

ANNEE 2013

Thèse n°2044

# THÈSE

pour le

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

**Ecole doctorale : Sciences de la vie et de la santé**

**Mention : Sciences technologie et santé**

**Option : Neurosciences**

**Présentée et soutenue publiquement**

Le 16 Octobre 2013

Par Carole HYACINTHE

Née le 25 Août 1986 à Epinay-sur-Seine

**Dérégulation de la dopamine et maladies du repos :**

**Maladie de Willis-Ekbom et Maladie de Parkinson**

### **Membres du Jury**

M Bernard BIOULAC.....Président  
M Pierre-Hervé LUPPI.....Rapporteur  
M Marc SAVASTA .....Rapporteur  
M Imad GHORAYEB.....Directeur de thèse

*A ma sœur et mes parents.*

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon Directeur de thèse, le Dr. Imad GHORAYEB de m'avoir fait confiance pour la réalisation ce projet, qui a permis de compléter mes connaissances en biologie du développement par les neurosciences. Imad, je te remercie également de m'avoir donné l'opportunité de travailler avec le modèle original qu'est le primate non humain, sur ces deux thématiques.

Je remercie le Dr. Erwan BEZARD pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions scientifiques possibles soit au sein de son équipe, soit dans les locaux de MOTAC Neurosciences à Pékin. Merci pour les conseils prodigués tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Bernard BIOULAC d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous suis reconnaissante du grand honneur que vous me faites en acceptant de présider cette thèse.

Mes remerciements vont également aux Drs. Pierre-Hervé LUPPI et Marc SAVASTA pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs.

Je vous exprime ici toute ma gratitude pour l'intérêt que vous avez consenti à porter à ce travail.

Je remercie enfin chaleureusement l'Association Française des patients atteints par la Maladie de Willis-Ekbom (Association France Ekbom) et en particulier sa Présidente Mme Catherine GEYER, pour leur généreuse contribution à ces travaux.

Par ailleurs, je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe avec une attention particulière pour Evelyne, Marie-Laure, Alain, Marie-Hélène pour leurs encouragements et leur soutien moral ! Un grand merci également à Audrey et Giselle pour leur appui humain et scientifique, beaucoup de bonheur à la future maman et à la nouvelle mamie !

Bonne route aux nouveaux thésards, les m&m's et Farinou, n'embêtez pas trop ceux qui arriveront après vous ! Merci également à Thibaud, on se refait la muraille mais en mode vacances et sans béquilles cette fois ! Merci également à Benjamin, POF, Nathalie, Greg, Céline... *etc.* et tous les autres membres de l'équipe. *Daniel we can make a cooking competition when you want, Fares would enjoy to be the beefeater!*

J'exprime toute ma gratitude envers le Dr. Daniel Voisin qui a assuré son rôle de tuteur de manière exemplaire et pédagogique en ayant su m'orienter scientifiquement et personnellement.

Merci à Abdelamid Benazzouz et à son équipe de m'avoir permis d'utiliser pendant plusieurs mois la salle d'HPLC. Merci à Philippe de Deurwaeredère, pour toute l'aide plus que précieuse face aux caprices des cellules HPLC et surtout, merci pour votre humour... tenez bon face à la cigarette !!! Merci à Mélanie et Loïse pour leur soutien pendant les longues après-midi et soirées d'HPLC party !

Merci à Jérôme Bauffreton et à son équipe, pour l'aide matérielle concernant l'optogénétique et pour son soutien enthousiaste pendant les mois de stimulation nocturne.

Un grand remerciement à Hugues Orignac et Tho Haï Nguyen pour leur disponibilité, leurs installations, ainsi que pour leur assistance opératoire. Merci pour votre chaleureuse aide indispensable !

*I thank Li Qin, for his helpfull support all along the establishment of my protocols, for his expert advices during the microdialysis experiments in Beijing and also for his kindness.*

Par ailleurs, je remercie Nathalie Vignais, Samya, Ourida, Catherine et Chantal pour leur précieuse aide logistique, leur sympathie et leur soutien moral.

Merci également à celles et ceux que j'ai omis de citer... les *monkey girls* (Camille, Steph et Emilie), Fredo, Till, Azzedine, Youna, Marion, Nicolas Langbourg, Estelle et Lionel... !

De plus, j'ai évidemment une pensée pour l'ensemble de mes proches, qui m'ont soutenue de près ou de loin :

- **Aux épicuriens de la science** : Drs. Olivier Nicole et Emilie Pacary, (un grand merci pour la relecture du manuscrit), pas trop de folies avec toutes ces vignes autour !!! Merci Dr. Moustier et la petite Audrey pour les sessions de détente *wine-gossip*... ! Une pensée également aux italiens Nicola Solaris (tes extravagances culinaires me manquent) et Simone Bido, bon courage pour la suite ! Merci aux Drs. Nico et Amélie qui m'ont permis de bien décompresser, à quand le prochain challenge *wiiU-over night*? *Thanks to Dr. Ben Martynoga, no more ChIPseq for you either? Enjoy your transsiberian trip with your new baby born!*

- **A l'originale Astyanax team** : Drs. Sylvie Rétaux et Karen Pottin, merci de m'avoir donné goût à la recherche dès mes premiers pas dans le monde scientifique et de m'avoir poussée à croire en mon travail. Merci pour les encouragements dès le début et pour la valorisation permanente que vous m'avez portée. J'espère avoir l'occasion de travailler à nouveau avec vous !

- **A Boboch et Panam** : vous m'avez mieux supportée qu'une équipe de *cheerleaders*. Merci à Mica et Maude, Fred, Anthony, Raph (le Vietnam c'est pour bientôt !) et Isa. Des remerciements particuliers à Rémi de m'avoir soutenue au mieux malgré la distance et supportée patiemment. Merci Marco pour ton ardeur anticonformiste (« tenir bon face aux cons ») et ta sagesse shiatsuka ! Un grand merci à Adrien (super bouclier en état de guerre), je serai là pour ta soutenance promis !

- **Aux ventres jaunes and co.** : Marine et Christophe, Marie-Laure et JC, Alice et Julien, Ingrid et Romain...

- **Merci mon petit lion**, pour le soutien et les conseils, je te souhaite beaucoup de courage c'est bientôt fini pour toi aussi !

Pour Sandrine et Michel il n'y a pas de mots pour vous exprimer toute ma gratitude merci mille et une fois, je n'imagine pas avoir traversé cela sans vous à mes côtés. Vous allez me manquer énormément ! Merci de m'avoir supportée dans tous mes états tout au long du parcours, d'avoir été présent pour le travail et pour tout le reste ! Merci d'avoir été les meilleurs collègues de travail que l'on puisse avoir et surtout d'être devenus de sincères amis. Merci d'avoir été là jusqu'au bout !

Enfin, toute ma reconnaissance va à ma famille qui n'a eu de cesse de m'encourager depuis le début et qui y a cru. A Hervé et Marelyse, à mes grands parents Marcelle et Roger, ainsi qu'une pensée profonde à mamie Berthe.

Merci à papa et maman, sans vous je n'aurais pas eu le courage d'affronter tout cela ! Merci ma sœur et n'oublie pas que c'est toi la meilleure, c'est bientôt la fin aussi !  
Merci à vous trois d'être toujours là, ce travail est pour vous.

*Merci à tous !*

# RESUME

A travers ce projet de recherche nous avons exploré différents aspects d'une dérégulation du système dopaminergique sur les troubles du repos, en prenant pour exemple deux maladies neurologiques : la maladie de Willis-Ekbom (MWE) et la maladie de Parkinson (MP).

La MWE est une maladie neurologique sensorimotrice caractérisée par des douleurs dans les membres inférieurs, s'accompagnant d'un besoin irrésistible de bouger et ce, suivant un profil circadien. Ainsi, le premier volet de ces travaux s'est appliqué à reproduire chez le macaque, les principales altérations du métabolisme du fer et de celui de la dopamine reportées dans la MWE. Tout d'abord, nous avons établi les bases physiologiques des variations circadiennes des concentrations du fer et de ses biomarqueurs au niveau central et périphérique. Puis, nous avons développé un protocole simple, uniquement basé sur des prélèvements sanguins répétés, permettant d'induire efficacement une déplétion en fer sérique et de ses protéines associées. Finalement, ce protocole nous a permis d'explorer les liens entre l'altération de l'homéostasie du fer au niveau du système nerveux central, les perturbations neurochimiques dans différentes structures cérébrales ainsi que les modifications locomotrices qui en résultent.

Le second volet de cette thèse a testé l'impact des agonistes des récepteurs dopaminergiques de type D1 (SKF38393) et D2 (quinpirole), sur les troubles du sommeil dans un modèle macaque de la MP, à l'aide d'enregistrements polysomnographiques. Pour cela, nous avons évalué les effets de ces agents pharmacologiques sur l'émergence de la somnolence diurne et sur l'altération du sommeil paradoxal, induits par une intoxication au MPTP. Nos résultats mettent en évidence que le quinpirole est inefficace pour restaurer les niveaux de base de ces deux paramètres. En revanche, le SKF38393 permet une diminution notable de la somnolence diurne ainsi qu'une restauration du sommeil paradoxal.

Finalement, les perturbations monoaminergiques liées à la déplétion en fer ouvrent de multiples perspectives de recherche sur la physiopathologie de la MWE. De même, l'amélioration des troubles veille-sommeil par l'agoniste des récepteurs D1, offre de nouvelles pistes thérapeutiques quant à la prise en charge des troubles du repos dans la MP. L'ensemble de nos résultats apporte un niveau de compréhension supplémentaire quant au rôle de la dopamine dans les altérations du repos.

# ABSTRACT

During this PhD project we explored several aspects of the impact of a dopaminergic system dysregulation on the rest alterations, through two neurological diseases: the Willis-Ekbom's disease (WED) and Parkinson's diseases (PD). The WED is a neurological sensorimotor disorder mainly characterized by pain in lower limbs. It preferentially appears in the evening and transiently and partially is alleviated by motor activity.

Thus, the first part of this work aimed at reproducing the main dysfunctions of the iron and dopaminergic metabolisms observed in WED, in the macaque monkey. We first established the circadian variations of iron-indicator concentrations in serum and cerebrospinal fluid. Then we developed a rapid protocol based on repeated blood withdrawals, allowing to efficiently induce serum iron depletion. Finally, this protocol enabled us to investigate the relationship between iron metabolism dysfunctions, neurochemical alterations and the subsequent locomotor behavioural changes.

In the second part, of this research project we examined the impact of selective D1 (SKF38393) and D2 (quinpirole) receptor agonists on the sleep impairments in a macaque model of PD using the polysomnographic recording technique. Thus we investigated the effects of these two pharmacological compounds on the daytime sleepiness and on the paradoxical sleep induced by MPTP intoxication. Our results demonstrated the inefficacy of quinpirole to restore these two altered sleep parameters. By contrast, SKF38393 significantly decreased daytime napping and substantially restored paradoxical sleep.

Finally, the monoaminergic dysregulations, induced by iron depletion, may offer multiple perspectives to unravel the WED pathophysiology. In the same line, the beneficial effects exhibited by the D1 receptor agonist bring new therapeutic avenues to treat sleep-wake disorders in PD. Together, the global results bring new insights in the underlying mechanisms of sleep impairment involving dopamine.

# SOMMAIRE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>REMERCIEMENTS</b>  | <b>2</b>  |
| <b>RESUME</b>   | <b>6</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>   | <b>7</b>  |
| <b>SOMMAIRE</b>   | <b>8</b>  |
| <b>AVANT PROPOS</b>   | <b>12</b> |
| <b>INTRODUCTION</b>   | <b>13</b> |
| A. Rythmes biologiques centraux .....   | 13        |
| A. I. Historique et généralités .....   | 13        |
| A. II. Organisation des cycles veille-sommeil .....                                   | 14        |
| A. III. Physiologie des cycles veille-sommeil .....                                   | 16        |
| A. IV. Métabolisme de la dopamine et implication dans les cycles veille-sommeil ..... | 22        |
| A. V. Métabolisme du fer et influence des cycles veille-sommeil .....                 | 26        |
| B. Lien physiologique et pathologique entre le fer et la dopamine .....               | 40        |
| B. I. Dialogue fer-dopamine .....   | 40        |
| B. II. Maladie de Willis-Ekbom.....   | 43        |
| B. III. Maladie de Parkinson .....  | 55        |
| <b>OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE</b>   | <b>72</b> |
| <b>MATERIELS ET METHODES</b>  | <b>74</b> |
| C. Animaux.....   | 74        |
| D. Modèle macaque d'une carence en fer sérique.....                                   | 75        |
| D. I. Effet d'un traitement par chélateur de fer .....                                | 75        |
| D. II. Effet d'un régime alimentaire privé en fer .....                               | 76        |
| D. III. Effet d'un protocole de saignées répétées (PSR) .....                         | 78        |

|   |           |
|---|-----------|
| D. IV. Evaluation de l'activité locomotrice générale par actimétrie.....                                      | 80        |
| D. V. Implantation de sondes de microdialyse.....   | 80        |
| D. VI. Dosages du fer et protéines associées.....   | 81        |
| D. VII. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....   | 82        |
| E. Modèle macaque de la maladie de Parkinson.....   | 83        |
| E. I. Injections de la neurotoxine MPTP .....   | 83        |
| E. II. Evaluation de l'activité motrice de base .....   | 84        |
| E. III. Implantation du dispositif de télémétrie.....   | 85        |
| E. IV. Analyse des stades de vigilance.....   | 86        |
| E. V. Traitements pharmacologiques .....  | 87        |
| F. Sacrifices des animaux et prélèvements .....   | 88        |
| G. Analyses statistiques .....  | 88        |
| <b>RESULTATS</b>  | <b>91</b> |
| H. Variations journalières des concentrations de fer et de ses protéines associées chez le macaque naïf ..... | 91        |
| H. I. Variations journalières de l'hémoglobine .....  | 92        |
| H. II. Variations journalières du fer .....   | 93        |
| H. III. Variations journalières de la ferritine.....  | 93        |
| H. IV. Variations journalières de la transferrine .....   | 94        |
| H. V. Comparaison entre les taux de fer, de ferritine et de transferrine entre le sérum et le LCR.....        | 94        |
| I. Impact du protocole de saignées répétées sur les concentrations du fer et des protéines associées .....    | 95        |
| I. I. Le PSR diminue les taux d'hémoglobine.....  | 96        |
| I. II. Le PSR diminue les taux de fer.....  | 96        |
| I. III. Le PSR diminue les taux de ferritine .....  | 96        |
| J. Impact du PSR sur les concentrations des monoamines <i>in vivo</i> dans le striatum .....                  | 97        |

|  |            |
|--|------------|
| J. I. Le PSR induit l'augmentation des taux extracellulaires de DA et de DOPAC .....   | 99         |
| J. II. Le PSR induit l'augmentation extracellulaire de 5-HIAA .....  | 99         |
| K. Impact du PSR sur le métabolisme tissulaire des monoamines .....  | 99         |
| K. I. Modification de la synthèse de dopamine : variations des taux de L-DOPA et du ratio DA/L-DOPA .....                        | 100        |
| K. II. Modification des taux de dopamine dans les régions extrastriatales .....  | 102        |
| K. III. Modification de la dégradation de la dopamine : variations du ratio (DOPAC+HVA)/DA .....                                 | 103        |
| K. IV. Modification de la dégradation de la sérotonine : variations des taux de 5-HT et de 5-HIAA .....                          | 104        |
| K. V. Résumé des variations des concentrations tissulaires observées .....   | 106        |
| L. Impact du PSR sur le comportement locomoteur.....   | 107        |
| <b>DISCUSSION</b>  | <b>112</b> |
| Impact d'une carence en fer sérique sur le système dopaminergique : vers un modèle macaque de la maladie de Willis-Ekbom ? ..... | 112        |
| M. Variations journalières des biomarqueurs du fer chez le macaque naïf .....  | 112        |
| N. Le PSR induit une déplétion des biomarqueurs du fer dans le sérum .....   | 114        |
| O. Le PSR modifie le métabolisme dopaminergique.....   | 116        |
| O. I. Modification du métabolisme dopaminergique striatal .....  | 116        |
| O. II. Modification du métabolisme dopaminergique extrastriatal.....   | 120        |
| O. III. Le PSR modifie le métabolisme sérotoninergique .....   | 121        |
| P. Perspectives .....  | 125        |
| Impact des agonistes dopaminergiques sur le cycle veille-sommeil dans un modèle macaque de la maladie de Parkinson. ....         | 126        |
| Q. Altération des paramètres veille-sommeil chez le macaque intoxiqué au MPTP .....  | 126        |
| R. Effet des agonistes des récepteurs dopaminergiques .....  | 127        |
| R. I. Inefficacité du quinpirole dans l'amélioration des troubles veille-sommeil .....   | 127        |
| R. II. Effet bénéfiques du SKF38393 sur les troubles veille-sommeil.....   | 127        |

|   |            |
|---|------------|
| S. Perspectives .....                   | 129        |
| T. Perspectives translationnelles ..... | 130        |
| <b>CONCLUSION GENERALE</b>              | <b>133</b> |
| <b>RÉFÉRENCES</b>                       | <b>136</b> |

# AVANT PROPOS

La maladie de Willis-Ekbom (MWE) et la maladie de Parkinson (MP) sont toutes deux des pathologies neurologiques qui a priori, en s'appuyant uniquement sur les symptômes moteurs semblent très différentes. En effet, les patients atteints de la MWE ressentent des sensations désagréables voir sévèrement contraignantes principalement au niveau des membres inférieurs, qui peuvent être soulagées de manière transitoire par la mise en mouvement et ce préférentiellement en fin de journée. Dans les cas les plus sévères les symptômes se poursuivent la nuit et conduisent à des troubles de l'initiation et/ou du maintien du sommeil ce qui entraîne une détérioration substantielle de la qualité de vie. En revanche, les patients atteints de la MP présentent quant à eux un déficit moteur. Celui-ci est caractérisé notamment par une difficulté à initier le mouvement menant à une disparition progressive des performances motrices.

