor activity initiated by microinfusions of picrotoxin into the ventral tegmental area.* Brain Research: Volume 161 pp. 311-319.

Moore RY, Bloom FE. (1978), *Central Catecholamine Neuron Systems: Anatomy and Physiology of the Dopamine Systems*. Annual Review of Neuroscience: Volume 1 pp. 129-169.

Mori S, Matsui T, Kuze B, Asanome M, Nakajima K, Matsuyama K. (1999), *Stimulation of a restricted region in the midline cerebellar white matter evokes*

coordinated quadrupedal locomotion in the decerebrate cat. Journal of Neurophysiology: Volume 82 pp. 290-300.

Nielsen J. (2002), *Motoneuronal Drive During Human Walking.* Brain Research Review: Volume 40 pp. 192-201.

Nielsen J. (2003), *How we Walk: Central Control of Muscle Activity During Human Walking.* Neuroscientist: Volume 9 pp. 195-204.

Nieuwenhuys R. (1972), *Topological Analysis of the Brainstem of the Lamprey Lampetra fluviatilis.* Journal of Comparative Neurology: Volume 145 pp. 165-177.

Oades RD, Halliday GM. (1987), *Ventral Tegmental (A10) System: Neurobiology. 1. Anatomy and Connectivity.* Brain Research: Volume 434 pp. 117-165.

Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M. (2008), *Functional Organization of the Basal Ganglia: Therapeutic Implications for Parkinson's Disease*. Official Journal of Mouvement Disorders: Volume 23 pp. 548-559.

Ohta Y, Grillner S. (1989), *Monosynaptic Excitatory Amino Acid Transmission from the Posterior Rhombencephalic Reticular Nucleus to Spinal Neurons Involved in the Control of Locomotion in Lamprey*. Journal of Neurophysiology: Volume 62 pp. 1079-1089.

Olszewski J, Baxter D. (1954), *Cytoarchitecture of the Human Brainstem*. Philadelphia and Montreal: J.B. Lippincott Company: pp.199

Orlovsky GN, Severin FV., Shik ML. (1966), *Locomotion Induced by Stimulation of the Mesencephalon.* Doklady Akademi Nauk SSSR: Volume 169 pp. 1223-1226.

Orlovsky GN. (1970), *Relations between reticulo-spinal neurons and locomotor regions of the brain stem*. Biofizika: Volume 15 pp. 171-178.

Pahapill PA, Lozano AM. (2000), *The Pedunculopontine Nucleus and Parkinson's Disease.* Brain: Volume 123 pp. 1767-1783.

Parent A. (1986), *Comparative Neurology of the Basal Ganglia (Wiley Series in Neurobiology)*, Wiley –Interscience. pp.335.

Pierre-Simons J, Repérant J, Mahouche M, Ward R. *(2002), Development of Tyrosine Hydroxylase-Immunoreactive Systems in The Brain of the Larval Lamprey Lampetra Fluviatili.* Journal of Comparative Neurology: Volume 447 pp. 163-176.

Pombal MA, El Manira A, Grillner S. (1997a), *Organization of the Lamprey Striatum - Transmitters and Projections.* Brain Research: Volume 766 pp. 249-254.

Pombal M.A, El Manira A. and Grillner S. (1997b), *Afferents of the Lamprey Striatum With Special Reference to the Dopaminergic System: A Combined Tracing and Immunohistochemical Study.* The Journal of Comparative Neurology: Volume 386 pp. 71-91.

Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K. (1999), *The Basal Ganglia: a Vertebrate Solution to the Selection Problem?* Neuroscience: Volume 89 pp. 1009-1023.

Roberts A, Kahn JA, Soffe SR, Clarke JD. (1981), *Neural control of swimming in a vertebrate.* Science: Volume 213 pp. 1032-1034.

Robertson B, Huerta-Ocampo I, Ericsson J, Stephenson-Jones M, Pérez-Fernández J, Bolam JP, Diaz-Heijtz R, Grillner S (2012), *The Dopamine D2 Receptor Gene in Lamprey, its Expression in the Striatum and Cellular Effects of D2 Receptor Activation.* PLoS One: Volume 7: e35642.

Rolland AS, Tandé D, Herrero MT, Luquin MR, Vazquez-Claverie M, Karachi C, Hirsch EC, François C (2009), *Evidence for a Dopaminergic Innervation of the Pedunculopontine Nucleus in Monkeys, and its Drastic Reduction After MPTP Intoxication.* Journal of Neurochemistry: Volume 110 pp. 1321–1329.

Rovainen CM. (1974), *Synaptic Interactions of Reticulospinal Neurons and Nerve Cells in the Spinal Cord of the Sea Lamprey.* Journal of Comparative Neurology: Volume 154 pp. 207-223.

Rovainen CM. (1976), *Regeneration of Müller and Mauthner axons after spinal transection in larval lampreys.* Journal of Comparative Neurology: Volume 168 pp. 545-554.

Ryczko D, Dubuc R, Cabelguen JM. (2010), *Rhythmogenesis in axial locomotor networks: an interspecies comparison.* Progress in Brain Research: Volume 187 pp. 189-211.

Ryczko D, Dubé C, Alpert MH, Cone JJ, Auclair F, Roitman M, Alford S, Dubuc R. (2013a), *Conservation of the descending projections from forebrain dopamine neurons to a brainstem region controlling locomotion in vertebrates. Possible*

implications for Parkinson's disease. Society of Neuroscience: Neuroscience, 2013 (résumé d'une présentation orale).

Ryczko D, Dubuc R. (2013), *The Multifunctional Mesencephalic Locomotor Region.* Current Pharmaceutical Design: Volume 19 pp. 4448-4470.

Ryczko D, Grätsch S, Auclair F, Dubé C, Bergeron S, Alpert MH, Cone JJ, Roitman MF, Alford S, Dubuc R (2013b), *Forebrain dopamine neurons project down to a brainstem region controlling locomotion*. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America: Volume 110 pp.3235-3242.

Schultz W, Dayan P, Montague PR. (1997), *A Neural Substrate of Prediction and Reward.* Science: Volume 275 pp. 1593–1599.

Siemen M, Künzle H. (1994), *Connections of the basal telencephalic areas c and d in the turtle brain.* Anatomy and Embryology: Volume 189 pp. 339-359.

Sinnamon HM. (1993), *Preoptic and Hypothalamic Neurons and the Initiation of Locomotion in the Anesthetized Rat.* Progress in Neurobiology: Volume 41 pp. 323-333.

Sirota MG, Viana Di Prisco G, Dubuc R. (2000), *Stimulation of the Mesencephalic Locomotor Region Elicits Controlled Swimming in Semi-Intact Lampreys.* European Journal of Neuroscience: Volume 12 pp. 4081-4092.

Smeets WJ, Steinbusch HW. (1990), *New insights into the reptilian catecholaminergic systems as revealed by antibodies against the neurotransmitters and their synthetic enzymes.* Journal of Chemical Neuroanatomy: Volume 3 pp. 25-43.

Smetana R, Juvin L, Dubuc R, Alford S. (2010), *A Parallel Cholinergic Brainstem Pathway for Enhancing Locomotor Drive*. Nature Neuroscience: Volume 13 pp. 731-738.

Stecina K, Fedirchuk B, Hultborn H. (2013), *Information to cerebellum on spinal motor networks mediated by the dorsal spinocerebellar tract.* Journal of Physiology: Volume 591 pp 5433-5443.

Steeves JD, Jordan LM. (1984), *Autoradiographic Demonstration of the Projections From the Mesencephalic Locomotor Region*. Brain Research: Volume 307 pp. 263-276.

Stephenson-Jones, Samuelsson E, Ericsson J, Robertson B, Grillner S. (2011), *Evolutionary Conservation of the Basal Ganglia as a Common Vertebrate Mechanism for Action Selection* . Current Biology: Volume 21 pp. 1081-1091.

Stephenson-Jones, Ericsson J, Robertson B, Grillner S. (2012), *Evolution of the Basal Ganglia: Dual-Output Pathways Conserved Throughout Vertebrate Phylogeny.* The Journal of Comparative Neurology: Volume 520 pp. 2957-2973.

Sterio (1984), *The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the dissector.* Journal of Microscopy: Volume 134 pp.127-136

Sterman MB, FairchildMD. (1966), *Modification of Locomotor Performance by Reticular Formation and Basal Forebrain Stimulation in the Cat: Evidence for Reciprocal Systems.* Brain Research: Volume 2 pp. 205-217.

Stork O, Hashimoto T, Obata K. (1994), *Haloperidol activates tyrosine hydroxylase gene-expression in the rat substantia nigra, pars 152eticulate.* Brain

Research: Volume 633 pp. 213-222.

Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. (2007), *D1 and D2 Dopamine-Receptor Modulation of Striatal Glutamatergic Signaling in Striatal Medium Spiny Neurons.* Trends Neuroscience: Volume 30 pp. 228-235.

Swain GP, Snedeker JA, Ayers J, Selzer ME. (1993), *Cytoarchitecture of Spinal-Projecting Neurons in the Brain of the Larval Sea Lamprey.* Journal of Comparative Neurology: Volume 336 pp. 194-210.

Taber E. (1961), *The Cytoarchitecture of The Brainstem of the Cat. I. Brainstem Nuclei of Cat.* Journal of Comparative Neurology: Volume 116 pp. 27-69.

Takakusaki K, Ohta Y, Mori S. (1989), *Single Medullary Reticulospinal Neurons Exert Postsynaptic Inhibitory Effects via Inhibitory Interneurons Upon Alpha-Motoneurons Innervating Cat Hindlimb Muscles.* Experimental Brain Research: Volume 74 pp. 11-23.

Takakusaki K. (2003), *Function of Cortical Basal Nuclei: Pathophysiology of Parkinson's disease.* Nihon Seirigaku Zasshi: Volume 65 pp. 113-129.

Takakusaki K. (2008), *Forebrain Control of Locomotor Behaviors.* Brain research Review: Volume 57 pp. 192-198.

Thompson RH, Ménard A, Pombal M, Grillner S. (2008), *Forebrain Dopamine Depletion Impairs Motor Behavior in Lamprey.* European Journal Neuroscience: Volume 27 pp. 1452-1460.

Tennyson VM, Mytilineou C, Heikkila R, Barrett RE, Cohen G, Côté L, Duffy PE, Marco L. (1975), *Dopamine-containing neurons of the substantia nigra and their terminals in the neostriatum.* UCLA Forum Medical Science: Volume 18 pp. 227-264.

Thierry AM, Deniau JM, Herve D, Chevalier G. (1980), *Electrophysiological evidence for non-dopaminergic mesocortical and mesolimbic neurons in the rat.* Brain Research: Volume 201 pp. 210-214.

Vianna Di Prisco VG, Ohta Y, Bongianni F, Grillner S, Dubuc R. (1995), *Trigeminal Inputs to Reticulospinal Neurons in Lampreys are Mediated by Excitatory and Inhibitory Amino Acids*. Brain research: Volume 695 pp. 76-80.

Villar-Cerviño V, Barreiro-Iglesias A, Mazan S, Rodicio MC, Anadón R. (2011), *Glutamatergic neuronal populations in the forebrain of the sea lamprey, Petromyzon marinus: an in situ hybridization and immunocytochemical study.* Journal of Comparative Neurology: Volume 519 pp. 1712-1735.

Wannier T, Orlovsky G, Grillner S. (1995), *Reticulospinal neurones provide monosynaptic glycinergic inhibition of spinal neurones in lamprey.* Neuroreport: Volume 6 pp. 1597-1600.

Wannier T, Deliagina TG, Orlovsky GN, Grillner S. (1998), *Differential effects of the reticulospinal system on locomotion in lamprey.* Journal of Neurophysiology: Volume 80 pp. 103-112.

Watanabe K, Kawana E. (1982), *The Cells of Origin of the Incertofugal Projections to the Tectum, Thalamus, Tegmentum and Spinal Cord in the Rat: a Study Using the Autoradiographic and Horseradish Peroxidase Methods.* Neuroscience:

Volume 7 pp. 2389-2406.

Widajewicz W, Kably B, Drew T. (1994), *Motor Cortical Activity During Voluntary Gait Modifications in the Cat. II. Cells Related to the Hindlimbs.* Journal of Neurophysiology: Volume 72 pp. 2070-2089.

Yamamoto K, Vernier P. (2011), *The Evolution of dopamine Systems in Chordate.* Frontiers in Neuroanatomy: Volume 5 pp.21-75..

Zawilska JB. (2003), *Dopamine Receptors-Structure, Characterization and Function*. Postepy Higieny I Medycyny Doswialczalnej: Volume 57 pp. 293-322.

Annexes

Annexe I

FOREBRAIN DOPAMINE NEURONS PROJECT DOWN TO A BRAINSTEM REGION CONTROLLING LOCOMOTION

Ryczko D., Grätsch S., Auclair F., Dubé C., Bergeron S., Alpert MH., Cone JJ., Roitman MF., Alford S., Dubuc R.

Forebrain dopamine neurons project down to a brainstem region controlling locomotion

Dimitri Ryczko[a], Swantje Grätsch[a], François Auclair[a], Catherine Dubé[a], Saskia Bergeron[b], Michael H. Alpert[c], Jackson J. Cone[c], Mitchell F. Roitman[c], Simon Alford[c], and Réjean Dubuc[a,b,1]

[a]Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central, Département de Physiologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3C 3J7; [b]Groupe de Recherche en Activité Physique Adaptée, Département de Kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada H3C 3P8; and [c]Laboratory of Integrative Neuroscience, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60607

Edited by Sten Grillner, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, and approved June 28, 2013 (received for review January 18, 2013)

The contribution of dopamine (DA) to locomotor control is traditionally attributed to ascending dopaminergic projections from the substantia nigra pars compacta and the ventral tegmental area to the basal ganglia, which in turn project down to the mesencephalic locomotor region (MLR), a brainstem region controlling locomotion in vertebrates. However, a dopaminergic innervation of the pedunculopontine nucleus, considered part of the MLR, was recently identified in the monkey. The origin and role of this dopaminergic input are unknown. We addressed these questions in a basal vertebrate, the lamprey. Here we report a functional descending dopaminergic pathway from the posterior tuberculum (PT; homologous to the substantia nigra pars compacta and/or ventral tegmental area of mammals) to the MLR. By using triple labeling, we found that dopaminergic cells from the PT not only project an ascending pathway to the striatum, but send a descending projection to the MLR. In an isolated brain preparation, PT stimulation elicited excitatory synaptic inputs into patch-clamped MLR cells, accompanied by activity in reticulospinal cells. By using voltammetry coupled with electrophysiological recordings, we demonstrate that PT stimulation evoked DA release in the MLR, together with the activation of reticulospinal cells. In a semi-intact preparation, stimulation of the PT elicited reticulospinal activity together with locomotor movements. Microinjections of a D1 antagonist in the MLR decreased the locomotor output elicited by PT stimulation, whereas injection of DA had an opposite effect. It appears that this descending dopaminergic pathway has a modulatory role on MLR cells that are known to receive glutamatergic projections and promotes locomotor output.

motor system | Parkinson disease

Dopamine (DA) neurons of the substantia nigra pars compacta (SNc) and ventral tegmental area (VTA) modulate motor behaviors, including locomotion, through ascending projections to the basal ganglia, the output of which projects to the mesencephalic locomotor region (MLR) (1–3), a brainstem region known to control locomotion in all vertebrate species tested to date (reviewed in ref. 4). DA is known to control the excitability of striatal cells, and a dysfunction of the ascending DA pathway to the striatum is considered to be the main cause for the motor deficits in Parkinson disease (1). However, there have been hints of descending DA projections that would be in position to directly modulate the MLR and hence locomotor activity. In monkeys, DA terminals of unknown origin were observed in the pedunculopontine nucleus (PPN) (5), considered part of the MLR (reviewed in ref. 4). In addition, there is an axonal projection from the SNc to the PPN in rats, but the transmitter system is unknown (6).

We examined the DA system in a basal vertebrate, the lamprey, and found a previously unknown descending DA pathway from the posterior tuberculum (PT) to the MLR, which comprises the PPN and the laterodorsal tegmental nucleus (LDT) in lampreys (ref. 7; reviewed in ref. 4). In lampreys, the PT is considered homologous to the SNc and/or VTA of mammals because of its DA projection to the striatum (3). Further, we determined a role for this DA pathway in the control of locomotion.

Results

Descending DA Projections from the PT to the MLR. Immunofluorescence against tyrosine hydroxylase (TH) or against DA was used to visualize PT neurons containing DA. The distribution of TH and DA immunoreactive cell bodies and fibers were very similar in the PT and the MLR (Fig. S1 *A–F*). Fibers and varicosities positive for TH (n = 8 animals) or DA (n = 3 animals) were present throughout the LDT and the PPN (Fig. 1 *B* and *C* and Fig. S1 *A–C*), both considered parts of the MLR (ref. 7; reviewed in ref. 4). TH-positive terminals were found in close proximity to cholinergic MLR cell bodies and dendrites (Fig. 1 *A–D*) and in the vicinity of MLR cells traced from the middle rhombencephalic reticular nucleus (MRRN; n = 5 animals; Fig. 1 *E–G*). The location of tracer injection sites in the MRRN was verified by histologic examination (Fig. S2 *A* and *B*). As the MLR cholinergic projection to the reticular formation can initiate locomotion (7, 8), the juxtaposition of TH-positive terminals suggests that they are in position to directly modulate locomotor output.