Cependant, ces deux maladies partagent des points communs comme une possible altération du métabolisme du fer. Alors que les patients atteints de la MWE présentent un déficit en fer dans la principale zone de production de la dopamine (la substance noire compacte), un excès de fer est retrouvé dans cette structure chez certains patients atteints de la MP. Par ailleurs, dans les deux cas, les patients répondent positivement aux traitements dopaminergiques. En effet, des traitements basés sur des agonistes dopaminergiques de type D2/D3 améliorent considérablement les troubles moteurs des patients souffrant de l'une ou l'autre des deux maladies. Néanmoins, si ces agonistes ne présentent que peu d'effets sur les troubles du sommeil de la MWE, ils ont tendance à les aggraver dans la MP.

A travers ce projet de thèse nous avons étudié l'implication de la dopamine dans les altérations du repos en se basant sur ces deux pathologies neurologiques. Afin d'étudier la physiopathologie de la MP et plus particulièrement le rôle des agonistes des récepteurs dopaminergiques de types D1 et D2 sur les modifications du sommeil engendrées par un syndrome parkinsonien, nous avons utilisé le modèle expérimental de référence de la MP, c'est-à-dire le primate non humain intoxiqué au MPTP. En revanche, il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle satisfaisant pour étudier la physiopathologie de la MWE chez le primate non humain. Aussi, au vue de la fréquence importante de cette maladie dans la population occidentale (environ 9%) et de la méconnaissance de son étiologie nous avons initié des travaux en ce sens. Pour cela nous nous sommes basés sur le postula suggérant qu'une dérégulation du métabolisme du fer altère les systèmes monoaminergiques, avec une attention particulière sur la dopamine, et par conséquent l'activité motrice.

# **INTRODUCTION**

## **A. Rythmes biologiques centraux**

### **A. I. Historique et généralités**

L'existence des rythmes biologiques est connue depuis l'Antiquité. Les premiers écrits concernant la description des rythmes circadiens remontent au 4ème siècle avant J.-C. Le scribe d'Alexandre le Grand, Androsthène, décrivit le comportement nycthéméral des feuilles du tamarinier qui s'ouvraient le jour et se refermaient la nuit. Ce rythme fut alors interprété comme une simple réponse passive à un environnement cyclique.

Le physiologiste et médecin italien Santorio Santorio (1561-1636) fut l'un des premiers à mettre en évidence un rythme circadien chez l'Homme en mesurant la variation de son poids corporel au cours de la journée.

En 1729, l'astronome français Jean-Jacques Dortous de Mairan démontra pour la première fois la nature endogène des rythmes circadiens. Des feuilles de mimosa placées à l'abri de la lumière solaire, continuaient à s'ouvrir le jour et à se replier la nuit. Le comportement circadien persistait donc, même en absence d'indices environnementaux. Augustin de Candolle en 1832 montra le mouvement périodique des feuilles du mimosa, s'ouvrant une à deux heures plus tôt chaque jour et acquérant par conséquent une périodicité de 22 à 23 heures.

Au début du XXème siècle les observations de Karl von Frish (prix Nobel en 1973) ont relancé l'intérêt de la recherche sur les rythmes circadiens. Il remarqua que les abeilles visitaient les fleurs entre 4h et 6h et ce malgré la privation de lumière. Il en déduisit que ces insectes devaient posséder une horloge interne.

Ce n'est qu'en 1959, que le terme "circadien" (littéralement "autour d'un jour") fut proposé par Franz Halberg pour qualifier les rythmes précédemment décrits chez les plantes et les animaux, dont la période endogène est d'environ 24h. Franz Halberg est souvent considéré comme le fondateur de la chronobiologie et fut l'un des premiers chercheurs à avoir étudié l'influence de l'heure d'administration des médicaments sur leur efficacité.

Enfin, la preuve de la nature endogène du système circadien chez l'Homme fut apportée par les études de Jurgen Aschoff et Rutger Wever en 1962 et de Michel Siffre en 1964. Ils placèrent des volontaires dans une cave en absence d'indices environnementaux. Ces expériences révélèrent l'apparition spontanée d'une période en « libre cours » du cycle activité-repos d'environ 25h.

En 1971, Seymour Benzer et son étudiant Ron Konopka créèrent le premier organisme génétiquement modifié présentant un rythme circadien d'activité altéré. Le modèle de drosophile qu'ils utilisèrent, devint le premier organisme modèle pour l'étude des bases génétiques des rythmes circadiens.

Le premier « gène de l'horloge », portant les mutations induites par Benzer et Konopka, fut identifié par le groupe de Michael Young en 1984 (Bargiello and Young, 1984) et fut nommé, gène *per* (pour *period*). Des oscillations circadiennes au niveau de la protéine et de l'ARN messager du gène *per* furent mises en évidence en 1992, par le groupe de Michael Rosbash (Hardin et al., 1992), plaçant ainsi les bases du mécanisme moléculaire des rythmes circadiens.

Aujourd'hui, les mécanismes des horloges circadiennes internes, leurs liens avec d'autres processus biologiques et leurs implications dans de nombreuses fonctions physiologiques sont étudiées dans le cadre de certaines pathologies impliquant notamment des troubles du sommeil.

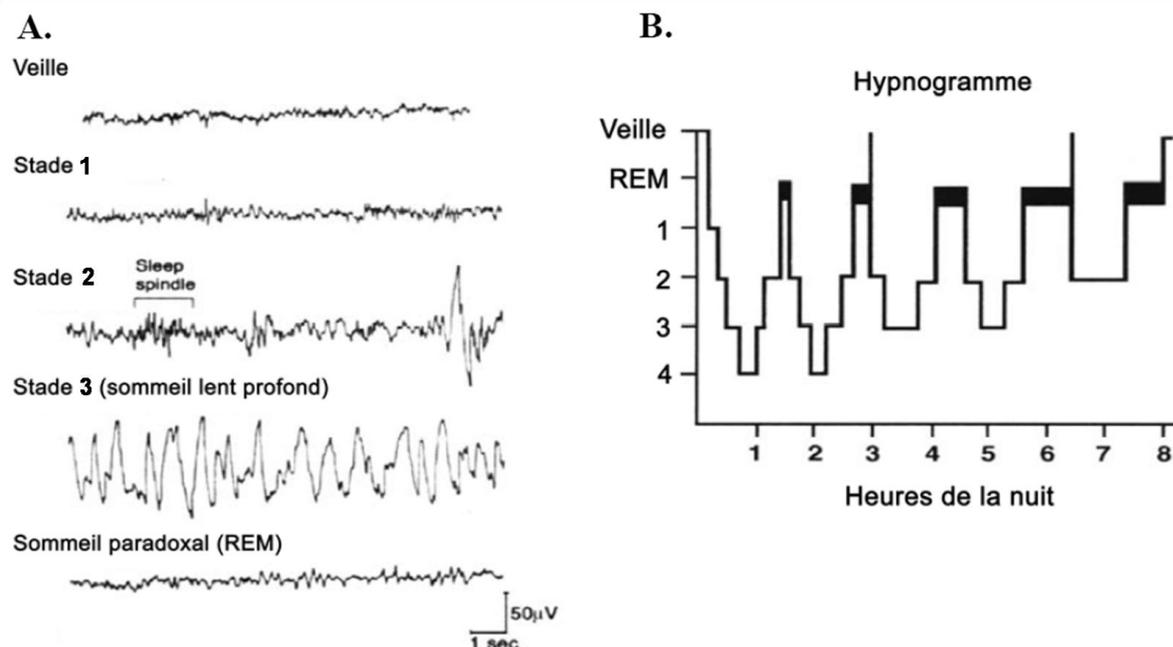
## A. II. Organisation des cycles veille-sommeil

L'activité électrique du cerveau est de nos jours communément étudiée à l'aide d'enregistrements électroencéphalographiques (EEG). Cette technique est notamment indispensable pour l'étude des cycles veille-sommeil en clinique. L'outil EEG permet de capter l'activité électrique du cerveau, fournissant ainsi une mesure objective des états de conscience. Hans Berger fut, en 1929 le premier à enregistrer l'activité du cerveau humain après avoir démontré chez l'animal, la nature électrique de l'activité neuronale (Berger, 1929). Son étude permit d'identifier une différence claire d'activité EEG entre les états de veille et de sommeil. En 1953, les travaux d'Aserinsky ont montré que l'activité EEG était divisée en deux phases de sommeil distinctes qui pouvaient être associées à l'absence ou l'émergence des rêves (Aserinsky and Kleitman, 1953). Par la suite, Dement et Kleitman ont élaboré une classification regroupant quatre stades de sommeil sans mouvement oculaire et un stade avec mouvements oculaires (Dement and Kleitman, 1957b, a). Les travaux de

Jouvet mirent en évidence que cette phase, présentant des mouvements oculaires, était singulièrement associée à une atonie musculaire. Ce stade fut nommé Sommeil Paradoxal (SP) ou *Rapid Eye Movement sleep* (REM sleep) (Jouvet, 1965), correspondant aux périodes de rêves. L'ensemble de ces travaux permit de distinguer 5 stades de vigilance et montra que leur identification dépendait de trois paramètres indispensables, à savoir les activités EEG, électrooculographique (EOG) et électromyographique (EMG). Ainsi, la reconnaissance de l'ensemble des stades de sommeil chez l'Homme est basée sur l'analyse des grapho-éléments de ces trois paramètres selon des règles établies par Rechtschaffen et Kales en 1968 (Rechtschaffen A., 1968). Ces règles ont été révisées en 2003 par l'*American Academy of Sleep Medicine* (Silber et al., 2007).

La caractéristique de chaque stade, nécessaire à leur identification, est décrite dans la partie de matériels et méthodes. La représentation graphique de l'enchaînement des différents stades de vigilance au cours d'une nuit est appelée « hypnogramme », elle permet d'établir la succession des cycles de sommeil au cours d'une nuit (**Figure 1**).

Chez l'homme, les cycles (environ 4 à 5 cycles par nuit de 90-120 minutes) sont composés d'un enchaînement de stades : l'endormissement (stade 1), le sommeil lent léger (stade 2), suivi du sommeil lent profond (stade 3) puis du sommeil paradoxal (SP) (**Figure 1**). Globalement, la durée des phases de sommeil paradoxal s'allonge au cours des cycles successifs alors que la durée des phases de sommeil lent profond diminue jusqu'à disparaître en fin de nuit (Siegel, 2004).



**Figure 1** : Organisation et stades du sommeil chez l'homme. D'après (Siegel, 2004).

**A-** Exemples d'enregistrements EEG typiques durant l'éveil et les différents stades de sommeil chez l'Homme. **B-** Hypnogramme typique illustrant la progression des stades de sommeil au cours d'une nuit. Noter la prépondérance des stades de sommeil lent profond durant la première partie de la nuit et du sommeil paradoxal (ici REM) dans la seconde partie.

### A. III. Physiologie des cycles veille-sommeil

#### A. III. 1. Voies de régulation de l'état de veille

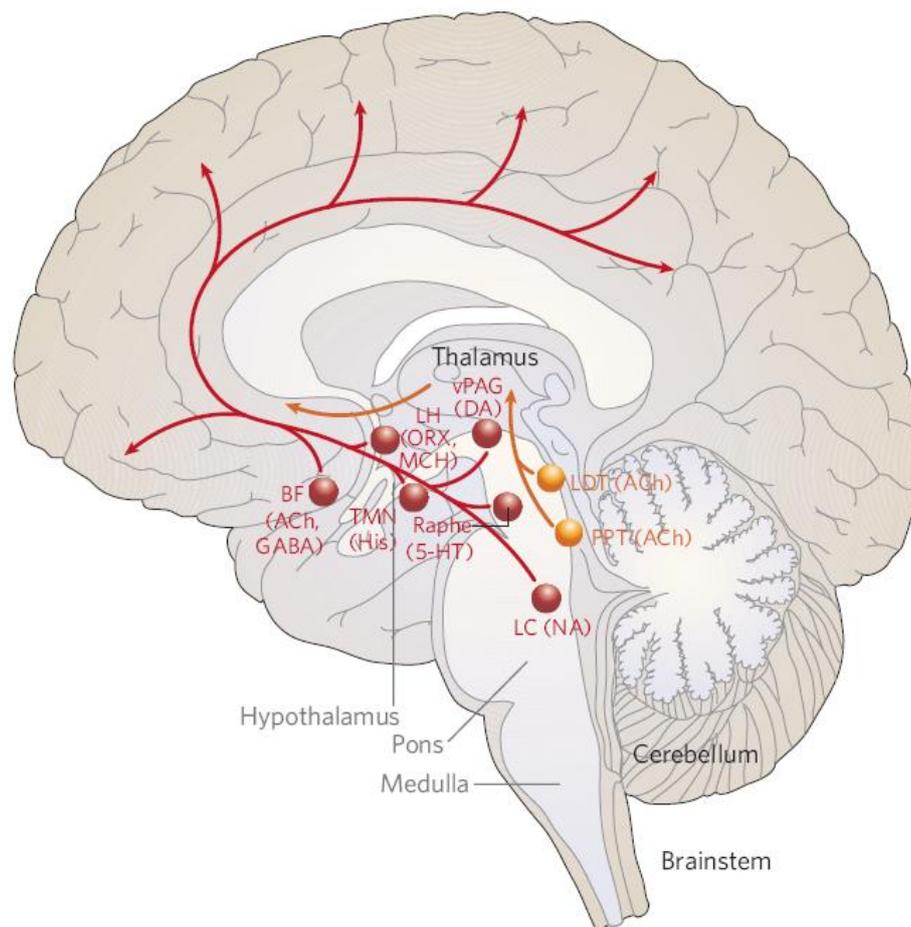
En 1917, le Baron Von Economo et J. R. Cruchet, posèrent les bases neurobiologiques de la régulation des états de vigilance, au travers d'études anatomopathologiques de patients atteints d'encéphalite virale (*encephalitis lethargica*) (Cruchet, 1917, Von Economo, 1917). Les patients atteints de cette maladie devenaient soit léthargiques, soit insomniaques. Von Economo décrit que les patients léthargiques passant plus de vingt heures par jour à dormir, présentaient des lésions au niveau de la jonction liant le tronc cérébral au diencephale (Von Economo, 1926). Par conséquent, il proposa l'existence d'une « voie d'éveil ascendante » provenant du tronc cérébral et innervant l'ensemble du cortex pour le maintien de l'éveil.

Des études réalisées dans les années 1980 ont clarifié la nature de cette voie et montré que ce « système d'éveil » avait pour origine une série de groupes neuronaux

particuliers divisés en deux voies principales (Edley and Graybiel, 1983, Vanni-Mercier et al., 1984, Rye et al., 1987) :

La première voie d'éveil ascendante issue du noyau pédonculopontin et du noyau latérodorsal du tegmentum, projette vers le thalamus. Il s'agit d'une voie cholinergique permettant l'activation des neurones relais du thalamus, dont l'activité est cruciale pour la transmission des informations sensori-motrices vers le cortex cérébral (**Figure 2**, voie jaune) (Saper et al., 2005). Une diminution de l'activité de ces neurones, observée durant le sommeil lent profond, engendre une diminution des relations thalamo-corticales (McCormick, 1989, Strecker et al., 2000).

La seconde voie d'éveil ascendante innervent l'ensemble du cortex cérébral sans relais thalamique (**Figure 2**, voie rouge). Elle est principalement issue de neurones localisés dans le tronc cérébral et inclut les noyaux noradrénergique du locus coeruleus, sérotoninergique des raphés dorsal et médian, dopaminergique de la substance grise périaqueducule, cholinergique du noyau basal de Meynert et histaminergique des noyaux tubéromammillaires. De plus, les afférences de cette voie sont amplifiées au niveau du cortex par des neurones hypothalamiques peptidergiques (neurones à hormone concentrant la mélanine et à orexine). Des lésions le long de cette seconde voie ascendante provoquent les formes les plus profondes de somnolence (Gerashchenko et al., 2003). D'un point de vue fonctionnel, l'activité des différents groupes de neurones monoaminergiques de cette voie est importante durant l'éveil et diminue durant le sommeil lent et paradoxal (Aston-Jones and Bloom, 1981, Fornal et al., 1985, Steininger et al., 1999). De la même façon, les neurones orexinergiques de l'hypothalamus latéral sont plus actifs durant l'éveil et à l'inverse, les neurones à hormone concentrant la mélanine sont actifs durant le sommeil paradoxal (Verret et al., 2003, Lee et al., 2005, Mileykovskiy et al., 2005).



**Figure 2** : Représentation schématique des structures impliquées dans l'éveil. D'après (Saper et al., 2005).

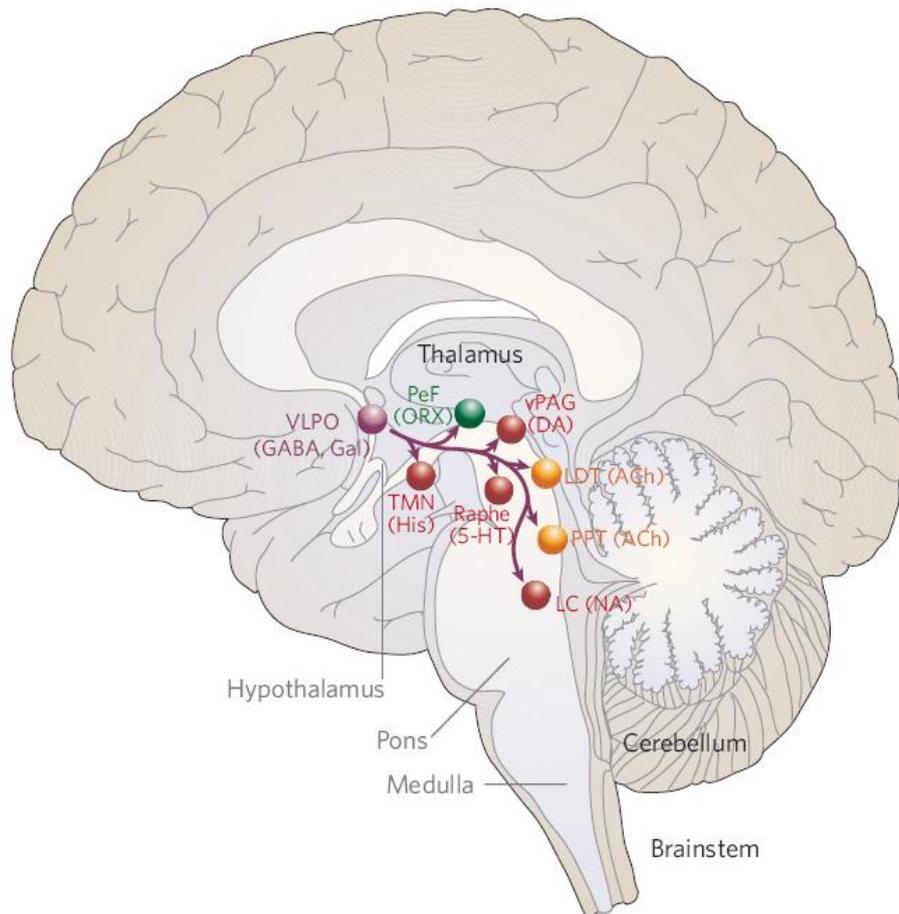
Abréviations : 5-HT=sérotonine ; ACh=acétylcholine ; BF=cerveau antérieur basal ; DA=dopamine ; His=histamine ; LC=locus coeruleus ; LH=hypothalamus latéral ; LTD=noyau latérodorsal du tegmentum ; MCH=hormone concentrant la mélanine ; NA=noradrénaline ; ORX=orexine ; PeF=perifornix ; PPT=noyau pédonculopontin ; TMN=noyau tubéromammillaire ; VLPO=aire préoptique de l'hypothalamus antérieur ventrolatéral ; vPAG=substance grise périaqueducale.

### A. III. 2. Voies de régulation de l'état de sommeil

#### A. III. 2. a. *Régulation du sommeil*

La seconde observation majeure de Von Economo, chez les patients devenus insomniaques suite à l'encéphalite virale, fût la description de lésions situées au niveau de l'hypothalamus antérieur (Von Economo, 1926). Des études menées dans les années 1980-90, identifièrent un groupe neuronal situé au niveau de l'aire préoptique de l'hypothalamus antérieur ventrolatéral (VLPO). Le VLPO fût décrit comme le principal « centre de sommeil », projetant sur l'ensemble des systèmes d'éveil de l'hypothalamus et du tronc cérébral (Sherin et al., 1996), recevant lui-même des afférences de chaque système monoaminergique (Chou

et al., 2002) (**Figure 3**). L'activité des neurones du VLPO est plus importante durant le sommeil. Ces neurones contiennent des neurotransmetteurs dits inhibiteurs tels que la galanine et l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) (Sherin et al., 1998, Gaus et al., 2002). Des lésions du VLPO réalisées chez l'animal, entraînent une réduction des temps de sommeil lent et paradoxal de plus de 50% (Lu et al., 2000).



**Figure 3 :** Représentation schématique des structures impliquées dans le sommeil. D'après (Saper et al., 2005).

Abréviations : 5-HT=sérotonine ; ACh=acétylcholine ; DA=dopamine ; GABA=acide  $\gamma$ -aminobutyrique ; Gal=galanine ; His=histamine ; LC=locus coeruleus ; LTD= noyau latérodorsal du tegmentum ; NA=noradrénaline ; ORX=orexine ; PeF=perifornix ; PPT=noyau pédonculopontin ; TMN=noyau tubéro-mamillaire ; VLPO=aire préoptique de l'hypothalamus antérieur ventrolatéral ; vPAG=substance grise périaqueducule.

*A. III. 2. b. Régulation du sommeil paradoxal*

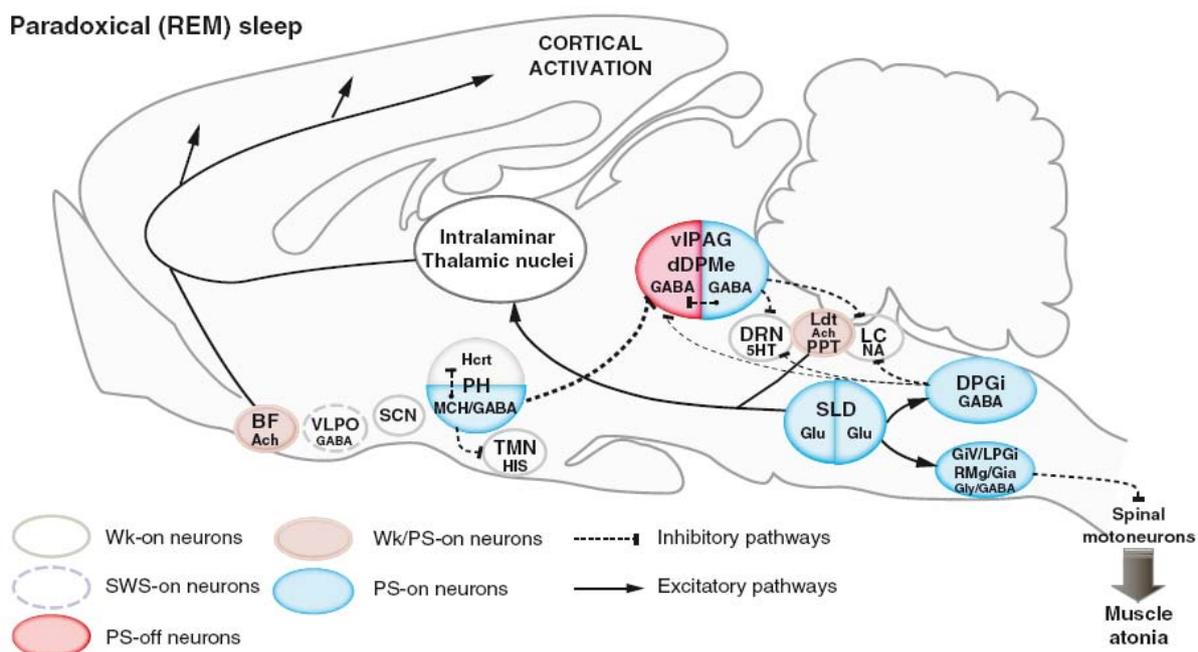
Les périodes de SP se retrouvent pendant les périodes de sommeil chez la plupart des espèces mammifères. Si le rôle physiologique du SP reste à ce jour mal compris, ce dernier constitue néanmoins un besoin vital puisque une étude de privation de sommeil paradoxal chez le rat conduisit au décès des animaux après 3 semaines de privation (Kushida et al., 1989).

De nombreuses études menées chez le chat puis chez le rat, ont eu pour objectif d'élucider les mécanismes neuronaux responsables de l'émergence et du maintien du sommeil paradoxal. Celles-ci ont montré que les structures impliquées étaient différentes de celles régulant les états d'éveil et de sommeil lent. Les travaux de Jouvet (Jouvet, 1962) puis ceux de Sakai (Sakai et al., 1979, Sastre et al., 1981, Sakai et al., 2001) ont ainsi démontré chez le chat que la régulation des cycles sommeil lent/sommeil paradoxal met en jeu de multiples structures situées essentiellement au niveau des structures pontiques.

Les travaux de Luppi et collègues, ont montré que l'activation d'une population neuronale essentiellement glutamatergique du noyau sublatérodorsal (SLD) appelé « SP-on », jouerait un rôle clef dans l'émergence et le maintien du SP (Boissard et al., 2002, Boissard et al., 2003, Luppi et al., 2004).

D'une part, l'activation des noyaux intralaminaires du thalamus par les neurones SP-on provenant du SLD induirait le sommeil paradoxal (**Figure 4**). D'autre part, l'activation des noyaux de la formation réticulée par les projections du SLD induirait l'atonie musculaire (**Figure 4**). Par ailleurs, le SLD est secondé par les neurones de l'hypothalamus postérieur qui inhibent les neurones appelés SP-off, de la substance grise périaquéducale ventrolatérale (vIPAG), activés pendant l'éveil et le sommeil lent profond (**Figure 4**).

Lors de l'éveil et du sommeil lent profond, le locus coeruleus (noradrénaline) et le raphé dorsal (sérotonine) activent les neurones SP-off du vIPAG, inhibant ainsi les neurones SP-on du SLD (**Figure 4**) (Luppi et al., 2013).



**Figure 4 : Représentation schématique des noyaux régulant le sommeil paradoxal.**  
D'après (Luppi et al., 2013).

BF=cerveau antérieur basal ; DRN=noyau du raphé dorsal ; DPGi, GiV, LPGi, RMg/Gia=formation réticulée ; dDPMe=noyau réticulé du mésencéphale profond ; LC=locus coeruleus ; Ldt=noyau du tegmentum latérodorsal ; PH=hypothalamus postérieur ; PPT=noyau du tegmentum pédonculopontin ; SCN=noyau suprachiasmatique ; SLD=noyau sublatérodorsal ; TMN=noyau tubéromammillaire ; vIPAG=substance grise périaqueducale ventrolatérale ; VLPO=noyau préoptique ventrolatéral. Ach=acétylcholine ; Hcrt=hypocrétine (orexine) ; MCH=hormone concentrant la mélanine ; GABA=acide gamma-aminobutyrique ; Gly=glycine ; His=histamine ; NA= noradrénaline ; PS=sommeil paradoxal ; SWS=sommeil lent profond.

L'atonie musculaire observée pendant le SP est destinée à empêcher de mettre en action les rêves. Chez le chat, la stimulation des noyaux de la formation réticulée par le carbachol (agoniste cholinergique muscarinique) entraîne une atonie musculaire alors qu'une lésion permet une libération du tonus musculaire lors du SP entraînant des comportements oniriques (Jouvet, 1962). De plus, chez des patients parkinsoniens atteints de troubles du sommeil paradoxal, caractérisés notamment par une perte de l'atonie musculaire, des corps de Lewy (agrégats protéiques anormaux spécifiques de la maladie de Parkinson, détaillé section B. III. 3. a), ont été identifiés dans cette région (Braak et al., 2003). Finalement, si des structures homologues n'ont pas encore été précisément décrites chez l'homme, ce modèle illustre bien la complexité des mécanismes mis en jeu dans la régulation du sommeil paradoxal.

## A. IV. Métabolisme de la dopamine et implication dans les cycles veille-sommeil

### A. IV. 1. Physiologie du système dopaminergique

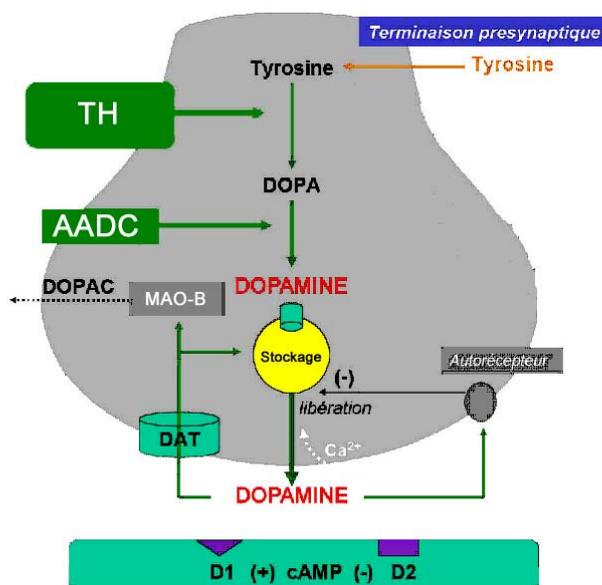
L'existence de la dopamine (DA) dans le cerveau fut découverte dès la fin des années 1930 mais elle fut considérée uniquement comme un précurseur de la noradrénaline (Blaschko, 1939). Ce n'est qu'à la fin des années 1950 qu'elle fut désignée comme un neurotransmetteur à part entière (Montagu, 1957), possiblement impliqué dans la maladie de Parkinson (Carlsson, 1959, Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Depuis cette découverte, il a été largement démontré que la DA participe à un grand nombre de fonctions physiologiques du système nerveux comme la mémoire (Packard and White, 1991, Everitt and Robbins, 1997), le plaisir et la récompense (Wise, 1978, Schultz, 1997), la perception sensorielle (rétine et bulbe olfactif), la régulation de certaines hormones hypophysaires (Missale et al., 1998) ainsi que la motricité (Carlsson, 1959).

On distingue deux principales sources de production de la DA. Un groupe de neurones dopaminergiques provenant de la substance noire compacte (SNc, nommée aire A9) projette sur le striatum dorsal (composé des noyaux caudé et putamen). Le second groupe provient de l'aire tegmentale ventrale (VTA, nommée aire A10) et ses projections se subdivisent pour former soit la voie mésolimbique, regroupant les aires limbiques avec notamment le septum, les tubercules olfactifs, le noyau accumbens, l'amygdale, l'hippocampe et le cortex piriforme, soit la voie mésocorticale, regroupant le cortex préfrontal médian, le cortex cingulaire et le cortex entorhinal (Moore and Bloom, 1978).

La DA appartient à la famille des catécholamines, regroupant également la noradrénaline et l'adrénaline. La DA est synthétisée à partir de la L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) via l'enzyme décarboxylase des acides aminés (AADC). La L-DOPA est elle-même le produit de transformation de la tyrosine, par la tyrosine hydroxylase (TH) (**Figure 5**). Le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT) permet le stockage de la DA dans des vésicules localisées au niveau des terminaisons synaptiques. Lorsque la membrane plasmique est dépolarisée, une entrée massive de calcium dans le neurone provoque l'exocytose des vésicules contenant la DA, qui est alors libérée dans la fente synaptique. A ce niveau, la DA peut se lier à ses récepteurs spécifiques post-synaptiques. Cinq types de récepteurs ont été identifiés pour la DA et sont regroupés en deux sous familles : les récepteurs de types D1, comprenant les récepteurs D1 et D5 et les

récepteurs de types D2, comprenant les récepteurs D2, D3, D4 (Missale et al., 1998). Des récepteurs de type D2 sont également présents en pré-synaptique et sont appelés autorécepteurs, ils permettent de réguler la libération de DA dans la fente synaptique.

La DA extracellulaire peut également être recaptée par le transporteur à la dopamine (DAT) localisé sur le neurone pré-synaptique et sur les astrocytes avoisinants. Elle peut alors être soit recyclée (inactivation de la DA, non-catabolisante), soit catabolisée par la monoamine oxydase B (MAO-B) ou la cathécol-O-méthyltransférase (COM-T) (inactivation de la DA, catabolisante) (**Figure 5**). L'ensemble de ces mécanismes est nécessaire à la régulation de la transmission synaptique dopaminergique.



**Figure 5** : Représentation schématique du métabolisme de la dopamine.

AADC=enzyme décarboxylase des acides aminés ; COMT=cathécol-O-méthyltransférase; MAO=monoamine oxydase ; TH=tyrosine hydroxylase.

Des variations circadiennes de la dopamine plasmatique et de ses métabolites ont été mises en évidence chez l'Homme (Sowers and Vlachakis, 1984), dans le liquide céphalorachidien chez le primate non humain (Perlow et al., 1977) ainsi que dans le striatum de rat (Schade et al., 1995, Castaneda et al., 2004). Le motif caractérisant la variation circadienne de la dopamine présente un pic le matin et un point le plus faible le soir (Wilkes et al., 1981, Kawano et al., 1990). Un motif de variation circadien a également été montré dans les aires cérébrales motrices, pour l'expression du gène codant pour la TH dans la SNc et la VTA, ainsi que pour le gène codant pour le récepteur dopaminergique D2 dans le

striatum (Weber et al., 2004). De façon intéressante, une expression circadienne de la TH a également été montrée au niveau de la moelle épinière (Clemens et al., 2005). Bien que l'on ne puisse pas établir de lien causal direct entre les taux striataux de DA et l'expression circadienne du gène codant pour la TH dans la SN, le fait que la TH soit augmentée le jour coïncide avec le pic de dopamine retrouvé dans le striatum pendant la journée (Schade et al., 1995, Castaneda et al., 2004).