We looked for the origin of this DA projection by using tracer injections in the MLR coupled with TH immunofluorescence. The MLR was considered to overlap largely with the cholinergic neuronal population of the isthmic region, with the conspicuous Müller cell I1 lying at the caudal limit as a landmark (detailed description provided in ref. 9). The PT refers to a region of the caudal diencephalon located ventral to the pretectum. The PT contains a prominent population of dopaminergic neurons, some of them projecting to the striatum, that are intensely labeled by

Significance

We found in lampreys that dopaminergic cells from the posterior tuberculum (homologue of the mammalian substantia nigra pars compacta and/or ventral tegmental area) not only send ascending projections to the striatum, but also have a direct descending projection to a brainstem region controlling locomotion—the mesencephalic locomotor region—where it releases dopamine (DA). DA increased locomotor output through a D1 receptor-dependent mechanism. The presence of this descending dopaminergic projection may have considerable implication for our understanding of the role of DA in motor control under physiological and pathological (i.e. Parkinson disease) conditions.

Author contributions: D.R., F.A., and R.D. designed research; D.R., S.G., F.A., C.D., S.B., M.H.A., J.J.C., M.F.R., S.A., and R.D. performed research; D.R., S.G., F.A., C.D., S.B., M.H.A., J.J.C., M.F.R., S.A., and R.D. analyzed data; and D.R., F.A., and R.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

[1]To whom correspondence should be addressed. E-mail: rejean.dubuc@gmail.com.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1301125110/-/DCSupplemental.

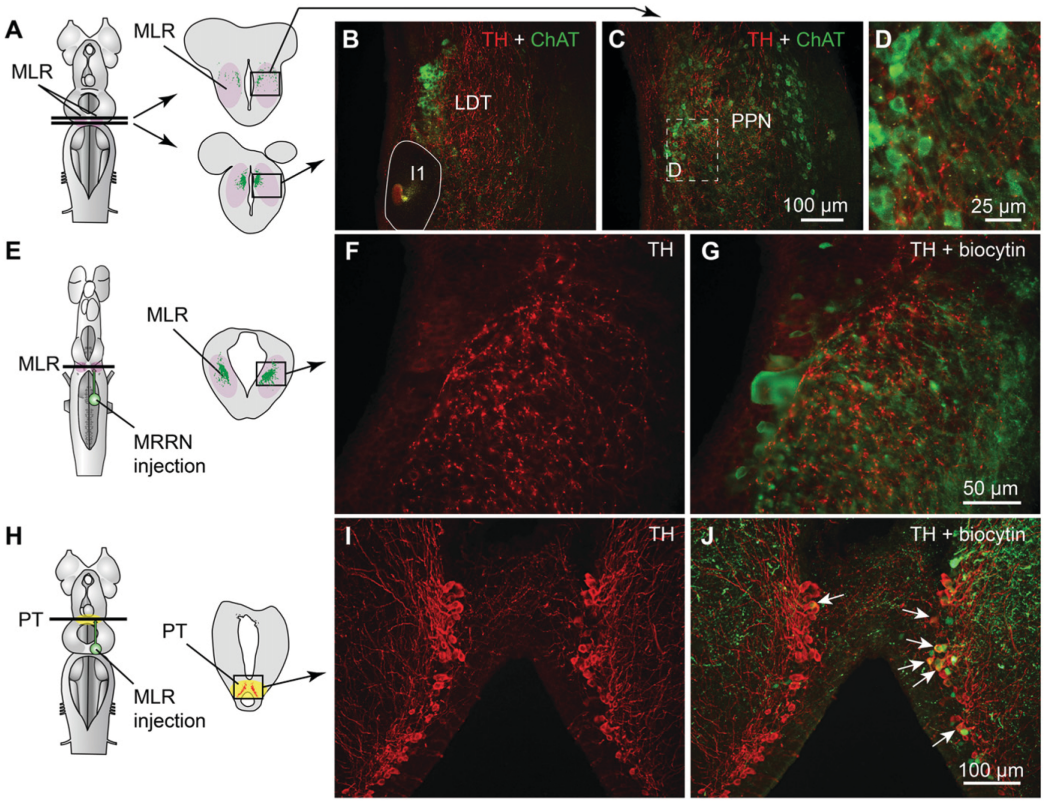

Fig. 1. Dopaminergic (DA) neurons of the PT send descending projections to the MLR. (*A–D*) TH (red)-containing fibers and varicosities in proximity with MLR cells positive for ChAT (green) in the LDT and the PPN in adult lampreys. The giant I1 reticulospinal cell is outlined in *B*. (*D*) Magnification of the dashed rectangle in *C*. (*E–G*) Fibers and varicosities immunoreactive to TH (red) surrounded the laterally oriented dendrites of MLR cells retrogradely labeled from an injection of the tracer biocytin (green) in the reticulospinal population of the MRRN in larval lampreys. (*H–J*) A unilateral injection of the tracer biocytin in the MLR (*H, Right,* green) followed by immunofluorescence against TH (*I,* red) revealed double-labeled cells in the PT (white arrows, *J*). The innervation of the MLR by TH-positive fibers was very similar in larval and adult lampreys.

TH immunofluorescence (3). The rostrocaudal extent of the population in spawning phase animals is around 500 µm, spreading approximately 100 to 300 µm from the midline (Fig. 1 *H–J*). The PT contained 189 ± 21 TH-positive cells (n = 12 animals). Many TH-positive cells of the PT were retrogradely labeled from MLR tracer injections (24 ± 3 cells, i.e., 15.4 ± 2.4%), largely on the ipsilateral side (2 ± 1 cells labeled contralaterally, i.e., 1.6 ± 0.6%; n = 6 animals; Fig. 1 *H–J*). Again, these results were confirmed by DA immunofluorescence (n = 3 preparations; Fig. S1 *G–I*). It is noteworthy that retrogradely labeled neurons were found only among the intensely labeled TH-positive population of the PT (outlined in Fig. S1 *E* and *F*), both in the dorsomedial portion that contains larger neurons and in the lateroventral portion that contains smaller neurons. No labeled cells were found in the periventricular TH (and DA) neuron population of the mammillary area, or in any other TH-positive cell population of the brain and spinal cord. By using triple labeling, we found that DA cells in the PT projecting to the striatum were intermingled with those projecting to the MLR (n = 4 preparations; Fig. 2). In all cases, occasional TH-positive neurons of the PT (n = 1–2 cells) were found to project to the MLR and the striatum (Fig. 2*E*). Overall in the PT, TH-positive neurons with descending projections to the MLR (n = 16–52 cells) were, on average, 11 ± 2 times more numerous than those with ascending projections to the striatum (n = 1–5 cells; n = 4 animals).

Activation of the Locomotor System by Stimulation of the PT. Physiological experiments were carried out to examine the role of this descending DA projection in motor control. For this purpose, a semi-intact preparation was used in which the activity of reticulospinal cells is recorded intracellularly while the body freely swims in the chamber. Trains of stimuli applied to the PT (10-s train, 4–5 Hz, 4–30 µA, 2-ms pulses) elicited reticulospinal cell discharges and swimming (n = 13 preparations; Fig. 3 *A–E*). The location of the stimulation sites was confirmed by histologic examination (Fig. 3*D*). Chemical stimulation of the PT with local microinjections of 3.0 to 8.0 pmol of D-glutamate (5 mM, 17–43 pulses of 20 ms, 0.6–1.6 nL per microinjection) into the site used for electrical stimulation, was confirmed to elicit locomotion and reticulospinal discharges in one preparation. This is consistent with previous observations that electrical or chemical stimulation