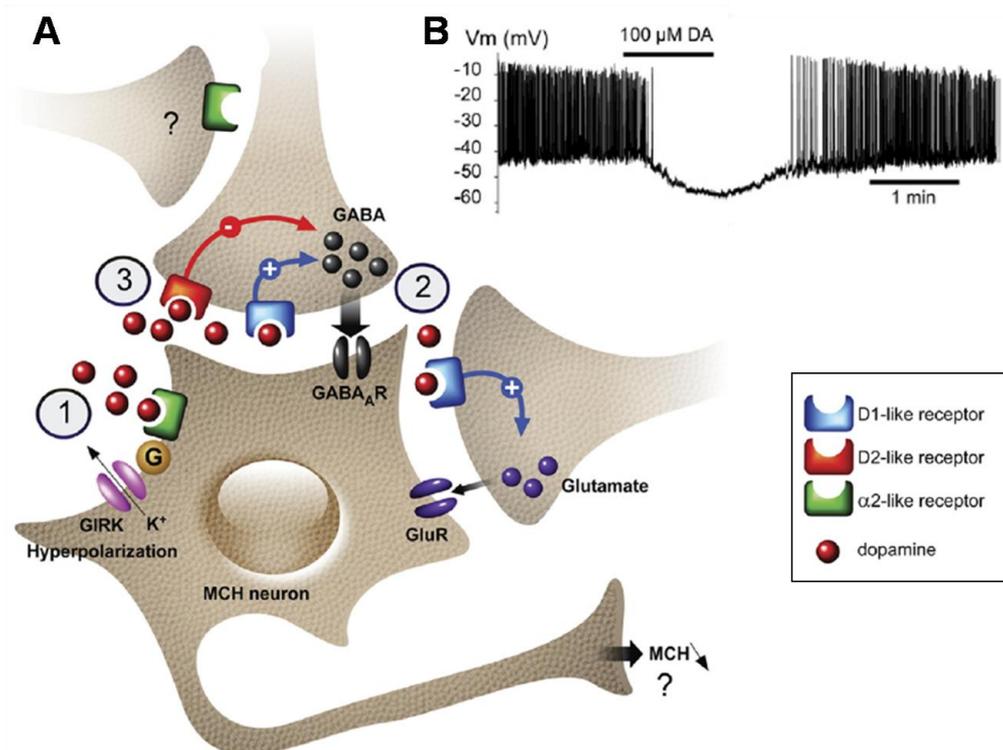
#### A. IV. 2. Implication de la dopamine dans les cycles veille-sommeil

Dans les modèles de régulation des cycles veille-sommeil décrits ci-avant (section A. III. 1 et 2), la DA n'est pas considérée comme un acteur majeur de la régulation des cycles veille-sommeil ni du SP. En effet, de rares études électrophysiologiques ont montré que la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques n'était pas corrélée avec l'alternance des cycles veille-sommeil (Miller et al., 1983, Trulson and Preussler, 1984).

Cependant, plusieurs études pharmacologiques, électrophysiologiques et histochimiques ont montré que des changements appliqués spécifiquement au système dopaminergique, entraînent des modifications de la régulation des cycles veille-sommeil à différents niveaux. En effet, des données électrophysiologiques et histochimiques issues de l'expérimentation chez le rongeur montrent : (i) une activité accrue des neurones dopaminergiques de la VTA durant le SP (Dahan et al., 2007) et de la substance grise périaqueducule durant l'éveil (Lu et al., 2000) (ii) une diminution du SP après déplétion dopaminergique ou blocage des sous-types de récepteurs D2 (Dzirasa et al., 2006, Lima et al., 2007, Lima et al., 2008), (iii) une diminution du SP et une augmentation de l'éveil chez des rats traités avec des agonistes des récepteurs D1 (Trampus et al., 1993), (iv) une augmentation d'expression de c-Fos, un facteur de transcription couramment utilisé comme marqueur d'activité neuronale, a été observée au niveau des neurones dopaminergiques pendant un rebond de SP après privation (Maloney et al., 2002), (v) une augmentation des concentrations de DA au niveau du cortex préfrontal et du noyau accumbens durant le SP (Lena et al., 2005) et enfin (vi) des intrusions de SP durant l'éveil chez des souris hyperdopaminergiques (déficientes pour le transporteur de la dopamine), supprimées par des antagonistes des récepteurs D2 à la DA (Dzirasa et al., 2006).

Par ailleurs, des études de microdialyse (Parada et al., 1988) et de microscopie fluorescente (Leibowitz and Brown, 1980) ont montré que l'hypothalamus latéral, une structure clef de la régulation des cycles veille-sommeil, reçoit des afférences dopaminergiques. Ainsi, il a été proposé que la DA interagit avec l'orexine et la MCH, deux

neuropeptides essentiels à la régulation des cycles veille-sommeil décrits plus haut (sections A. III.1 et 2). En effet, il a été montré que la DA diminue l'activité électrique des neurones à MCH via les récepteurs de types D1 et D2 exprimés au sein de l'hypothalamus latéral (**Figure 6**) (Fetissov et al., 2002, Conductier et al., 2011). De plus, il a été suggéré que l'influence de la DA au niveau de l'hypothalamus latéral pouvait être régulée par l'action des neurones à orexine (Yamanaka et al., 2006).



**Figure 6** : Modèle de régulation de l'activité d'un neurone MCH par la dopamine. Adapté d'après (Conductier et al., 2011).

**A-1** : Une forte concentration de DA agit sur le récepteur noradrénergique  $\alpha 2$  provoquant une hyperpolarisation par sortie de potassium ; **A-2** : Une faible concentration de DA stimule des récepteurs D1 et potentialise la libération de GABA ; **A-3** : Une très forte concentration de DA stimule les récepteurs D2 et inhibe la libération de GABA, cependant à cette concentration les récepteurs  $\alpha 2$  post-synaptiques sont également stimulés (**A-1**). L'ensemble de ces mécanismes conduit à une diminution de l'activité du neurone MCH et par conséquent une diminution de sa libération. **B**- L'ajout de DA sur des neurones MCH inhibe leur activité électrique (électrophysiologie sur tranche dans l'hypothalamus latéral). GABA<sub>A</sub>R=récepteur GABA<sub>A</sub> ; GluR=récepteur glutamatergique ;  $\alpha 2$ =récepteur noradrénergique- $\alpha 2$ .

La pertinence de ces données expérimentales est renforcée par des observations cliniques. En effet, des études réalisées chez des sujets sains ont montré que des injections

de dopamimétiques modulaient les états de veille-sommeil selon une courbe dose-réponse bi-phasique. Des doses faibles de ropinirole, un agoniste des récepteurs D2-D3 (Ferreira et al., 2002) ou de L-DOPA (Andreu et al., 1999) augmentent la proportion de sommeil lent. A l'inverse, des perfusions de doses élevées d'apomorphine, un agoniste des récepteurs D1-D2, pendant le sommeil de sujets contrôles, diminue le sommeil lent profond et le SP (Cianchetti et al., 1980). Enfin, les nombreuses descriptions de troubles du sommeil chez des patients atteints de pathologies impliquant les systèmes dopaminergiques (schizophrénie, troubles attentionnels, maladie de Parkinson et syndrome de Willis-Ekbom ?) ont renforcé l'hypothèse d'une implication dopaminergique dans les processus de régulation des états de vigilance (Rye, 2004).

**Comme décrit dans les sections précédentes les cycles veille-sommeil sont finement régulés par divers acteurs. Le maintien d'un cycle veille-sommeil régulier est important pour l'homéostasie d'autres systèmes biologiques. La partie suivante s'applique à montrer notamment que le métabolisme du fer est dépendant de la régulation veille-sommeil.**

## A. V. Métabolisme du fer et influence des cycles veille-sommeil

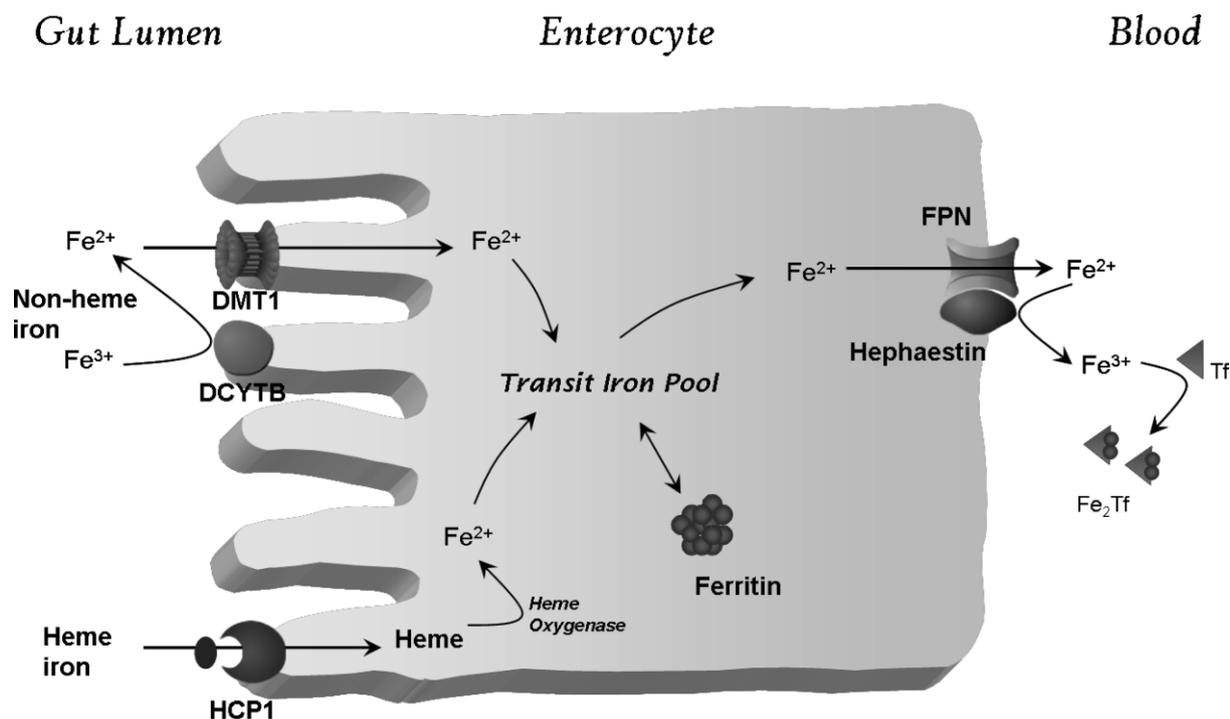
Le fer est un élément indispensable pour le métabolisme de la plupart des organismes vivants, notamment chez les mammifères. Il sert de cofacteur à de nombreuses réactions métaboliques (Chua et al., 2007). Par ailleurs, une dérégulation du métabolisme du fer au niveau du système nerveux central (SNC) a été reliée à la physiopathologie de certaines maladies neurologiques. Ainsi, il est nécessaire de comprendre les processus du métabolisme physiologique du fer pour appréhender son implication au niveau du SNC.

### A. V. 1. Métabolisme du fer au niveau périphérique

Le fer de l'organisme est présent soit sous forme hémique (ferreuse,  $Fe^{2+}$ ), soit non-hémique (ferriques,  $Fe^{3+}$ ). Le fer possède un potentiel d'oxydation élevé et peut produire des espèces oxygénées très réactives (ROS) lors d'un stress oxydant (Aruoma et al., 1989, Gutteridge and Halliwell, 2000). Ainsi, le fer est généralement lié avec une grande affinité à des protéines spécialisées telles que la transferrine (principale protéine de transport du fer) et la ferritine (principale protéine de stockage du fer) permettant de minimiser les effets délétères du fer libre lors d'un stress oxydatif. D'un point de vue fonctionnel, le fer est

important dans un grand nombre de mécanismes cellulaires incluant le transport d'oxygène, le transfert des électrons et la synthèse d'acide nucléique (Andrews, 1999).

De nombreuses protéines sont impliquées dans la régulation du métabolisme du fer : absorption, transport, stockage et utilisation. Les formes hémique et non-hémique du fer sont absorbées au niveau de la bordure en brosse des entérocytes du duodénum (lumière du tube digestif), par deux voies distinctes (Siah et al., 2005, Fuqua et al., 2012). Le fer hémique, se fixe sur la protéine transporteuse de l'hème 1 (HCP1) et passe dans les entérocytes (**Figure 7**) (Raffin et al., 1974, Chua et al., 2007). Le fer non-hémique, est réduit par des ferriréductases telles que le cytochrome b duodénal (DCYTB), puis absorbé dans les entérocytes par le transporteur divalent des métaux (DMT1) (Gunshin et al., 1997, McKie et al., 2001, Ohgami et al., 2006) (**Figure 7**). Le fer provenant des deux sources hémique et non-hémique rejoint transitoirement le même pool de fer labile pour être soit stocké par la ferritine ou transféré vers la membrane basolatérale des entérocytes. A ce niveau, le fer rejoint la circulation sanguine systémique par l'intermédiaire de la ferroportine (FPN) (Forth and Rummel, 1973, Peters et al., 1988, Abboud and Haile, 2000, McKie et al., 2000), où il est oxydé à nouveau ( $Fe^{3+}$ ) par l'héphaestine, un analogue sérique de la céruloplasmine ferroxidase (CP). Ainsi, le fer peut se lier à la transferrine (Tf) circulante, qui est son principal transporteur (**Figure 7**) (Vulpe et al., 1999).



**Figure 7 : Schéma de l'absorption du fer alimentaire par les entérocytes.** D'après (Chua et al., 2007).

DCYTB=cytochrome b duodéal ; DMT1=transporteur des métaux divalents ; FPN=ferroportine ; HCP1=protéine transporteuse de l'hème1 ; Tf=transferrine.

Une fois dans la circulation sanguine, le fer lié à la transferrine (Tf) est distribué aux tissus et absorbé par les cellules par mécanisme d'endocytose, après fixation de la Tf à son récepteur (TfR) (Rouault, 2013). Il est réduit dans les endosomes par des métalloreductase telles que STEAP3 (Lambe et al., 2009) et libéré de la transferrine. Le fer (Fe<sup>2+</sup>) sort des endosomes *via* DMT1 et se retrouve dans le cytosol, alors que les récepteurs TfR1 sont recyclés vers la membrane plasmique (**Figure 8**, mécanisme 1).

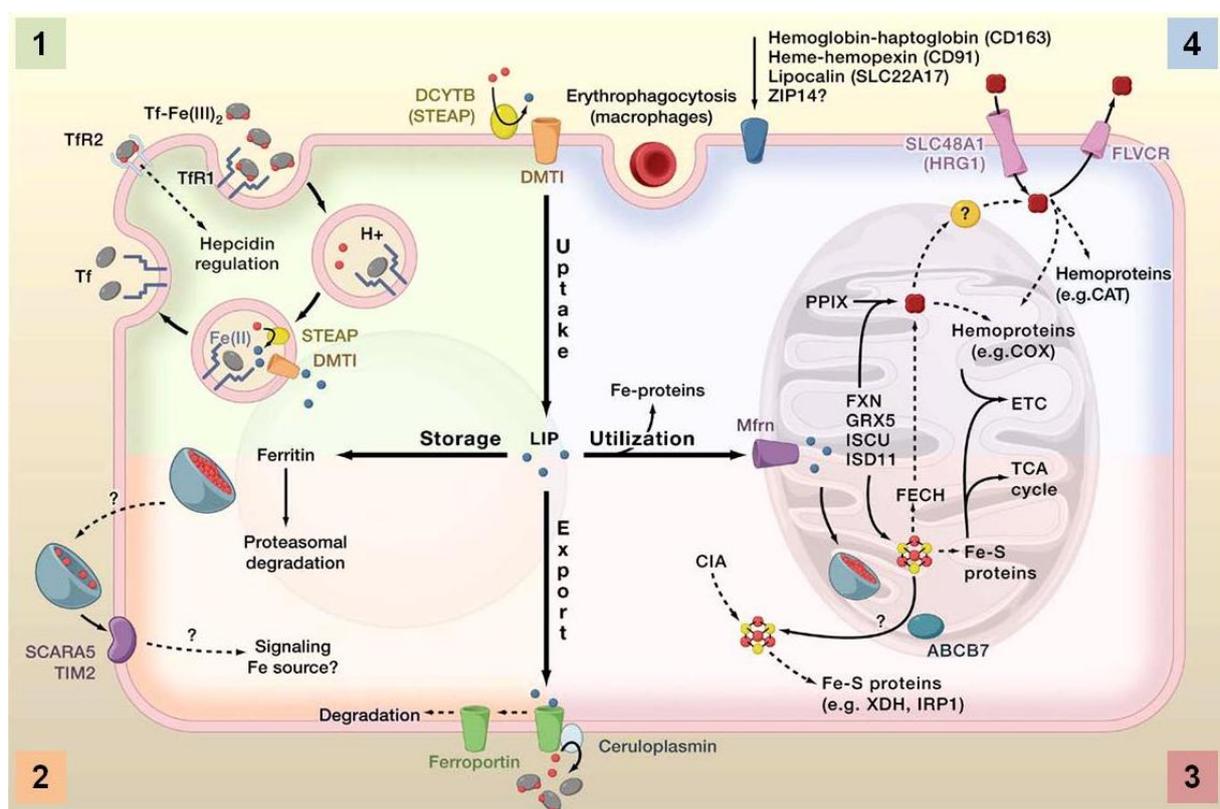
Le fer cytosolique peut être stocké par la ferritine, un hétéropolymère ubiquitaire de 24 sous-unités, composé de chaînes lourdes et légères assemblées en forme de sphère creuse. Sa conformation spécifique fait de la ferritine un compartiment protéique sans membrane, capable de stocker jusqu'à 4500 atomes de fer, empêchant ainsi d'atteindre des taux élevés de fer libre délétères pour le cytosol et le noyau (Arosio et al., 2009). La ferritine cytosolique peut être intégrée dans les lysosomes, où le fer est extrait par l'action de l'hémosidérine (Cohen et al., 2010) (**Figure 8**, mécanisme 2). Il existe d'autres mécanismes de régulation du fer excédentaire tel que l'export hors de la cellule par la ferroportine (**Figure 8**, mécanisme 2).