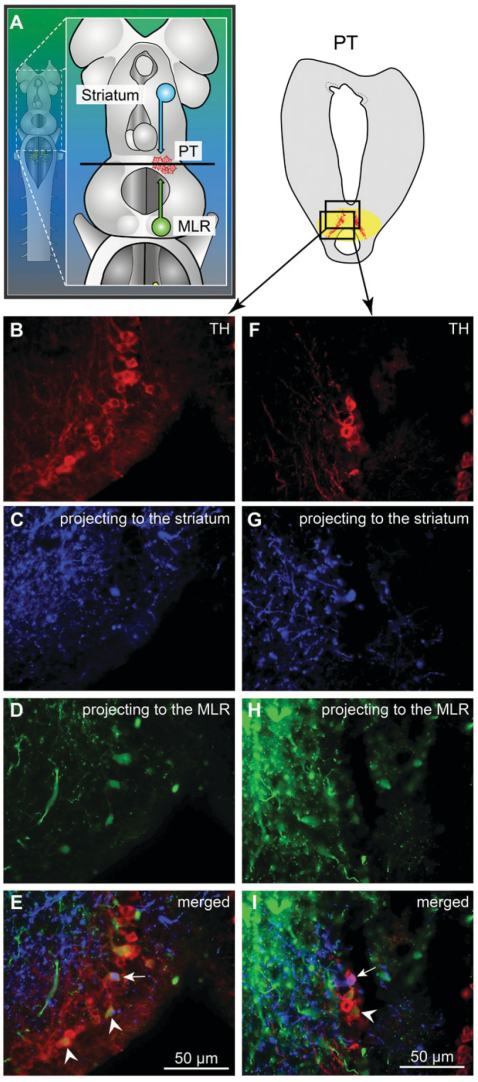

Fig. 2. TH-positive cells projecting to the striatum or to the MLR are intermingled in the PT as shown in triple-labeling experiments. (*A*) Dorsal view of a lamprey brain showing the injection sites of the tracers in the MLR (green) and in the striatum (blue). (*B–E* and *F–I*) Photomicrographs of two examples of transverse sections in the PT at the level indicated on the diagram in *A*. (*Top Right*) Diagram illustrates a cross-section at the level of the PT with the approximate location of the photomicrographic frames shown in *B–I*. DA cells of the PT were labeled with immunofluorescence against TH (red, *A, B,* and *F*). Some cells of the PT were retrogradely labeled by a unilateral injection of one tracer in the striatum (blue, *A, C,* and *G*). Some cells of the PT were retrogradely labeled by another tracer injection, this time in the MLR (green, *A, D,* and *H*). (*E*) The photomicrographs from *B–D* were merged to show the three markers. White arrowheads indicate some examples of TH-positive cells of the PT that project to the MLR, whereas the white arrow points to a TH-positive cell projecting to the MLR and the striatum. (*I*) The photomicrographs from *F–H* were merged. The white arrowhead indicates a PT cell projecting to the MLR and containing TH. The white arrow points to a cell that projects to the striatum and contains TH.

with D-glutamate of this region initiates locomotion (10, 11). By using targeted whole-cell patch clamp recordings in an isolated brain preparation (*Materials and Methods*), we found that trains of stimuli (10-s train, 4–5 Hz, 10–35 μA, 2-ms pulses) to the PT (Fig. S2 *G* and *H*) directly activate MLR cells projecting to reticulospinal neurons (n = 6 cells from six preparations; Fig. 3 *F–I*). When comparing simultaneous recordings from an MLR cell and reticulospinal cells (extracellular), we found a very similar activation following trains of stimuli to the PT (Fig. 3*H*). Single stimuli to the PT evoked short-latency, large excitatory postsynaptic currents in whole-cell patch recorded MLR cells (Fig. 3*I*). Glutamatergic receptors are involved in these responses, as previously demonstrated (10), and the DA input from PT to the MLR could modulate this glutamatergic excitatory connection. The rest of our study was aimed at examining this possibility.

Stimulation of the PT Evokes DA Release in the MLR. Fast-scanning cyclic voltammetry (12) was used to measure changes in DA concentration in the MLR while stimulating the PT (Fig. 4). The location of the recording site was confirmed to be within the MLR (Fig. S2 *J* and *K*). A reticulospinal neuron was recorded intracellularly to monitor locomotor network activation. Trains of stimuli (10-s train, 5 Hz, 14–25 μA, 2-ms pulses) in the PT (Fig. S2 *G* and *I*) elicited a large increase in DA concentration in the MLR (n = 6 preparations; Fig. 4 *A–C*). We found a strong positive correlation between the increase in DA concentration in the MLR elicited by PT stimulation and the increase in the number of spikes per unit time in reticulospinal cells recorded during the same trials (R = 0.91; P < 0.001; n = 30 stimulations in six preparations; Fig. 4 *D* and *E*). DA release in the MLR was also evoked together with reticulospinal spiking activity when chemically activating the PT with local microinjections of 60.5 pmol of D-glutamate (5 mM, 10 pulses of 100 ms, 12.1 nL per microinjection; n = 20 stimulations in four preparations; Fig. S3). These data demonstrate that PT activation results in DA release in the MLR and suggest that DA release may contribute to locomotor output.

Blockade of the DA Inputs to the MLR Decreases Locomotor Output. We then tested whether DA had an effect on the locomotor output elicited by PT stimulation (10-s train, 5 Hz, 12–30 μA, 2-ms pulses). Bath-applying DA (10 μM) onto the brain induced a 25% decrease in the PT stimulation intensity threshold required to elicit locomotion in two of three semi-intact preparations [reduction from 16 to 12 μA in both cases (Fig. S4 *A–C*); 20 μA in the remaining preparation in which no effect was observed]. For PT stimulation intensities above locomotor threshold (16–30 μA), bath-applied DA increased locomotor bout duration (+86.8 ± 18.4%; P < 0.001 vs. control), the number of locomotor cycles (+102.6 ± 23.8%; P < 0.001), and locomotor frequency (+25.8 ± 9.1%; P < 0.01; pooled data from three preparations, 18 bouts, and six intensities per preparation; Fig. S4 *D–F*). These effects were reduced after DA washout (P < 0.05 or P < 0.001 vs. DA). Bath-applied DA also increased the number of reticulospinal spikes (+72.4 ± 17.9%; P < 0.001 vs. control) and the duration of spiking activity (+58.4 ± 14.7%; P < 0.001 vs. control). These increases were also reversed after approximately 1 h of DA washout (P < 0.01 vs. DA in both cases).

Next, we determined that DA has a direct excitatory effect on the MLR. Microinjections of 1.0 to 7.0 pmol of DA (5 mM, n = 5–38 pulses of 20 ms, 0.2–1.4 nL per microinjection) in the MLR

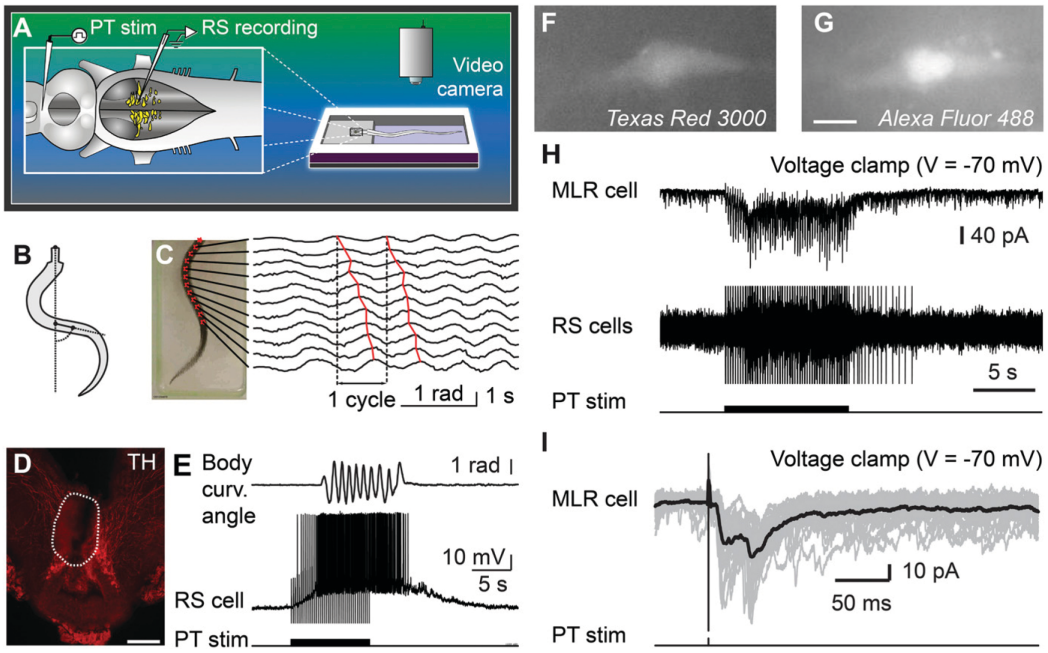

Fig. 3. Stimulation of the PT activates brainstem locomotor circuits. (*A–E*) In a semi-intact preparation, the PT was stimulated and the reticulospinal (RS) cells were recorded together with locomotor movements. (*B* and *C*) Body curvature oscillations during locomotion. (*C*) PT stimulation (10-s train, 5 Hz, 11 μA, 2-ms pulses) elicited swimming as illustrated by the rostrocaudal mechanical wave. (*D*) The PT stimulation site was confirmed histologically by an electrolytic lesion (enclosed by white dashed line) that colocalized with TH-immunoreactive neurons (red). (Scale bar: 200 μm.) (*E*) PT stimulation elicited reticulospinal activity together with swimming. Stimulation artifacts were clipped. (*F–I*) Whole-cell patch-clamp recordings of MLR neurons retrogradely labeled from an injection of dextran amines conjugated to Texas red (MW, 3,000 Da) in the MRRN. (*F* and *G*) MLR neuron labeled by the Texas red–dextran amine injection in the MRRN and by the fluorescent marker added to the patch pipette solution (Alexa Fluor 488 hydrazide). (Scale bar: 10 μm.) (*H*) Trains of stimuli (10-s train, 5 Hz, 7 μA, 2-ms pulses) activated the whole-cell patch-clamped MLR neuron concomitantly with reticulospinal neurons, which were used to monitor locomotor activation. Action potentials were recorded extracellularly from reticulospinal neurons of the MRRN, and stimulation artifacts were clipped. (*I*) Single pulse PT stimulation (0.1 Hz, 7 μA, 2-ms pulses) elicited short-latency excitatory postsynaptic currents in MLR neurons. (*H* and *I*) Data from two different animals.

(as confirmed by histologic examination; Fig. S2 *J* and *L*) increased the locomotor output elicited by trains of electrical stimulation (10-s train, 5 Hz, 4–7 μA, 2-ms pulses) in the PT (Fig. 3*D*) in a semi-intact preparation (n = 25 injections in five preparations; Fig. 5 *A–C*). DA microinjections prolonged the locomotor bout duration (+56.7 ± 14.3%; $P < 0.001$) and increased the number of locomotor cycles (+50.8 ± 12.3%; $P < 0.001$). These effects were reversed after DA washout ($P < 0.05$ vs. injection in both cases; Fig. 5*C*). DA injections in the MLR also increased the duration of reticulospinal cell spiking activity (+33.6 ± 11.8%; $P < 0.01$). This effect was reversed after approximately 1 h of washout ($P < 0.01$; Fig. 5*C*). The effects on locomotor threshold were not measured in these experiments. The excitatory effect of DA microinjections in the MLR was lower than that of bath-applied DA, probably because of the single site of action of DA during local microinjections. For instance, local DA microinjections in the MLR did not significantly modify the locomotor frequency that remained at 95.2 ± 3.0% of control ($P > 0.05$), or the number of reticulospinal spikes that remained at 119.5 ± 11.1% of control ($P > 0.05$).

D1 receptor activation is known to have excitatory effects on striatal cells in mammals (reviewed in ref. 13). Those receptors are also present in lampreys (14, 15). Targeted blocking of D1 receptors in the MLR (Fig. S2 *J* and *L*) dramatically decreased the locomotor output elicited by stimulation of the PT (10-s train, 5 Hz, 7–11 μA, 2-ms pulses; Fig. 3*D*). Local microinjection of 0.1 to 0.8 pmol of the D1 antagonist SCH 23390 (500 μM, 6–43 pulses of 20 ms, 0.2–1.6 nL per microinjection) in the MLR (n = 25 injections in five preparations; Fig. 5 *D–F*) decreased the duration of locomotor bouts (−48.4 ± 10.6%; $P < 0.001$ vs. control), locomotor frequency (−32.2 ± 6.3%; $P < 0.001$), and the number of locomotor cycles (−60.0 ± 9.9%; $P < 0.001$). These decreases in locomotor output were reversed after washout (for all parameters, $P < 0.001$ vs. injection; Fig. 5*F*). Blocking D1 receptors in the MLR also decreased the duration of spiking activity in reticulospinal neurons (−43.8 ± 9.4%; $P < 0.001$ vs. control), their discharge frequency (−30.8 ± 9.9%; $P < 0.01$), and their number of spikes (−41.6 ± 11.9%; $P < 0.001$). Recovery was obtained after approximately 1 h of washout ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ vs. injection; Fig. 5*F*).

Discussion

Newly Identified Descending DA Pathway. In this study, we provide evidence for a descending DA projection from the PT to the MLR that modulates motor output. This descending DA pathway supports DA release, which increases locomotor output, and D1 receptors are involved in this excitatory effect. It appears that this descending DA pathway amplifies the previously known excitatory glutamatergic inputs to MLR cells (10). Such a descending DA projection is also very likely to be present in

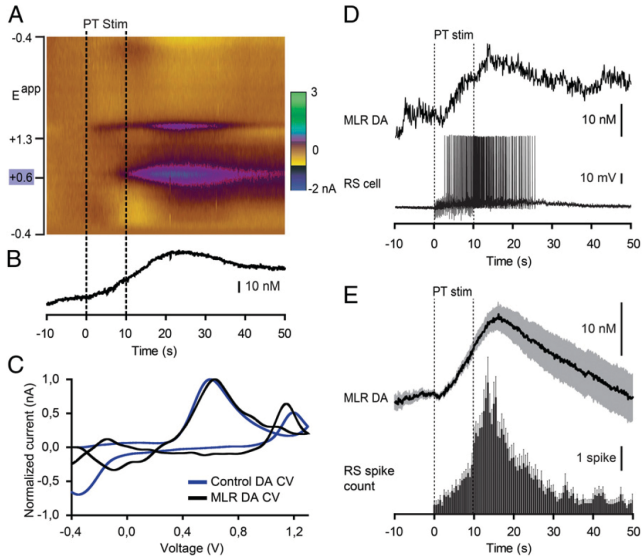

Fig. 4. Stimulation of the PT evokes DA release in the MLR together with reticulospinal (RS) activity. (*A*) DA release evoked by PT stimulation (PT Stim, 10-s train, 5 Hz, 15 μA, 2-ms pulses) in an isolated brain preparation (stimulation period = 0–10 s). The color plot depicts current changes (in color) across the applied voltages (E^{app}; i.e., ordinate) over time (i.e., abscissa). DA is identified by its oxidation peak (~0.6 V) that appears during PT stimulation. (*B*) Changes in DA concentration in the MLR extracted from *A*. (*C*) Plots of normalized current vs. voltage. The DA electrochemical signal (cyclic voltammogram; CV) recorded from the MLR in *A* (black) is similar ($R = 0.82$, $P < 0.001$) to that measured from a 1-μM control DA solution (blue) bath-applied following the experiment, thus confirming DA detection. (*D*) The DA release in the MLR elicited by PT stimulation was positively correlated with the number of spikes evoked in reticulospinal cells. (*E*) Changes in DA concentration plotted vs. the number of reticulospinal spikes per unit time (bin represents 500 ms) in the same trials ($n = 30$ stimulations from six preparations). Mean ± SEM are illustrated.

mammals, although not yet described. For instance, there is a projection from the SNc to the PPN in rats (6), and DA terminals are present in the PPN in monkeys (5). We now confirm in lampreys that DA neurons in the PT project to the striatum as previously described (3). This supports the idea that the lamprey PT is homologous to the SNc and/or VTA of other vertebrates, including other fishes (16, 17), amphibians (18), birds and mammals (reviewed in ref. 19), and humans (20). Moreover, a recent series of studies demonstrated in detail that the basic organization of the basal ganglia, which are target structures of the PT, have physiological and anatomical features that are very similar to those of birds and mammals (refs. 2, 15, 21–25; reviewed in ref. 26). These interesting studies demonstrated that forebrain structures are highly conserved in vertebrates. Therefore, ascending and descending projections of DA cells of the SNc and/or VTA are very likely to have been conserved in vertebrates.

Functional Significance. The presence of a direct DA pathway from SNc/VTA to the MLR may have significant implications for our understanding of the role of DA in motor control under normal and pathological conditions. For instance, DA inputs to the MLR could be involved in the increased exploratory behavior elicited by a novel stimulus, to which a large part of DA neurons are known to respond (reviewed in ref. 27). This pathway could also play a role in the well-documented locomotor effects of the DA drugs of abuse (e.g., hyperlocomotor effects of psychostimulants). In patients with Parkinson disease, DA neurons from the SNc/VTA undergo degeneration, which affects their ascending inputs to the basal ganglia. The descending DA projection we now describe should also be affected and play a role in the locomotor deficits. Interestingly, a depletion of DA terminals was recently shown in the PPN of monkeys treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (5), a molecule that has been used extensively in mammals to mimic the motor deficits observed in Parkinson disease. Interestingly, forebrain DA depletion in lampreys injected with MPTP is also associated with severe locomotor deficits, characterized by a decrease in the initiation and maintenance of locomotor activity (28). The locomotor deficits in these pathological conditions may involve, at least in part, the loss of the excitatory DA input to the MLR we describe here. Taken together, these observations suggest that the descending DA projection we report here is conserved across vertebrates and is compromised by the death of DA cells in the SNc/VTA. As such, our results thus provide insights into the role of DA cells of the SNc/VTA in locomotor control.