Par ailleurs, le pool de fer labile (LIP) cytosolique permet également la fabrication de l'hème et des groupements prosthétiques fer-souffre en étant intégré à la matrice mitochondriale par le biais des transporteurs de fer mitochondriaux telles que les mitoferrines 1 et 2 (**Figure 8**, mécanisme 4) (Chen et al., 2009). Dans la mitochondrie, le fer est intégré soit à l'hème soit dans des groupements fer-souffre (Fe-S) (Atamna et al., 2002b).

Les groupements fer-souffre (Fe-S) formés dans les mitochondries sont des cofacteurs inorganiques qui peuvent agir en tant que catalyseurs de réaction chimiques, transporteurs d'électrons ou senseurs de l'état d'oxydoréduction (**Figure 8**, mécanisme 3). Ces cofacteurs sont vulnérables à de nombreux composés chimiques, tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou certains métaux et leur altération peut compromettre la vie cellulaire (Beinert, 2000, Py and Barras, 2010). Les protéines à cofacteurs Fe-S interviennent dans différentes fonctions cellulaires : réplication, réparation de l'ADN, régulation transcriptionnelle ou mécanisme respiratoire mitochondrial (Py and Barras, 2010).

L'hème est pris en charge par des hémoprotéines spécialisées telles que HRG1 ou FLVCR favorisant le passage vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule (**Figure 8**, mécanisme 4). Il est le principal constituant de l'hémoglobine (qui prend en charge les deux tiers du fer de l'organisme) et permet à celle-ci de transporter le dioxygène qui est fixé sur l'atome de fer. Les fluctuations du taux de l'hème participent au métabolisme cellulaire global (McCoubrey et al., 1997, Goessling et al., 1998, Ogawa et al., 2001, Atamna et al., 2002a, Zhu et al., 2002, Tang et al., 2003).

En produisant l'hème et les groupements Fe-S, la mitochondrie représente le site subcellulaire majeur d'utilisation du fer et de ce fait, joue un rôle essentiel dans le contrôle du métabolisme du fer.



**Figure 8 : Biologie cellulaire du métabolisme du fer dans une cellule classique.** D'après (Hentze et al., 2010).

Se référer au texte pour les explications.

Ainsi, la quantité de fer disponible dans le pool de fer labile est déterminée par des processus de régulation coordonnés entre les taux fer absorbés par la cellule, l'utilisation, le stockage et l'exportation en dehors de la cellule et ce, afin d'éviter les perturbations liés au défaut ou excès de fer (Hentze et al., 2010). Par exemple, lorsque la synthèse des groupements Fe-S est altérée, le fer s'accumule dans les mitochondries et peut, par conséquent endommager les organelles. Un modèle propose que les taux de fer mitochondriaux soient en partie régulés par le métabolisme cellulaire. Ainsi, lors d'une insuffisance en fer mitochondrial, les cellules seraient informées par un facteur dépendant des groupements Fe-S et répondraient à ce signal de manière à augmenter les taux de fer mitochondriaux (Galy et al., 2010).

Le métabolisme du fer implique également une régulation au niveau moléculaire, par l'activité des protéines de régulation du fer (IRP) et les éléments de régulation du fer (IRE), séquences d'ADN sur les zones promotrices des gènes qui contrôlent l'homéostasie du fer. Les IRP et les IRE permettent essentiellement d'assurer l'approvisionnement et

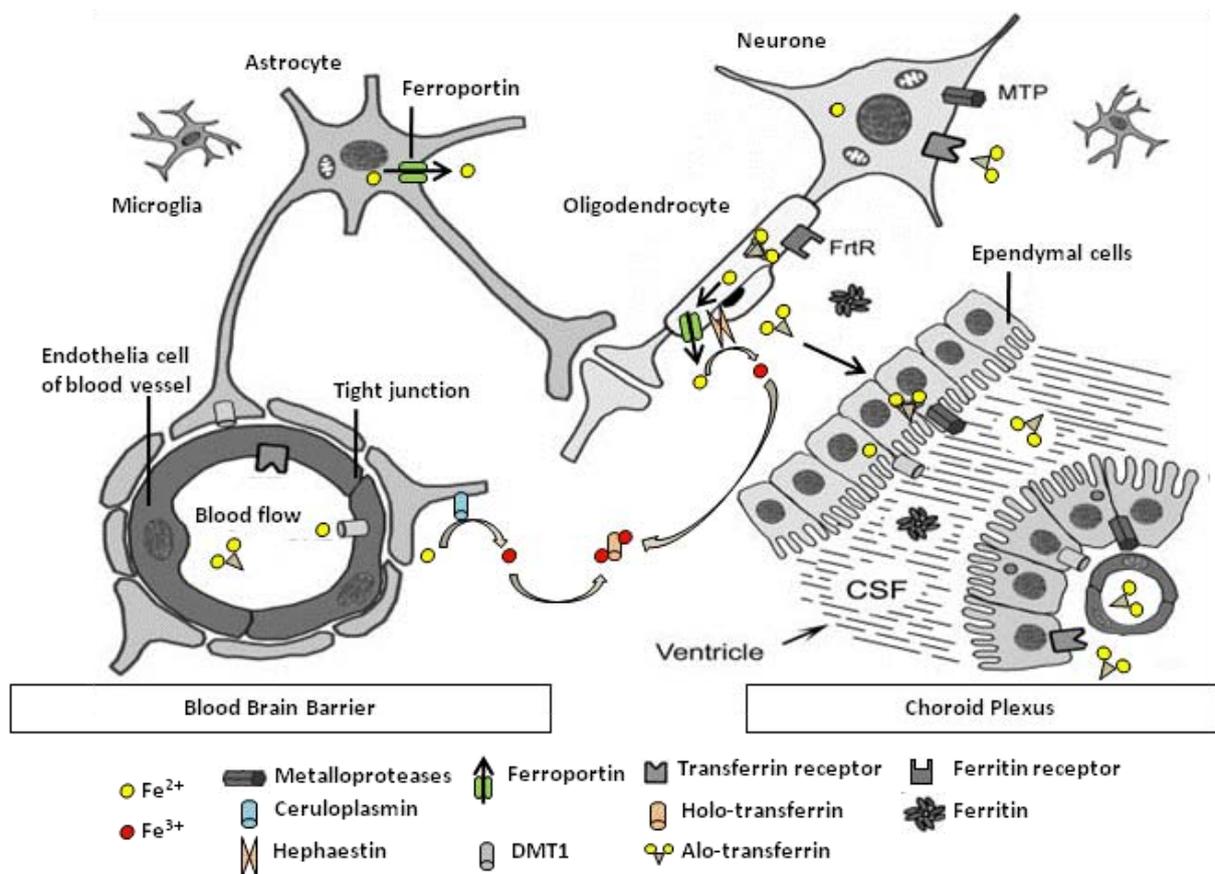
l'homéostasie en fer mitochondrial (Galy et al., 2010). Sortant du cadre de la thématique de la thèse, ces mécanismes ne seront pas approfondis ici.

#### A. V. 2. Passage du fer dans le système nerveux central

Les cellules nerveuses n'ont pas d'accès direct au fer car la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la barrière sang-liquide céphalorachidien (LCR) séparent le SNC de la circulation périphérique (Brightman et al., 1970, Ballabh et al., 2004).

La BHE exprime un grand nombre de protéines du métabolisme du fer décrites précédemment en périphérie (section A. III. 4. a). En effet, des travaux ont montré la présence du récepteur de la transferrine 1 (TfR1) sur la face luminale des cellules endothéliales de la BHE, permettant de capter le fer de la circulation sanguine (Moos, 2002). De plus, d'autres études ont mis en évidence la présence de ferroportine1 (FPN1) sur l'endothélium de la BHE qui assurerait l'extraction du fer directement vers le liquide interstitiel (Wu et al., 2004, McCarthy and Kosman, 2013) (**Figure 9**).

Par ailleurs, les cellules endothéliales sont en contact avec les projections astrocytaires, qui expriment une forme membranaire de ferriréductase, la céruloplasmine. Cette dernière faciliterait le transport effectué par FPN1 vers les cellules adjacentes (Kono, 2012) (**Figure 9**). Comme les cellules épithéliales de la muqueuse du duodénum, les cellules endothéliales du SNC expriment fortement le facteur inductible par l'hypoxie (HIF) sensible à la baisse des taux d'oxygène et par conséquent aux niveaux de fer (Tian et al., 1997). Ainsi, la présence de facteur HIF au niveau de la vascularisation cérébrale soulève l'hypothèse selon laquelle le flux sanguin local serait régulé à la fois par l'hypoxie et le manque de fer.



**Figure 9:** Représentation schématique de la transition du fer depuis la circulation sanguine vers le système nerveux central à travers la barrière hémato-encéphalique et le plexus choroïde. Adapté de (Beard, 2003).

CSF=liquide céphalo-rachidien ; MTP=métalloprotéase ; FrtR=récepteur de la ferritine.

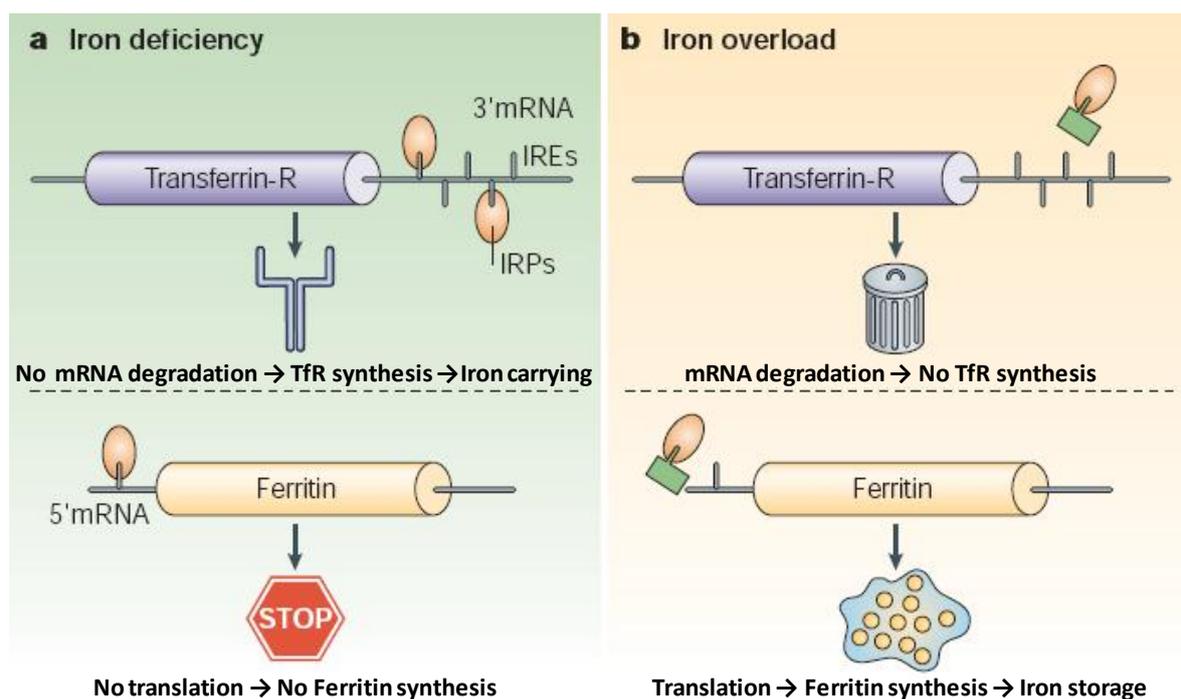
Il semblerait que les cellules endothéliales au niveau de la BHE ne soient pas l'unique voie d'entrée du fer dans le SNC (Moos, 2002, Rouault and Cooperman, 2006). En effet, la transferrine est principalement synthétisée et sécrétée par les oligodendrocytes et les cellules du plexus choroïde (Zakin et al., 2002). Comme les cellules de la BHE, les cellules épithéliales du plexus choroïde expriment les protéines standard intervenant dans le transit du fer (Rouault and Cooperman, 2006). Cependant, contrairement aux capillaires de la BHE, ceux du plexus choroïde sont fenêtrés et l'holo-transferrine peut ainsi facilement franchir les cellules endothéliales pour atteindre la membrane basolatérale de l'épithélium choroïdal. Lors de l'entrée dans le liquide interstitiel ou le LCR, le fer se lie à la transferrine pour former l'holo-transferrine (transferrine- $\text{Fe}^{3+}$ ) et diffuse à travers ces deux liquides dans le parenchyme cérébral (Bradbury, 1997), afin de délivrer le fer aux cellules nerveuses exprimant le récepteur de la transferrine (TfR). Selon les besoins en fer des cellules du SNC, l'apo-transferrine (transferrine capable de capter des atomes de fer) et/ou l'holo-transferrine,

passent dans les granulations de l'arachnoïde vers les veines qui renvoient le sang dans la circulation sanguine périphérique (Bradbury, 1997, Moos, 2002).

### A. V. 3. Métabolisme du fer au niveau central

Comme la plupart des cellules du corps, les cellules du SNC expriment l'ensemble des protéines associées au métabolisme du fer (TfR, DMT1, ferritine, mitoferrine1 et 2, FPN1, IRPs,..., etc.) (Rouault, 2006), mais de manière différenciée suivant le type cellulaire et la structure cérébrale. Ainsi, les oligodendrocytes expriment majoritairement la transferrine et les neurones le récepteur de la transferrine (Connor et al., 1990) (**Figure 10**). La ferritine est principalement exprimée dans les oligodendrocytes, les astrocytes et la microglie, mais minoritairement dans les neurones (Connor et al., 1990). La plupart des cellules nerveuses acquièrent le fer par l'intermédiaire de TfR et DMT1, le stockent dans la ferritine et l'exportent par la ferroportine. L'activité de cette dernière est facilitée par l'action des ferroxidases, telles que la ceruloplasmine (protéine circulante majoritairement synthétisée par les astrocytes) et l'hephaestine (protéine transmembranaire majoritairement synthétisée par les oligodendrocytes) (Hadziahmetovic et al., 2008) (**Figure 10**).

Les protéines régulatrices du fer (IRP1 et 2), contrôlent l'homéostasie post-transcriptionnelle du fer dans la plupart des types cellulaires, dont les cellules nerveuses (Hentze et al., 2010). Deux cibles majeures des IRP, sont les sites de liaisons des gènes codant pour la ferritine et le TfR (Meyron-Holtz et al., 2004). En effet, dans les cellules appauvries en fer l'action des IRP peut soit empêcher la traduction de la ferritine, soit empêcher dégradation du transcrit du gène codant pour le TfR (**Figure 10**). Ces deux processus permettent d'augmenter la disponibilité du fer en augmentant simultanément l'absorption du fer *via* les TfR et en diminuant les taux de fer stocké par la ferritine. Les deux processus inverses se produisent dans les cellules surchargées en fer (Rouault, 2013). Ainsi, chaque type cellulaire du SNC régule sa propre homéostasie en fer selon ses besoins spécifiques et ses fonctions (Rouault, 2006).



**Figure 10 :** Schéma de la régulation de la synthèse de transferrine et de ferritine en condition de carence (a) ou d'excès (b) de fer dans le système nerveux central. Adapté de (Zecca et al., 2004).

IRP=protéine de régulation du fer; IRE=élément de régulation du fer.

En faisant majoritairement intervenir la ferritine, le système de stockage du fer du SNC est similaire à celui décrit en périphérie, cependant un autre mécanisme de stockage spécifique au SNC implique la neuromélanine. La neuromélanine est un pigment retrouvé majoritairement dans la substance noire compacte (SNc) et qui a la capacité de fixer le fer (Zecca et al., 2001). En effet, bien que la majorité du fer soit stockée dans la ferritine, 10 à 20% sont retrouvés dans la substance noire (SN) (Zecca et al., 2001). Une perturbation dans la structure de la ferritine peut induire une accumulation de fer dans le cerveau et engendrer une oxydation excessive et des dysfonctionnements mitochondriaux. Ce phénomène est notamment décrit dans les neuroferritinopathies (Rhodes and Ritz, 2008), aussi connu sous le nom de maladie des ganglions de la base chez l'adulte avec accumulation de fer de type 2. Cette maladie semblerait être causée par une insertion altérant le cadre de lecture de la chaîne légère de la ferritine (Chinnery et al., 2003, Burn and Chinnery, 2006, Rhodes and Ritz, 2008). Par ailleurs, bien que les mécanismes *in vivo* soient encore énigmatiques, le stockage du fer dans la SN, se ferait par la fixation du fer à la neuromélanine (Youdim et al.,

1994, Zecca et al., 2001). La neuromélanine serait un produit de l'auto-oxydation de la dopamine impliquant le fer (Double et al., 2000, Sulzer et al., 2000).

Des études ont montré la présence de deux sites de liaison de faible et forte affinité pour le fer à la structure de la neuromélanine (Double et al., 2003). A des concentrations faibles ou normales de fer, seuls les sites d'affinité élevée sont utilisés. A l'inverse avec des quantités de fer élevées, celui-ci se lie également aux sites de faible affinité restant ainsi sujet aux réactions d'oxydo-réduction, au lieu d'être séquestré sous forme inactive (Double et al., 2002). Des travaux ont montré qu'à l'état normal, la neuromélanine n'est saturée en fer qu'à 50% (Shima et al., 1997). Dans un modèle synthétique de neuromélanine, il a été montré qu'à faible concentration la majorité du fer était fixée au polymère de mélanine et que les radicaux libres n'étaient pas détectés. A concentration moyenne, le fer est toujours lié au polymère mais la quantité de radicaux libres devient détectable. Enfin à forte concentration, la capacité de fixation du polymère de neuromélanine est saturée et l'activité des radicaux libres augmentait proportionnellement avec la concentration en fer (Zareba et al., 1995).

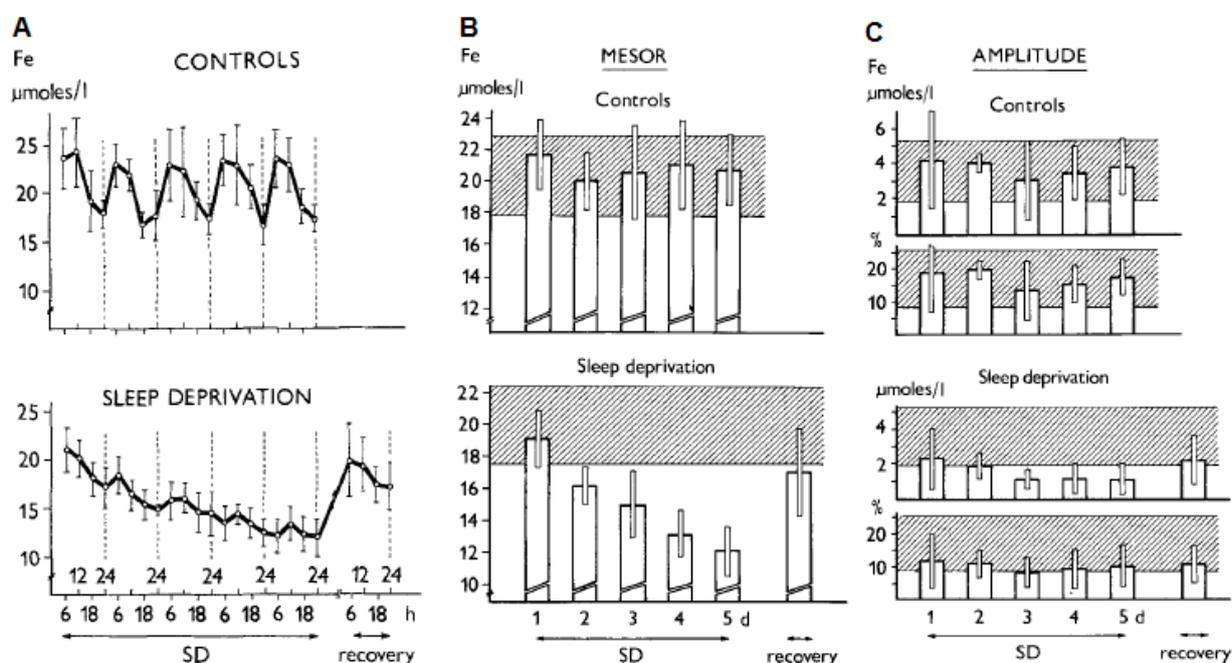
D'autres travaux ont décrit une différence structurelle ainsi que des capacités différentielles d'accrochage du fer à la neuromélanine extraite de mésencéphale de sujets sains ou parkinsoniens. Il semblerait qu'en conditions physiologiques la neuromélanine joue un rôle protecteur en se liant au fer, minimisant ainsi son potentiel d'oxydation dans les neurones. Cependant, en raison de ses faibles niveaux de stockage pour le fer, le rôle protecteur de la neuromélanine serait inefficace lorsque les concentrations en fer sont anormalement élevées (Aime et al., 1997, Lopiano et al., 2000).

#### A. V. 4. Caractère circadien du métabolisme du fer

Comme nous avons pu le voir le métabolisme du fer est régulé par de nombreux acteurs, qui agissent dans différents organes pour maintenir constants les besoins vitaux en fer et éviter les conséquences pathologiques de son accumulation. Bien que le profil de variation journalière du fer soit sujet à controverse, de nombreuses études s'accordent à lui attribuer un caractère circadien.

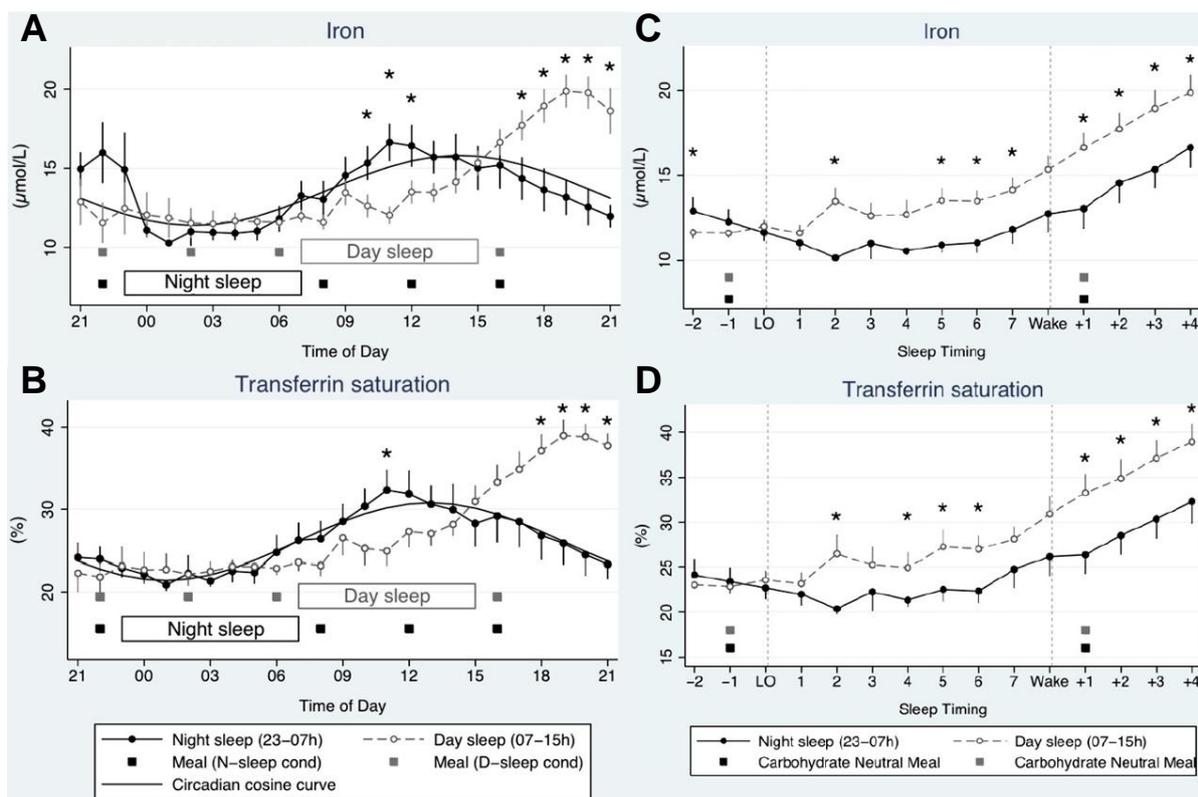
Le caractère circadien des fluctuations de la concentration en fer dans la circulation sanguine périphérique est un phénomène physiologique décrit depuis les années 1940 (Heilmeier, 1937, Höyer, 1944, Hamilton et al., 1950, Kuhn and Brodan, 1982). Les premiers travaux concernant les variations diurnes des taux de fer ont décrit que le fer plasmatique atteignait des taux maximum le matin entre 8h et 12h, alors qu'ils étaient les plus faibles en fin de journée pendant les périodes d'inactivité (Hamilton et al., 1950, Hemmler. G, 1951).

Des travaux réalisés ultérieurement ont confirmé que les taux sériques du fer oscillaient en journée et ont montré qu'elles fluctuaient également pendant le sommeil. Les sujets soumis à une période de privation de sommeil de cinq jours présentaient des taux de fer décroissants, dès la deuxième nuit de privation de sommeil et les taux de fer diminuaient continuellement durant la période de privation (**Figure 11A, B**) (Kuhn and Brodan, 1982). Ces mêmes travaux ont montré une diminution d'amplitude de l'oscillation des taux de fer comparée à celle mesurée chez les sujets contrôles (Kuhn and Brodan, 1982) (**Figure 11C**). Finalement, ces travaux ont indiqué que les taux de fer retournaient à des concentrations quasiment normales après deux nuit de sommeil de 6h (Kuhn and Brodan, 1982).



**Figure 11** : Rythme circadien du fer sérique observé en condition normale (panel du haut) et en période de privation de sommeil (panel du bas) chez l'homme. D'après (Kuhn and Brodan, 1982). **A**- Oscillations de la concentration du fer sérique en condition normale sur 5 jours à 6h, 12h, 18h et 24h, montrant des pics de concentration du fer entre 25 et 23 $\mu\text{moles/L}$  de 6h à 12h du matin. La concentration du fer chez les sujets privés de sommeil décroît continuellement tout au long des 5 jours de privation dès le premier jour de contrainte à l'éveil, atteignant une concentration minimale <15 $\mu\text{moles/L}$ . Le taux de fer augmente à nouveau après 48h de récupération du sommeil et atteint une valeur quasiment normale. **B**- Variations quotidiennes moyennes des taux de fer chez les sujets sains et privés de sommeil. **C**- Variations de l'amplitude des oscillations journalières des taux de fer sérique sur 5 jours, exprimées en valeurs absolues et relatives (% de la valeur moyenne) chez les sujets contrôles et privés de sommeil. La zone grisée représente l'intervalle comprenant les concentrations normales. Les barres d'erreurs représentent  $\pm$  la déviation standard.

De plus, les tentatives pour déterminer le profil journalier des variations du fer et des protéines associées chez l'homme se contredisent, du fait de deux paramètres majeurs, à savoir les heures des prélèvements et les habitudes de sommeil (temps de sommeil total et périodes de sommeil pendant la journée) (Ridefelt et al., 2010). Ainsi, des travaux récents ont mesuré les taux de fer libre et lié à la transferrine, les taux de transferrine et de ferritine dans le sérum, sur un groupe d'individus habitués à dormir soit la nuit de 23h à 7h soit le jour de 7h à 15h. Les sujets étaient implantés de manière permanente avec un cathéter intraveineux permettant de récolter le sang au cours du sommeil sans réveiller les sujets (Ridefelt et al., 2010). Les résultats de cette étude ont permis de retrouver i) le potentiel de variation circadien du fer libre circulant dans le sérum décrit dans les études précédentes, ii) avec un pic de concentration aux alentours de midi (Statland et al., 1973, Kuhn and Brodan, 1982, Scales et al., 1988). Ces travaux ont permis de confirmer les observations précédentes en mettant en évidence un décalage des pics de fer sérique entre les conditions de sommeil nocturne et diurne (**Figure 12A**). Ainsi, les courbes des taux de fer sérique se superposent pendant le sommeil suggérant que le fer varie de la même façon au cours du sommeil diurne et nocturne (**Figure 12C**). Dans ces deux conditions, le fer sérique présente de faibles taux pendant le sommeil, puis ces taux augmentent progressivement après le réveil (**Figure 12A, C**), atteignant une valeur maximale cinq à six heures plus tard, soit vers 12h (après un sommeil nocturne), soit vers 21h (après un sommeil diurne). Ensuite, dans les deux conditions, les taux de fer sérique diminuent à nouveau progressivement après ce pic de concentration jusqu'à la prochaine phase de sommeil (**Figure 12A, C**). De la même manière, les taux de fer lié à la transferrine dans le sérum suivent un profil de variations similaires au cours de la journée (**Figure 12B, D**), alors que les concentrations de ferritine et de transferrine ne sont pas affectées (Ridefelt et al., 2010).



**Figure 12: Variations des concentrations du fer circulant et lié à la transferrine.** Adapté d'après (Ridefelt et al., 2010).

Variations du fer libre (A) et du fer lié à la transferrine (B) sur 24h et variations du fer libre (C) et du fer lié à la transferrine (D) au cours du sommeil. Chaque expérience a été réalisée chez un groupe d'individus dormant soit la nuit de 23h à 7h (courbe à cercles pleins), soit le jour de 7h à 15h (courbe à cercles vides). La ligne cosinus (trait plein) a été ajoutée pour modéliser les variations du fer libre ou lié à la transferrine pendant le sommeil nocturne. Elle illustre le profile circadien normal. \* $p < 0.05$  exprime une différence significative à un temps donné entre le sommeil diurne et le sommeil nocturne. Les barres d'erreurs représentent  $\pm$  l'erreur standard.

Les hypothèses pour expliquer les variations circadiennes du fer dans le sérum sont multiples. En effet, les taux de fer libre sont finement régulés par de nombreuses protéines (section A. III. 4. a-c) et sont majoritairement modulés par le potentiel de liaison du fer libre à ses protéines de transport ou de stockage dans le plasma et le sérum ainsi que l'ont décrit des études réalisées chez le lapin (Schumann and Haen, 1988) et l'homme (Ridefelt et al., 2010). Il a récemment été suggéré que l'hème, qui a la capacité de se lier aux récepteurs nucléaires de type REV-ERB, impliqués dans la physiologie des rythmes circadiens (Raghuram et al., 2007, Burriss, 2008), pourrait influencer la fluctuation journalière des taux de fer sérique et plasmatique. Par ailleurs, l'hepcidine, qui est un peptide sécrété par le foie, joue un rôle important dans l'homéostasie du fer (Nemeth and Ganz, 2006, Camaschella,

2009). Les taux d'hépcidine varient de manière circadienne et corrèlent négativement avec les variations de concentrations journalières du fer sérique, avec un pic de concentration entre 9h et 12h (Kemna et al., 2007), ce qui pourrait en partie expliquer les fluctuations circadiennes du fer.

Finalement, bien que divers paramètres biologiques endogènes influencent la régulation des taux du fer dans l'organisme, les facteurs dépendants du rythme de vie individuel (Ridefelt et al., 2010), réguleraient majoritairement l'équilibre circadien du fer. Notamment les temps de veille ou de sommeil au cours de la journée et plus largement au cours des différentes périodes de la vie d'un individu (Borel et al., 1991).

Le fait que le fer endosse de multiples fonctions et soit utilisé en tant que co-facteur dans de nombreux mécanismes de l'organisme, pourrait expliquer que la régulation des processus physiologiques sous-tendant les propriétés circadiennes du fer, reste à ce jour mal comprise. En revanche, le fer est présent de manière ubiquitaire et la dérégulation locale de son homéostasie peut engendrer diverses pathologies.

**Pour conclure, dans cette partie il a été rappelé que les rythmes biologiques centraux et notamment les cycles veille-sommeil sont régulés de façon complexe par de multiples facteurs impliquant, entre autres, le fer et la dopamine.**

**La partie suivante s'applique à établir le lien entre les mécanismes de régulation du fer et de la dopamine en prenant pour cela deux cas d'école : la maladie de Willis-Ekbom et la maladie de Parkinson. Ces deux maladies neurologiques, dans lesquelles l'altération du sommeil tient une place importante, impliquent chacune, une dérégulation du système dopaminergique, ainsi qu'un déficit ou un excès de fer.**

## B. Lien physiologique et pathologique entre le fer et la dopamine

### B. I. Dialogue fer-dopamine

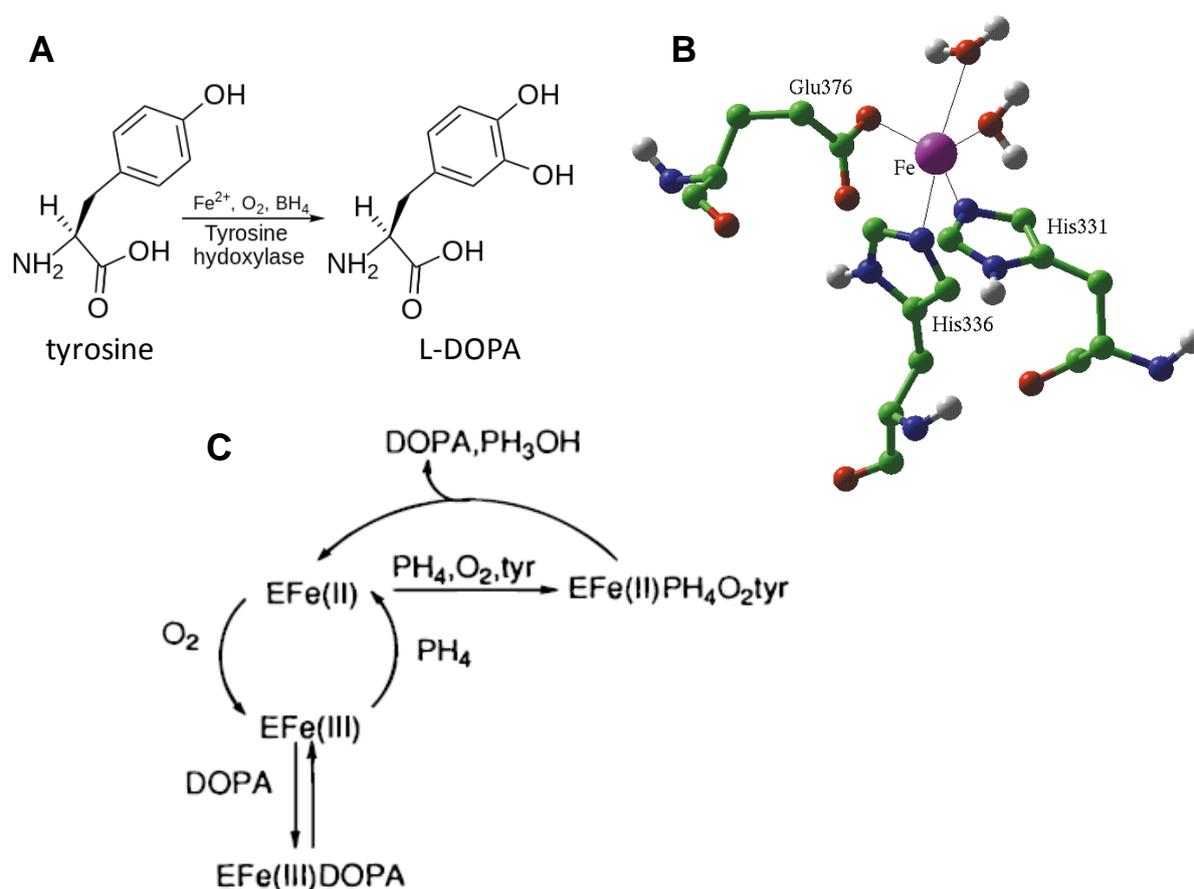
#### B. I. 1. Rôle du fer dans la synthèse de dopamine

Il a été suggéré que le fer jouerait un rôle important dans la régulation de la synthèse de dopamine, non tant par une action directe sur cette dernière mais sur l'enzyme clef initiant sa synthèse : la tyrosine hydroxylase.