Materials and Methods

All procedures conformed to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, and were approved by the animal care and use committee of the Université de Montréal, the Université du Québec à Montréal, and the University of Illinois at Chicago. Care was taken to minimize the number of animals used and their suffering.

Animals. Experiments were performed on 33 larval, 5 newly transformed, and 17 spawning-phase sea lampreys (*Petromyzon marinus*). Larval and newly transformed animals were collected in the wild from the Morpion stream (Québec, Canada) or the Pike River (Québec, Canada), or purchased from ACME Lamprey. Spawning-phase lampreys were captured during their spring run in the Great Chazy river (New York) and given to us by the US Fish and Wildlife Service of Vermont. The animals were kept in aerated water at 5 °C.

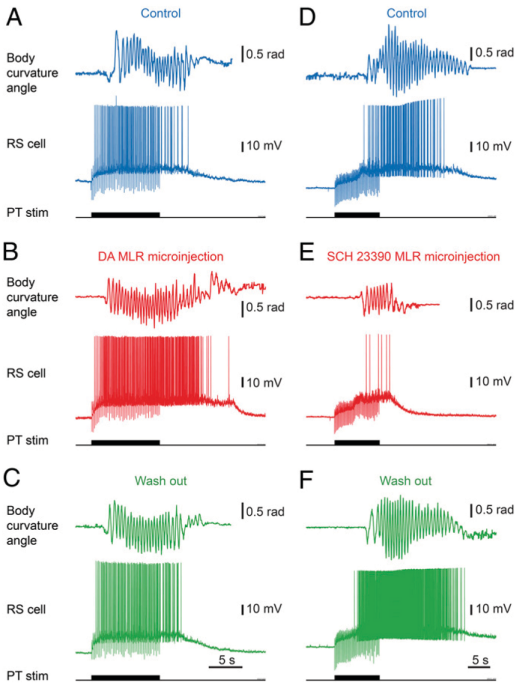

Fig. 5. The descending dopaminergic (DA) projection from the PT to the MLR controls locomotion. DA or the D1 antagonist SCH 23390 was microinjected in the MLR with a Picospritzer in a semi-intact preparation. (*A*–*C*) Microinjection of DA (5 mM; *Materials and Methods*) in the MLR increased the locomotor and reticulospinal (RS) activities elicited by PT stimulation (10-s train, 5 Hz, 6 μA, 2-ms pulses). (*D*–*F*) Microinjection of the D1 antagonist SCH 23390 (500 μM; *Materials and Methods*) in the MLR decreased the locomotor output elicited by PT stimulation (10-s train, 5 Hz, 11 μA, 2-ms pulses). In both cases, the locomotor response and the corresponding reticulospinal activity are illustrated. Blue indicates control condition, red indicates microinjection of DA compounds in the MLR, and green indicates washout.

Surgical Procedures. The animals were anesthetized with tricaine methanesulfonate (MS 222; 100 mg/L) and then transferred in a cold oxygenated Ringer solution (8–10 °C, 100% O_2) of the following composition (in millimolar): 130 NaCl, 2.1 KCl, 2.6 $CaCl_2$, 1.8 $MgCl_2$, 4 Hepes, 4 dextrose, and 1 $NaHCO_3$ (pH 7.4). For anatomical experiments, the whole brain was then isolated in vitro and injected with anatomical tracers as described later. A total of 5 larval and 17 spawning-phase animals were used for the anatomical experiments.

Anatomical Tracing. Biocytin was used for retrograde tracing experiments. In the case of double labeling, biocytin and Texas red–dextran amines were used. For both tracers, the injection site was first lesioned with a pulled glass micropipette. Crystals of the tracers were immediately placed inside the lesioned site to dissolve for 10 min, and then the whole brain was rinsed thoroughly for 5 min, including the injection site. The tracer injection sites were chosen on the basis of previous anatomical and physiological studies [MRRN and MLR (refs. 7–10; reviewed in ref. 4) and striatum (2, 3, 23)] and verified by histologic examination (Fig. S2). The preparations were then transferred into a dark refrigerated chamber and continuously perfused with new, oxygenated Ringer solution overnight for retrograde transport of the tracer to occur. The following day, the preparations were transferred into a fixative solution chosen according to the immunofluorescence procedure to follow (as detailed later).

Immunofluorescence. Experimental procedures for immunofluorescence against TH, choline acetyltransferase (ChAT), or DA were undertaken immediately after anatomical tracing. Fixation of the tissue was the first step. For TH and ChAT, the neural tissue was immersed in 4% (wt/vol) paraformaldehyde in PBS solution (0.1 M, pH 7.4, 0.9% NaCl) for 24 h and then transferred to a phosphate-buffered 20% (wt/vol) sucrose solution. For DA, the neural tissue was first immersed for 5 min in 0.1 M cacodylate buffer, pH 6.2, containing 0.9% sodium metabisulfite (MBS), followed by 55 min in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.5, containing 0.9% MBS. The tissue was then rinsed thoroughly with 0.05 M Tris buffer containing 0.9% MBS (TBMBS) and transferred overnight to another vial containing the same solution with 20% (wt/vol) sucrose. The brain tissue was sectioned transversely at 25-μm thickness with a cryostat, and the sections were collected on ColorFrost Plus microscope slides (Fisher Scientific) and air-dried overnight on a warming plate. If biocytin had been injected as a tracer, the sections were first rinsed three times, 10 min each, before being incubated for 30 min in PBS solution (or TBMBS for DA) containing a 1:200 dilution of streptavidin–Alexa Fluor 594, 488, or 350 (Invitrogen), depending on the color needs. The sections were then rinsed again three times for 10 min each with PBS solution (or TBMBS).

For ChAT immunofluorescence, the sections were then preincubated in a PBS solution containing 0.3% Triton X-100 and 5% (vol/vol) normal horse serum for 60 min. The sections were then incubated in the same preincubation solution containing a goat anti-ChAT antibody (diluted 1:80; AB144P; Millipore) overnight at 4 °C. The following day, the sections were rinsed three times for 10 min each in PBS solution and incubated in the preincubation solution containing a donkey anti-goat Alexa Fluor 488 antibody (diluted 1:200; A11055; Invitrogen) for 60 min. The sections were then rinsed three times for 10 min each with PBS solution and once with deionized water, and left to dry on a warming plate for 5 min. The slides were then mounted with Vectashield with or without DAPI (H1000 or H1200; Vector).

For TH immunofluorescence, normal goat serum was used instead of normal horse serum, and the antibodies used were a rabbit anti-TH (diluted 1:400; AB152; Millipore) and a donkey anti-rabbit Alexa Fluor 594 (diluted 1:400; A21207; Invitrogen) or a goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:400; A11008; Invitrogen). All other steps were as described for ChAT immunofluorescence. TH immunofluorescence was used to visualize DA neurons. This choice was based on other studies in lampreys (3, 29, 30).

For DA immunofluorescence, PBS solution was replaced with TBMBS, Triton X-100 was increased to 0.5%, and 5% (vol/vol) normal goat serum was used as for TH. The antibodies used were a mouse anti-DA (diluted 1:400; MAB5300; Millipore) and a goat anti-mouse DyLight 594 (diluted 1:200; 115-515-146; Jackson ImmunoResearch). All other steps were as described for ChAT immunofluorescence.

Specificity of the fluorescent secondary antibodies was verified by omitting the primary antibody from the procedures described earlier. In every case, no labeling was obtained under these conditions. The AB144P antibody has been used on lampreys for many years by different research teams, and its selectivity against ChAT is well demonstrated (7, 31, 32). The AB152 antibody against TH has been used reliably on lampreys in many independent studies on DA neurons (24, 33, 34). The specificity of the MAB5300 antibody for DA was tested by ELISA by the manufacturer, and its pattern of labeling in our material corresponded closely to that reported with other DA antibodies in the lamprey (29, 30).

The sections were then observed and photographed using an E600 epifluorescence microscope equipped with a DXM1200 digital camera (Nikon). Combining digital photomicrographs taken with different filter sets and adjusting the levels so that all fluorophores were clearly visible simultaneously was done by using Photoshop CS5 (Adobe). To avoid double counting as a result of the sectioning of the tissue, cells were counted on only half the sections, skipping one in between. The cell counts provided are thus close to half of the actual total neuronal counts, except for TH-containing neurons of the PT projecting to both the striatum and the MLR, in which case all neurons from all sections were counted because of their rarity.

Semi-intact Preparation. To simultaneously record the activity of reticulospinal cells and locomotor movements, a semi-intact preparation was used. We used 13 larval animals for these experiments. The procedure was as described elsewhere (10, 35, 36). To expose the brain and the rostral segments of the spinal cord, skin, muscles, and surrounding tissues were removed from the rostral part of the animal, down to the caudal gills. The dorsal surface of the cranium was opened to obtain free access to the reticulospinal neurons in the MRRN. A transverse section was performed at the level of the habenula to eliminate the inputs from the basal ganglia and other rostral areas to the MLR. A dorsal midsagittal transection was per-

formed at the level of the diencephalon to provide access to the PT. The preparation was then transferred into the recording chamber. The cartilage containing the brain was pinned down to the bottom of a recording chamber covered with Sylgard (Dow Corning), whereas the intact body was left to swim freely in a video monitored adjacent chamber. The preparation was continually perfused with cold oxygenized Ringer solution (4 mL/min) and cooled to a temperature of 8 to 10 °C. A recovery time of at least 1 h after surgery was given before recording. When bath-applying DA onto the brain, the recording chamber was partitioned at the level of the caudal rhombencephalon with petroleum jelly, and the two partitions were independently perfused. Electrical stimulation of the PT (10-s train, 4–5 Hz, 4–30 μA, 2-ms pulses) elicited swimming movements during the experiments. At the end of the experiment, an electrolytic lesion (5 s, DC current, 10 μA) was performed to histologically control the location of the stimulation site (Fig. 3*D*).

Kinematic Recordings and Analysis. Locomotor movements of body were recorded (30 frames per second) by a video camera (HDR-XR200; Sony) positioned 1 m above the recording chamber. Locomotor movements were tracked and analyzed by using custom written scripts in Matlab (MathWorks) previously used in our laboratory (11, 35). Briefly, tracking markers were equidistantly distributed along the midline of the body by using geometrical analysis of the body. Swimming movements were monitored frame-by-frame through local measurement of the angle between the longitudinal axis of nonmoving parts of the body and the line drawn by two successive markers (35). The local curvature angles were determined throughout the whole body. This allowed us to observe that a mechanical wave was traveling rostrocaudally along the body, as expected during forward swimming. For further analysis, monitoring the body curvature of a single pair of markers at a specific point along the body (at 50% of body length) was sufficient to monitor the locomotor frequency, the number of locomotor cycles, and the duration of the locomotor bouts (35).

Isolated Brain Preparation. For experiments in an isolated brain preparation (10 larval animals for voltammetry experiments; 5 newly transformed and 1 larval animal for patch experiments), the same dissection procedure as described for the semi-intact preparation was performed, but the caudal body parts were removed after a complete transversal cut at the level of the first spinal cord segment.

Electrophysiological Recordings and Stimulation. Intracellular recordings of reticulospinal neurons in the MRRN region were performed as described elsewhere with the use of sharp microelectrodes (80–110 MΩ) filled with a 4 M potassium acetate solution (35–37). The signals were amplified by an Axoclamp 2A amplifier (sampling rate of 2–10 kHz; Axon Instruments) and acquired through a Digidata 1200 series interface coupled with Clampex 9.0 software (Axon Instruments) or AxoGraph X 1.4.4 (John Clements). Only reticulospinal neurons with a stable membrane potential, held for 5 min after impalement and lower than −60 mV, were included in the study. Extracellular recordings of reticulospinal neurons were performed by using a glass microelectrode filled with Ringer solution (tip diameter, 5 μm) and amplified with a microelectrode AC amplifier (bandwidth 100–500 Hz; model 1800; A-M Systems).

Homemade glass-coated tungsten microelectrodes (4–5 MΩ with 10-μm exposed tip) and a Grass S88 stimulator coupled to a Grass PSIU6 photoelectric isolation unit for controlling the stimulation intensity (Astro Med) were used for unilateral electrical stimulation of the PT. The stimulation site was chosen on the basis of previous anatomical and physiological studies (3, 10, 11). Electrical square pulses (2-ms duration) were applied with a frequency of 4 to 5 Hz for 10 s for train stimulation. A pause of 3 to 5 min was allowed between two train stimulations. Single stimuli at 0.1 Hz were used for eliciting excitatory postsynaptic currents. The stimulation intensities ranged from 4 to 35 μA. This would theoretically correspond to a maximum spread of the injected current ranging from 80 to 354 μm around the stimulation site (reviewed in ref. 38). In all types of preparations used in the present study, an electrolytic lesion was made at the end of the experiment to control histologically the location of the electrode (Fig. 3*D* shows semi-intact preparation; Fig. S2 *G–I* shows patch and voltammetry experiments in the isolated brain preparation).

Patch clamp was coupled with retrograde labeling to record targeted MLR neurons projecting to reticulospinal neurons on the basis of the protocol described elsewhere to record MLR cells projecting to respiratory networks (11). A surgery was made 24 h before the experiment. The animals were anesthetized with tricaine methanesulfonate (MS 222; 100 mg/L) and then transferred in a cold oxygenated Ringer solution (8–10 °C, 100% O_2). A 2-mm^2 flap window was opened on the top of the head to expose the caudal brainstem. MLR neurons were retrogradely labeled from an injection of Texas red–dextran amines [molecular weight (MW) of 3,000 Da; Molecular Probes] in the MRRN region. The incision was closed with Vetbond after the injection procedure. The animal was then returned to a nursery aquarium filled with oxygenated Ringer solution at room temperature. After maintaining the animal for 24 h to allow retrograde labeling of MLR cells, the brain was extracted and prepared for patch recordings. To access the MLR cells, the dorsal part of the isthmus and caudal mesencephalon was removed with a Vibratome in a cold Ringer solution (1–3 °C). The giant reticulospinal cell I1 was used as landmark to locate the MLR. Neurons were recorded under whole-cell patch clamp. Pipettes were pulled to a tip resistance of 4 to 6 MΩ. Bright-field and fluorescence imaging of the traced neurons were combined to allow targeted whole-cell patch recording of MLR cells projecting to the reticular formation. Patch pipette solution contained (in millimolar): cesium methane sulfonate 102.5, NaCl 1, $MgCl_2$ 1, EGTA 5, Hepes 5, ATP 0.3, GTP 0.1, and biocytin at 0.05%. Biocytin allowed us to identify the recorded cell. The pH was adjusted to 7.2 with CsOH, and the osmolarity to 240 mOsm with H_2O. Positive pressure was applied to the pipettes to allow tissue penetration by the electrode. Pressure was removed to allow a seal against the fluorescently labeled neurons. Recordings were made with a patch-clamp amplifier 2400 (A-M Systems).

Data analysis was performed by using ClampFit 10.0 (Axon Instruments), Spike2 5.19 (Cambridge Electronic Design), or Matlab 7.8 (MathWorks).

Voltammetry Recordings. DA concentration evoked by PT stimulation (10-s train, 5 Hz, 14–25 μA, 2-ms pulses) was locally measured by using fast-scan cyclic voltammetry with glass-insulated, Nafion-coated, carbon-fiber microelectrodes. As previously described (12), electrodes were made from individual carbon fibers (7-μm diameter; Goodfellow). Fibers were aspirated into glass pipettes (0.6 mm o.d., 0.4 mm i.d.; A-M Systems) and pulled on a vertical puller (Narishige). The glass seal was evaluated under light microscopy and the carbon fiber was cut to a length of 75 to 100 μm by using a scalpel. Following construction, the electrode was coated in Nafion (LQ-1105; Ion Power) and baked at 75 °C for 10 min. The electrodes were placed in the MLR and held at −0.4 V against Ag/AgCl between voltammetric scans and then driven to +1.3 V and back at 400 $V{\cdot}s^{-1}$ every 100 ms. Electroactive species within this voltage range oxidize and reduce at different points along the voltage scan and can be identified on the basis of their background-subtracted current by voltage (i.e., cyclic voltammogram) plots (12). Data were acquired and analyzed by using software written in LabVIEW 7.1 (National instruments). Stimulation artifacts were manually removed by interpolation. An electrolytic lesion (5 s, DC current, 10 μA) was performed in the recording site at the end of the experiment to verify histologically the location of the electrode (Fig. S2 *J* and *K*).

Drug Application. All drugs were purchased from Sigma and were diluted to their final concentration in Ringer solution. In some experiments, DA was bath-applied at a concentration of 10 μM. In other experiments, DA (5 mM) or the D1 receptor antagonist SCH 23390 (500 μM) were microinjected locally in the MLR, and D-glutamate (5 mM) was microinjected locally in the PT. As previously done in our laboratory (7, 8, 10, 11, 35, 37, 39), the microinjections were performed through a glass micropipette (tip diameter, 10–20 μm) by applying pressure pulses (3–4 psi) of various durations (20–100 ms) with a Picospritzer (General Valve) ipsilaterally to the stimulation and intracellular recording sites. Fast Green was added to the drug solution for visualizing the injection site as described elsewhere (e.g., refs. 10, 11, 37). The injected volumes were estimated by measuring the diameter of a droplet ejected in air from the tip of the pipette after applying a single pressure pulse. The volume of the droplet was calculated by using the equation of a sphere. The total volume of each microinjection was then estimated by multiplying this volume by the number of pulses used per microinjection, as previously done in our laboratory (e.g., refs. 7, 39). For each drug, the number of moles ejected was calculated. The size of the injections was also controlled visually under the microscope by measuring the spread of Fast Green at the level of the injection site in the brain tissue. The spread did not exceed 300 μm in diameter for any of these injections. This was also confirmed in four larval lampreys by measuring the spread of HRP [10% (wt/vol)] microinjection into the brain tissue (Fig. S2 *J* and *L*), as previously done by us (39). For bath applications and local drug injections, the drugs were washed out for a period of 1 h.