La tyrosine hydroxylase (TH ; tyrosine 3-monooxygenase) est l'enzyme initiant et limitant la voie de synthèse des catécholamines. Elle est considérée comme étant le régulateur principal de la biosynthèse de la dopamine dans le SNC. En effet, la TH catalyse la réaction de conversion de la tyrosine en dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (**Figure 13A**), qui sera à son tour convertie en dopamine par l'enzyme de décarboxylation des acides aminés (AADC). La tyrosine hydroxylase appartient à la famille des enzymes mono-oxygénases qui utilisent les cofacteurs tétrahydropteriques comme substrat et possède un atome de fer ferreux au centre de sa structure (**Figure 13B**) (Fitzpatrick, 1999).

L'activité de la TH est positivement régulée par la combinaison de plusieurs paramètres, notamment la présence de cofacteurs tels que le fer et la disponibilité des substrats tétrahydropterine (5,6,7,8-tétrahydrobiopterine : BH4). A l'inverse, son activité est inhibée par une augmentation des concentrations des produits issus de sa transformation notamment la L-DOPA et la dopamine, ainsi que par son état de phosphorylation (Fitzpatrick, 1999). Des quantités élevées du substrat de la TH et sa déphosphorylation régulent négativement l'activité de cette enzyme (Kaushik et al., 2007). De plus, l'état d'oxydoréduction du fer joue un rôle crucial dans la modulation de l'activité de la TH. En effet, le fer peut s'associer à la TH sous sa forme hémique ( $Fe^{3+}$ ) ou non-hémique ( $Fe^{2+}$ ), formant des complexes TH- $Fe^{3+}$  (enzyme oxydée) ou TH- $Fe^{2+}$  (enzyme non oxydée) et moduler ainsi l'activité enzymatique (Ramsey and Fitzpatrick, 1998). Le mécanisme classique implique que le complexe TH- $Fe^{3+}$  est réduit par les cofacteurs tétrahydropteriques, générant le complexe TH- $Fe^{2+}$ , qui va pouvoir catalyser la transformation de la tyrosine en L-DOPA (**Figure 13C**) (Ramsey et al., 1996). Cependant, une deuxième voie a été décrite *in vitro*, montrant la capacité de la L-DOPA à capturer le complexe TH- $Fe^{3+}$ , le rendant inactif et

empêchant ainsi la synthèse de L-DOPA (**Figure 13C**) (Ramsey and Fitzpatrick, 1998). Ce mécanisme de régulation à deux niveaux pourrait expliquer que les taux de L-DOPA puissent être modulés en fonction de la disponibilité des formes oxydées ou non de la tyrosine hydroxylase par le fer. Ainsi, les taux de TH pourraient être régulés aussi bien par les demandes en L-DOPA des cellules que par l'action inhibitrice de la L-DOPA elle-même (Ramsey and Fitzpatrick, 1998). Par conséquent, le maintien de l'homéostasie du métabolisme du fer au niveau du SNC joue un rôle non négligeable dans la régulation de l'activité de la TH et de ce fait dans la biosynthèse de la dopamine.



**Figure 13** : Schémas de la synthèse de la L-DOPA impliquant le fer. D'après (Ramsey and Fitzpatrick, 1998) et (Fitzpatrick, 1999).

**A-** Synthèse de la L-DOPA à partir de la tyrosine. **B-** Localisation de l'atome de fer dans la structure de la tyrosine hydroxylase. **C-** Mécanisme de la régulation à deux niveaux de la production de L-DOPA. E=enzyme (tyrosine hydroxylase) ; BH<sub>4</sub>, PH<sub>4</sub>=tétrahydrobiopterine ; tyr=tyrosine hydroxylase ; DOPA=3,4-dihydroxyphénylalanine.

### B. I. 2. Impact de la dérégulation du fer sur la dopamine

Quelques études ont été réalisées pour évaluer l'impact d'un excès de fer sur la neurotransmission dopaminergique. Il a notamment été démontré que des souris exposées à un régime alimentaire riche en fer, présentent une diminution du nombre de neurones dopaminergiques de la substance noire compacte (SNc) chez les animaux les plus âgés (24 mois) (Kaur et al., 2007). D'autres approches par administration systémiques (injections intra-péritonéales) de fer dextran ont également conduit à une perte importante des neurones de la SNc (Jiang et al., 2006, Jiang et al., 2007). Finalement, des injections stéréotaxiques de fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) dans la SNC induisent une diminution des taux de dopamine et de ces métabolites dans le striatum, ainsi que des déficits moteurs (Ben-Shachar and Youdim, 1991). L'ensemble de ces travaux suggère qu'une augmentation rapide et drastique des taux de fer peut provoquer une altération neuronale de la SNC. Bien que les doses utilisées dans ces différentes approches soient loin de refléter les taux observés dans certaines pathologies impliquant des excès de fer, ces études servent néanmoins de preuve de concept, mettant en évidence un lien causal entre l'excès de fer et la production de dopamine (Snyder and Connor, 2009).

Parce que la ferritine joue un rôle majeur dans le stockage du fer (section A. III. 4. a), des modèles transgéniques ont été développés. Alors que la délétion du gène codant pour la chaîne lourde de la ferritine ne permet pas d'obtenir des animaux viables (Ferreira et al., 2000, Thompson et al., 2003), une surexpression de ce même gène dans les neurones cathécolaminergiques a révélé une résistance des neurones de la SNc à une intoxication au 1-méthyl-4-phényl 1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) (Kaur et al., 2003). Ceci montre que la ferritine exerce une fonction neuroprotectrice sur les neurones exprimant la TH et le fait que ceux-ci ne l'expriment qu'en faible quantité en condition normale, pourrait contribuer à leur vulnérabilité, observée dans les maladies neurodégénératives (Snyder et al., 2009). Enfin, un modèle murin avec une délétion du gène codant pour la protéine de régulation du fer IRP2 a révélé des anomalies motrices et une perte neuronale accrue lors du vieillissement (24 mois). De plus, ces mêmes animaux présentaient des taux légèrement diminués de TH dans le striatum (Salvatore et al., 2005).

Par ailleurs, les voies dopaminergiques semblent être systématiquement sensibles à la carence cérébrale régionale en fer (Ben-Shachar et al., 1985, Youdim, 1990, Nelson et al., 1997, Morse et al., 1999, Erikson et al., 2000, Erikson et al., 2002). Il a été montré que le transporteur de la dopamine était significativement diminué dans le striatum et le noyau accumbens qui sont des structures majoritairement dopaminergique (Erikson et al., 2000). Le fer interviendrait également dans la régulation de certains récepteurs dopaminergiques,

notamment les sous types de récepteurs D2 (Unger et al., 2008). Des études menées par Youdim et collègues ont démontré des densités significativement diminuées du récepteur D2 de la dopamine dans le striatum de rats carencé en fer.

Des recherches plus récentes ont mis en évidence que le noyau accumbens est également sensible aux effets de la carence en fer (Yehuda, 1987, Youdim, 1990, Erikson et al., 2001).

Des expériences de microdialyse *in vivo* ont démontré que les taux de dopamine extracellulaire augmentaient dans le striatum de rats adultes carencés en fer et revenaient à la normale lorsque des taux normaux de fer étaient rétablis (Chen, 1995, Nelson et al., 1997). A l'inverse, des résultats obtenus par Beard et collègues, ont montré que les taux de certains récepteurs de la dopamine localisés dans le striatum et la SNc ne peuvent être restaurés en cas de carence martiale néonatale (Beard and Connor, 2003).

**Ainsi, l'homéostasie du fer est étroitement liée au métabolisme de la dopamine et l'augmentation ou la diminution anormale des concentrations en fer peut générer d'importantes modifications sur le fonctionnement des voies de synthèse de la dopamine et de ses récepteurs. La partie suivante présente deux maladies neurologiques impliquant des anomalies de la dopamine, du fer ainsi que des troubles du repos.**

## B. II. Maladie de Willis-Ekbom

### B. II. 1. Généralités

La première observation médicale du syndrome des jambes sans repos, récemment renommé maladie de Willis-Ekbom (MWE), a été faite en 1685 par Sir Thomas Willis, mais ce n'est qu'en 1945 que le docteur suédois Karl Ekbom, a permis de mieux définir le cadre nosologique de la MWE dans sa thèse de médecine.

La MWE est l'une des pathologies neurologiques sensorimotrice les plus fréquentes mais n'en reste pas moins, l'une des plus méconnues. A partir de 1996, grâce aux critères diagnostic établis par Ondo et collègues (Ondo and Jankovic, 1996) puis redéfinis ensuite en 2003 par Allen (Allen et al., 2003a), les enquêtes épidémiologiques ont mieux estimé la fréquence de cette maladie. Dans les pays occidentaux, celle-ci varie entre 7% et 11% de la population générale (Berger et al., 2004, Allen et al., 2005). La fréquence de la MWE reste toutefois difficile à évaluer en raison des symptômes souvent très modérés au début de son évolution.

A ce jour, une seule enquête a évalué la fréquence de la MWE en France (Tison et al., 2005). Elle a été réalisée sur un échantillon représentatif de la population française de 10 263 individus âgés de 18 ans et plus. La fréquence de la MWE était de 8,5%. La moitié des sujets avait des symptômes hebdomadaires et 23% avaient des symptômes quotidiens. Cette étude a révélé que les femmes étaient plus touchées que les hommes, et ceci quelle que soit la tranche d'âge considérée, avec des fréquences respectives de 11% et de 6%. La moyenne d'âge des sujets atteints était de 48 ans, celle de début était de 35 ans et d'autres membres de la famille étaient atteints dans environ 41% des cas. Cette enquête a montré que le pic de fréquence de la MWE était atteint à 64 ans, pour décroître par la suite.

Bien que les membres inférieurs étaient toujours touchés, les membres supérieurs étaient également affectés chez 16% des sujets. Dix-sept pour cent des patients avaient des symptômes sévères et 4% avaient des symptômes très sévères. Ces derniers étaient plus âgés et étaient surtout de sexe féminin. De manière surprenante, seule la moitié des sujets avait consulté un médecin mais seulement 5% avaient reçu un diagnostic correct. Dans l'ensemble, cette enquête française a confirmé les observations faites dans les autres pays occidentaux et a surtout permis de souligner la méconnaissance et la mauvaise prise en charge de la MWE en France.

## B. II. 2. Clinique

### *B. II. 2. a. Symptômes*

La MWE se caractérise par des sensations extrêmement désagréables parfois douloureuses dans les membres inférieurs et s'accompagnent d'un besoin irrésistible de bouger. Les symptômes sont nettement plus sévères en fin de journée. Ils sont aggravés par l'immobilité prolongée et sont soulagés au moins partiellement et temporairement par le mouvement (Michaud et al., 2002a, Allen et al., 2003b). Ces symptômes sont à la base des quatre critères diagnostics de la MWE.

**Critères cliniques obligatoires de la MWE, d'après (Allen et al., 2003a)**

---

1- Le besoin impérieux de bouger les jambes, habituellement accompagné ou causé par des sensations inconfortables et désagréables dans les jambes (les membres supérieurs ou les autres parties du corps peuvent parfois être affectés en plus des jambes).

2- Le besoin impérieux de bouger les jambes ou les sensations désagréables apparaissent ou s'aggravent lors des périodes de repos ou d'inactivité, particulièrement dans la position allongée ou assise.

3- Le besoin impérieux de bouger les jambes ou les sensations désagréables sont partiellement ou totalement soulagés par les mouvements, tels que la marche ou l'étirement, au moins aussi longtemps que dure l'activité.

4- Le besoin impérieux de bouger les jambes ou les sensations désagréables sont plus marqués le soir ou la nuit que pendant la journée ou ne surviennent qu'en soirée ou la nuit.

---

La MWE est donc responsable d'insomnies sévères caractérisées par des troubles de l'initiation et/ou du maintien du sommeil. Ainsi, les patients présentent souvent des symptômes qui peuvent être attribués à un sommeil insuffisant ou perturbé, tels que l'hyperactivité, la somnolence diurne, les céphalées, la fatigue physique, les troubles de l'humeur et de la mémoire (Abetz et al., 2004, Allen et al., 2005, Pearson et al., 2006). De plus, La difficulté à rester immobile, particulièrement en soirée, peut également entraîner des restrictions dans les activités sociales ou récréatives. Ainsi, la qualité de vie des patients peut s'en trouver substantiellement altérée, notamment dans les formes sévères de la maladie (Allen et al., 2003a, Abetz et al., 2004, Allen et al., 2005).

D'autres critères peuvent aider à confirmer le diagnostic puisque la MWE s'accompagne chez plus de 80% des patients de mouvements périodiques du sommeil (MPS, mouvements involontaires et répétitifs des membres inférieurs) associés ou non à des micro-éveils conduisant à une fragmentation de l'architecture du sommeil (Montplaisir et al., 1997).

*B. II. 2. b. Caractère circadien de la maladie*

L'évolution circadienne des symptômes de la MWE est une caractéristique fondamentale de la maladie (critères cliniques obligatoires). En effet, des tests d'immobilisation suggérée réalisés sur des patients atteints de MWE ont révélé que les scores subjectifs d'inconforts atteignaient des maximums entre minuit et 6 heures du matin

(Hening et al., 1999b, Trenkwalder et al., 1999a, Michaud et al., 2004). De même, la mesure des MPS montre une plus grande occurrence à ces heures (Trenkwalder et al., 1999a, Michaud et al., 2004). De manière intéressante, ces mêmes études ont mis en évidence une relation entre la manifestation des symptômes de la MWE et les variations nocturnes de la température corporelle, ainsi que des concentrations de mélatonine (neurohormone sécrétée pendant la nuit, jouant un rôle central dans la régulation des rythmes biologiques) (Michaud et al., 2004). Néanmoins, ces deux paramètres ne sont pas modifiés chez les patients atteints de MWE, suggérant que d'autres facteurs biologiques entrent en cause (Hening et al., 1999b, Trenkwalder et al., 1999a, Tribl et al., 2003, Michaud et al., 2004).

Ainsi, il a été suggéré qu'un dysfonctionnement du métabolisme du fer et/ou de la dopamine joue un rôle important dans le caractère circadien des symptômes de la MWE. En effet, il a été montré que les taux de dopamine et ceux du fer présentent des variations circadiennes (sections A. III. 3. a et A. III. 4. d, respectivement). Les périodes auxquelles se manifestent les symptômes de la MWE coïncident avec les taux journaliers les plus faibles de ces deux paramètres (Scales et al., 1988, Earley et al., 2005, Earley et al., 2006a).

Des prélèvements de LCR n'ont pas révélé de différences pour les concentrations de dopamine et de sérotonine dans le LCR des patients atteints de la MWE comparées à celles des sujets sains (Earley et al., 2001, Stiasny-Kolster et al., 2004). Cependant, des variations entre les deux moments de la journée auxquels les prélèvements ont été réalisés, ne peuvent pas être exclues. En effet, une autre étude a mis en évidence d'importantes variations journalières des concentrations de 3-O-méthyl-dopa, un catabolite de la L-DOPA, ainsi que des taux de tétrahydrobioptérine, co-facteur de la synthèse de dopamine, dans le LCR des patients atteints de la MWE (Earley et al., 2006a).

Par ailleurs, les données concernant les quantités de fer dans le LCR chez les patients atteints de la MWE sont contradictoires. Certains ont rapporté une baisse des taux fer dans le LCR des patients, alors que d'autres montrent que ces taux sont légèrement augmentés sans pour autant être significativement différents des sujets sains (Earley et al., 2000, Mizuno et al., 2005). Les différences reportées pour les taux de fer du LCR des patients atteints de la MWE pourraient être attribuées à l'évolution de la maladie (Earley et al., 2005), à l'âge des patients (Allen and Earley, 2000), ainsi qu'aux heures de prélèvements. Ainsi, il reste encore à déterminer si les concentrations de fer du SNC suivent la variation circadienne retrouvée au niveau sérique et dans quelle mesure cela pourrait avoir un impact sur l'expression de la TH, la synthèse de L-DOPA et celle de la dopamine qui en résulte.