Statistics. Data in the text are presented as the mean ± SEM. The statistical analysis was performed by using Sigma Plot 11.0 (Systat) or Origin 7.0 (OriginLab). Statistical differences were assumed to be significant at $P < 0.05$. One-tailed paired Student *t* tests were used for comparing means between two groups. Correlations between variables were calculated using the Pearson product–moment correlation test.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Danielle Veilleux for technical assistance, Jean-François Gariépy for help with some of the experiments, and Frédéric Bernard for help with graphics. This work was supported by Canadian Institutes of Health Research Grants 15129 and 15176 (to R.D.), Parkinson Society Canada Grant 2011-11 (to R.D.), Fonds de la Recherche en Santé du Québec Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central (GRSNC) Grant 5249, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Grant 217435 (to R.D.), National Institutes of Health Grant R01 MH 084874 (to S.A); Fonds de la Recherche en Santé du Québec fellowships (to D.R.); and a GRSNC Jasper Fellowship (to D.R.).

1. Kravitz AV, et al. (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466(7306):622–626.
2. Stephenson-Jones M, Samuelsson E, Ericsson J, Robertson B, Grillner S (2011) Evolutionary conservation of the basal ganglia as a common vertebrate mechanism for action selection. *Curr Biol* 21(13):1081–1091.
3. Pombal MA, El Manira A, Grillner S (1997) Afferents of the lamprey striatum with special reference to the dopaminergic system: A combined tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 386(1):71–91.
4. Le Ray D, Juvin L, Ryczko D, Dubuc R (2011) Chapter 4—supraspinal control of locomotion: The mesencephalic locomotor region. *Prog Brain Res* 188:51–70.
5. Rolland AS, et al. (2009) Evidence for a dopaminergic innervation of the pedunculopontine nucleus in monkeys, and its drastic reduction after MPTP intoxication. *J Neurochem* 110(4): 1321–1329.
6. Beckstead RM, Domesick VB, Nauta WJ (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res* 175(2):191–217.
7. Le Ray D, et al. (2003) Nicotinic activation of reticulospinal cells involved in the control of swimming in lampreys. *Eur J Neurosci* 17(1):137–148.
8. Smetana R, Juvin L, Dubuc R, Alford S (2010) A parallel cholinergic brainstem pathway for enhancing locomotor drive. *Nat Neurosci* 13(6):731–738.
9. Ménard A, Auclair F, Bourcier-Lucas C, Grillner S, Dubuc R (2007) Descending GABAergic projections to the mesencephalic locomotor region in the lamprey Petromyzon marinus. *J Comp Neurol* 501(2):260–273.
10. Derjean D, et al. (2010) A novel neural substrate for the transformation of olfactory inputs into motor output. *PLoS Biol* 8(12):e1000567.
11. Gariépy JF, et al. (2012) Specific neural substrate linking respiration to locomotion. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(2):E84–E92.
12. Roitman MF, Wheeler RA, Wightman RM, Carelli RM (2008) Real-time chemical responses in the nucleus accumbens differentiate rewarding and aversive stimuli. *Nat Neurosci* 11(12):1376–1377.
13. Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30(5):228–235.
14. Le Crom S, Kapsimali M, Barôme PO, Vernier P (2003) Dopamine receptors for every species: Gene duplications and functional diversification in Craniates. *J Struct Funct Genomics* 3(1-4):161–176.
15. Ericsson J, et al. (2013) Dopamine differentially modulates the excitability of striatal neurons of the direct and indirect pathways in lamprey. *J Neurosci* 33(18):8045–8054.
16. Blin M, Norton W, Bally-Cuif L, Vernier P (2008) NR4A2 controls the differentiation of selective dopaminergic nuclei in the zebrafish brain. *Mol Cell Neurosci* 39(4): 592–604.
17. Rink E, Wullimann MF (2001) The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res* 889(1-2):316–330.
18. Marín O, Smeets WJ, González A (1997) Basal ganglia organization in amphibians: Catecholaminergic innervation of the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 378(1):50–69.
19. Yamamoto K, Vernier P (2011) The evolution of dopamine systems in chordates. *Front Neuroanat* 5:21.
20. Puelles L, Verney C (1998) Early neuromeric distribution of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in human embryos. *J Comp Neurol* 394(3):283–308.
21. Ericsson J, Silberberg G, Robertson B, Wikström MA, Grillner S (2011) Striatal cellular properties conserved from lampreys to mammals. *J Physiol* 589(pt 12):2979–2992.
22. Ericsson J, et al. (2013) Evolutionarily conserved differences in pallial and thalamic short-term synaptic plasticity in striatum. *J Physiol* 591(pt 4):859–874.
23. Pombal MA, El Manira A, Grillner S (1997) Organization of the lamprey striatum - transmitters and projections. *Brain Res* 766(1-2):249–254.
24. Robertson B, et al. (2012) The dopamine D2 receptor gene in lamprey, its expression in the striatum and cellular effects of D2 receptor activation. *PLoS ONE* 7(4):e35642.
25. Stephenson-Jones M, Ericsson J, Robertson B, Grillner S (2012) Evolution of the basal ganglia: Dual-output pathways conserved throughout vertebrate phylogeny. *J Comp Neurol* 520(13):2957–2973.
26. Grillner S, Robertson B, Stephenson-Jones M (2013) The evolutionary origin of the vertebrate basal ganglia and its role in action-selection. *J Physiol* 2013(Feb):25.
27. Schultz W, Dayan P, Montague PR (1997) A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275(5306):1593–1599.
28. Thompson RH, Ménard A, Pombal M, Grillner S (2008) Forebrain dopamine depletion impairs motor behavior in lamprey. *Eur J Neurosci* 27(6):1452–1460.
29. Abalo XM, Villar-Cheda B, Anadón R, Rodicio MC (2005) Development of the dopamine-immunoreactive system in the central nervous system of the sea lamprey. *Brain Res Bull* 66(4-6):560–564.
30. Pierre J, Mahouche M, Suderevskaya EI, Repérant J, Ward R (1997) Immunocytochemical localization of dopamine and its synthetic enzymes in the central nervous system of the lamprey Lampetra fluviatilis. *J Comp Neurol* 380(1):119–135.
31. Pombal MA, Marín O, González A (2001) Distribution of choline acetyltransferase-immunoreactive structures in the lamprey brain. *J Comp Neurol* 431(1):105–126.
32. Quinlan KA, Buchanan JT (2008) Cellular and synaptic actions of acetylcholine in the lamprey spinal cord. *J Neurophysiol* 100(2):1020–1031.
33. Villar-Cerviño V, et al. (2006) Presence of glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in the retina of the larval sea lamprey: Comparative immunohistochemical study of classical neurotransmitters in larval and postmetamorphic retinas. *J Comp Neurol* 499(5): 810–827.
34. Barreiro-Iglesias A, Villar-Cerviño V, Villar-Cheda B, Anadón R, Rodicio MC (2008) Neurochemical characterization of sea lamprey taste buds and afferent gustatory fibers: Presence of serotonin, calretinin, and CGRP immunoreactivity in taste bud bi-ciliated cells of the earliest vertebrates. *J Comp Neurol* 511(4):438–453.
35. Brocard F, et al. (2010) The transformation of a unilateral locomotor command into a symmetrical bilateral activation in the brainstem. *J Neurosci* 30(2):523–533.
36. Sirota MG, Di Prisco GV, Dubuc R (2000) Stimulation of the mesencephalic locomotor region elicits controlled swimming in semi-intact lampreys. *Eur J Neurosci* 12(11): 4081–4092.
37. Brocard F, Dubuc R (2003) Differential contribution of reticulospinal cells to the control of locomotion induced by the mesencephalic locomotor region. *J Neurophysiol* 90(3): 1714–1727.
38. Ranck JB, Jr. (1975) Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. *Brain Res* 98(3):417–440.
39. Brocard F, Bardy C, Dubuc R (2005) Modulatory effect of substance P to the brain stem locomotor command in lampreys. *J Neurophysiol* 93(4):2127–2141.