Finalement, il apparaît qu'une altération du métabolisme dopaminergique et de celui du fer constituent une part importante dans les recherches actuelles concernant l'étiologie de la MWE (Allen, 2002, Connor et al., 2003, Rye, 2004, Clemens et al., 2006, Earley et al., 2006a, Allen and Earley, 2007, Connor et al., 2009).

### B. II. 3. Physiopathologie

La physiopathologie de la MWE reste méconnue à ce jour. Différentes hypothèses ont cependant été avancées, telle que l'hypothèse hypodopaminergique. En effet, la mise en évidence d'une majoration de l'excitabilité médullaire chez les patients affectés par la MWE était en faveur d'un défaut des mécanismes d'inhibition médullaire, exercé par les systèmes dopaminergiques descendants. Ceux-ci prendraient leur source au niveau de la région dopaminergique hypothalamique A11, à l'origine de la voie diencéphalospinale, et exerceraient leur effet inhibiteur sur l'excitabilité médullaire par l'intermédiaire des récepteurs dopaminergiques de type D2-D3.

A l'inverse, les données les plus récentes obtenues par tomographie par émission de positons (TEP) ont montré une réduction de transporteur de la dopamine (DAT) au niveau striatale ainsi qu'une réduction de la capacité de liaison des récepteurs dopaminergiques de type D2 au niveau du striatum (Earley et al., 2011, Earley et al., 2013). L'ensemble de ces résultats plaiderait en faveur d'une augmentation de l'activité dopaminergique présynaptique du système nigrostrié.

#### *B. II. 3. a. Dérégulation du système dopaminergique*

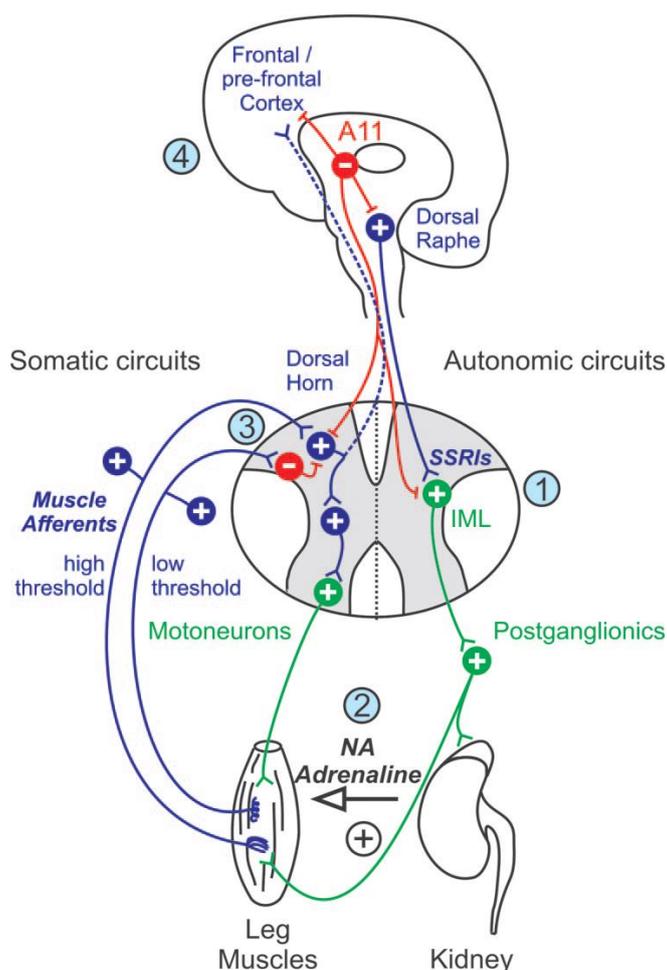
L'hypothèse d'une implication des systèmes dopaminergiques dans la physiopathologie de la MWE a été proposée suite à l'observation de (i) la réponse pharmacologique excellente des médications dopaminergiques (Akpınar, 1982, Montplaisir et al., 1986) et en particulier des agonistes dopaminergiques des récepteurs de type D2/D3 (Winkelmann et al., 1998, Hening et al., 1999a, Trenkwalder et al., 2004) et (ii) l'aggravation des symptômes par des bloqueurs de la libération dopaminergique (Montplaisir et al., 1991, Kraus et al., 1999).

De manière intéressante, des études épidémiologiques ont décrit une prévalence plus importante de la MWE chez une population de personnes atteintes de la maladie de Parkinson (MP). En effet, la prévalence de la MWE varie de 3% à 14% chez les personnes atteintes de la MP (Kumar et al., 2002, Loo and Tan, 2008) alors qu'elle est de 1% à 6% dans la population contrôle (Kumar et al., 2002, Calzetti et al., 2009).

Cependant, les travaux portant sur une dysfonction potentielle de la voie dopaminergique nigro-striée chez des patients atteints de la MWE par des techniques d'imagerie, ont produit des résultats très contradictoires. Dans l'ensemble, ces études ne semblent pas indiquer de déficit tant au niveau pré- que post-synaptique dans la MWE (Trenkwalder et al., 1999b, Turjanski et al., 1999, Eisensehr et al., 2001, Michaud et al., 2002b). Les rares études anatomopathologiques n'ont également pas décelé de perte cellulaire au niveau de la SN de patients affectés par la MWE (Connor et al., 2003). Ces résultats concordent finalement avec l'absence de déficit moteur chez ces patients.

Etant donné la symptomatologie plutôt élémentaire de la MWE et l'absence à ce jour d'argument solide en faveur d'une implication formelle de la voie nigro-striée, une implication de la voie diencephalospinale a été proposée (Clemens et al., 2006). En effet, ce modèle physiopathologique donne un rôle central à la voie diencephalospinale dans la genèse des symptômes sensori-moteurs de cette maladie (**Figure 14**, voie rouge). Ce modèle propose que (i) les projections dopaminergiques de la région A11 régularaient l'excitabilité des neurones de la colonne dorsale, des motoneurones, et de la colonne intermédiolatérale, (ii) un dysfonctionnement de cette voie entraînerait respectivement, *via* une désinhibition de la colonne intermédiolatérale et des circuits somatosensoriels, une augmentation de l'activité autonome et des entrées sensorielles, (iii) la libération de noradrénaline serait augmentée suite à la désinhibition autonome ce qui provoquerait une majoration du tonus musculaire, (iv) une altération des voies dopaminergiques vers le cortex frontal serait susceptible de majorer la perception musculaire désagréable, (v) enfin, une désinhibition des voies excitatrices sérotoninergiques pourrait également majorer l'activité autonome.

Un autre argument en faveur d'une implication du système diencephalospinal dans la physiopathologie de la MWE est la localisation hypothalamique de l'aire A11, relativement proche du noyau suprachiasmatique, structure connue pour son rôle dans le contrôle des rythmes circadiens. Ainsi, il a été suggéré que cette proximité pouvait expliquer l'influence des rythmes circadiens sur les symptômes de la MWE, ceux-ci étant plus importants le soir (Paulus and Schomburg, 2006).



**Figure 14 :** Représentation schématique des projections connues des neurones de l'aire A11 (en rouge), de leurs interactions avec les circuits spinaux et les conséquences hypothétiques de leur dysfonction. D'après (Clemens et al., 2006). IML=colonne intermédiolatérale ; NA=noradrénaline ; SSRIs=inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine.

Les structures médullaires semblent jouer un rôle essentiel dans la physiopathologie de la MWE car elles constituent à la fois le premier niveau d'intégration des informations somesthésiques et le dernier niveau de l'information motrice, correspondant à la symptomatologie de la MWE (sensations désagréables soulagées par le mouvement).

En outre, il a été établi que des lésions (traumatique, vasculaire ou tumorale) ou pathologies médullaires (sclérose en plaques, syringomyélie) pouvaient être responsables d'une MWE secondaire, le plus souvent associées à des MPS (Hartmann et al., 1999). Une étude de Bara-Jimenez et collègues, portant sur les réflexes médullaires a également montré une augmentation de l'excitabilité médullaire (seuil d'excitabilité abaissé et réponse de plus grande amplitude) chez des patients atteints de la MWE, et ce, de façon plus nette durant le

sommeil (Bara-Jimenez et al., 2000). L'augmentation de la latence de la réponse R3 du réflexe nociceptif de flexion, suggère qu'il existe une désinhibition anormale des systèmes spinaux. Concernant le réflexe H, les auteurs signalent, après stimulation du nerf sciatique poplité interne, une augmentation de la facilitation tardive et une diminution de l'inhibition tardive, indiquant une diminution globale de l'activité inhibitrice des voies descendantes contrôlant les reflexes segmentaires médullaires dans la MWE.

*B. II. 3. b. Impact d'un déficit de fer sur le système dopaminergique*

Une part importante de la littérature a été consacrée aux rapports existant entre le métabolisme du fer et la MWE. Son implication a été proposée suite à la démonstration qu'une carence en fer aggrave la MWE (Allen and Earley, 2007), alors qu'une supplémentation en fer améliore notablement l'inconfort qu'éprouvent certains de ces patients (O'Keeffe et al., 1994).

Il est intéressant de constater que des liens entre le métabolisme dopaminergique et celui du fer ont été mis en évidence (Fitzpatrick, 1989, Ramsey et al., 1996) argumentant ainsi leur implication dans la MWE. En effet, l'imagerie cérébrale des patients montre une réduction de la concentration en fer dans certaines régions cérébrales pouvant être potentiellement impliquées dans la physiopathologie de la MWE, comme la SNc, principale région dopaminergique (Earley et al., 2006b). De plus, des études anatomopathologiques sur des cerveaux de patients affectés par la MWE, attestent d'un marquage en fer diminué au niveau des neurones dopaminergiques de la SNc, conformément aux données de l'imagerie cérébrale (Connor et al., 2003, Connor et al., 2004, Pittock et al., 2004). Ceci conclut à un défaut de la capture du fer par ces mêmes neurones, ce qui pourrait en altérer le fonctionnement et conduire finalement aux symptômes de la MWE.

Par ailleurs, des marquages histologiques réalisés sur des coupes de cerveaux de patients atteints de la MWE ont révélé l'absence du peptide de la chaîne lourde de la ferritine dans les cellules contenant la neuromélanine, suggérant un manque de ferritine dans les neurones à mélanine des patients (Connor et al., 2003). Ce déficit en ferritine pourrait engendrer une diminution du stockage du fer dans ces cellules, observé chez les patients atteints de la MWE.

En outre, le récepteur de la transferrine normalement présent dans les neurones à mélanine issus de sujets sains, n'est que faiblement détecté dans ceux provenant de sujets atteints de la MWE (Connor et al., 2003). Paradoxalement, ce résultat ne correspond pas avec un profil classique de déficience en fer dans les cellules, qui devrait alors augmenter la production du récepteur de la transferrine (section A. III. 4.c). L'absence de ferritine et l'expression faible du

récepteur de la transferrine sont des observations en contradiction avec le fait que les cellules à neuromélanine des patients atteints de la MWE, contiennent toute la machinerie permettant de réguler le pool de fer labile (Connor et al., 2004).

Bien que certaines formes de la MWE soient associées à une carence en fer, il existe quelques cas isolés pour lesquels une comorbidité de la MWE avec l'hémochromatose (Barton et al., 2001) ou avec la maladie de Parkinson (Nomura et al., 2006, Gomez-Esteban et al., 2007) a été reportée. Dans le cas d'une MWE associée à une hémochromatose, des quantités anormalement basses de fer dans la SNc ont été décrites, paradoxalement aux taux élevés de fer dans la circulation sanguine périphérique (Haba-Rubio et al., 2005).

#### B. II. 4. Traitements du syndrome de Willis-Ekbom

Les médicaments mimant l'action de la dopamine constituent le traitement de première intention et restent à ce jour les plus efficaces. En France, trois agonistes dopaminergiques ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché : le ropinirole, le pramipexole et la rotigotine (Winkelmann et al., 1998, Trenkwalder et al., 2004). En cas d'inefficacité ou d'effets secondaires indésirables de la thérapie dopaminergique (tels qu'un syndrome d'augmentation, une somnolence diurne excessive, des insomnies, des nausées ou encore un trouble du contrôle des impulsions notamment après plusieurs années de traitement) (Allen and Earley, 1996, Hogl et al., 2010, Lipford and Silber, 2012), d'autres médications peuvent également être prescrites en deuxième intention. Ainsi, certains antiépileptiques, comme la gabapentine, ont démontré leur efficacité dans le traitement de la MWE (Garcia-Borreguero et al., 2002). Les opiacés intervenant sur le système de la douleur sont aussi utilisés, souvent à la demande, en particulier pour les cas de résistance au traitement par la dopamine. Leur usage doit cependant rester limité en raison du risque de dépendance que ces substances peuvent induire (Walters et al., 2001). Les benzodiazépines, notamment le clonazepam, par leurs propriétés analgésiques et sédatives sont également efficaces. Elles restent néanmoins peu prescrites en raison de leurs nombreux effets secondaires (accoutumance, somnolence, troubles de la mémoire...) (Clavadetscher et al., 2004).

Une autre cible thérapeutique pour la MWE, en cas de carence en fer avérée, vise à rétablir les taux de fer par supplémentation en fer. Une étude a montré qu'une dose unique de fer dextran de 1000mg, administrée par infusion intraveineuse, améliorerait les symptômes chez les patients atteints d'une MWE précoce mais pas chez ceux atteints d'une MWE tardive (Earley et al., 2004). En effet, chez les patients qui répondaient positivement à ce

traitement, les études ont permis de mettre en évidence une augmentation du fer dans la substance noire et une amélioration significative des symptômes (Earley et al., 2004). Si le réapprovisionnement en fer par voie intraveineuse s'avère efficace, il est néanmoins nécessaire de contrôler les risques de stress oxydatif induits par un potentiel excès de fer.

#### B. II. 5. Intérêts des modèles animaux

Sur la base des hypothèses physiopathologiques, différentes tentatives ont été menées afin de modéliser la MWE chez l'animal, en particulier chez le rongeur. Néanmoins, en partie en raison de la nature subjective des symptômes et surtout en l'absence de consensus reconnu concernant la physiopathologie de la maladie, ces tentatives se sont avérées difficiles.

##### *B. II. 5. a. Modèles rongeurs*

Basée sur la constatation de l'augmentation des mouvements MPS avec l'âge (Ancoli-Israel et al., 1991), une approche comportementale spontanée a été tentée chez le rat âgé. Cette étude, réalisée par l'équipe de Baier, a caractérisé une population de rats âgés développant des mouvements nocturnes des membres postérieurs, cependant les auteurs n'ont pas testé l'effet d'agonistes dopaminergiques sur ces animaux (Baier et al., 2002). Une autre étude a évalué les MPS chez des rats spinaux lésés au niveau cervical et montré que ceux-ci exprimaient des mouvements spontanés durant le sommeil léger dont les profils ressemblaient aux MPS observés chez l'homme (Esteves et al., 2004).

#### **Effet d'une carence alimentaire en fer couplée à une lésion 6-OHDA**

Plus proches de l'hypothèse d'une implication de la voie diencephalospinale, des approches lésionnelles ciblant la région A11 ont été tentées chez le rat par des injections de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) au niveau de la région A11 (Ondo et al., 2000). Les lésions bilatérales ainsi induites ont conduit à un comportement hyperactif des animaux et à une augmentation significative du « temps passé debout » et du nombre de redressements comparé aux contrôles. De manière intéressante, ces modifications comportementales ont été réduites par l'administration d'un agoniste dopaminergique, le pramipexole. Ainsi, elle fut la première à tester la validité d'une implication de la voie diencephalospinale dans la physiopathologie de la MWE.

La même équipe a réalisé des lésions de la région A11 par la 6-OHDA chez des souris carencées en fer (Qu et al., 2007). L'activité locomotrice s'est révélée augmentée chez les animaux carencés en fer par rapport aux contrôles. De plus, chez les souris lésées au niveau de la région A11 et carencées en fer, l'augmentation de l'activité locomotrice s'est avérée encore plus importante. Enfin, un traitement par des agonistes dopaminergiques des récepteurs D2/D3 (ropinirole) a permis aux animaux lésés et carencés de diminuer leur activité locomotrice. En revanche, l'utilisation de l'agoniste D1, le SKF 38393, n'a pas diminué mais aggravé l'augmentation de l'activité locomotrice de ces animaux. Dans la continuité, les auteurs ont regardé chez ces animaux si les niveaux d'expression des récepteurs dopaminergiques au niveau médullaire étaient modifiés. La carence en fer a entraîné une augmentation du récepteur D1 sans affecter les niveaux des récepteurs D2 et D3. La lésion de l'aire A11 a en revanche, conduit à une diminution des récepteurs D2 et D3 mais a eu peu d'effet sur les récepteurs D1. Enfin, la privation en fer associée à une lésion de la région A11 a provoqué une diminution synergique plus importante des récepteurs D2 médullaires (Zhao et al., 2007).

Une autre étude a récemment souligné chez la souris carencée en fer, une augmentation de l'éveil au détriment des périodes de sommeil lent profond ou de sommeil paradoxal pendant la fin de leur phase active (Dean et al., 2006).

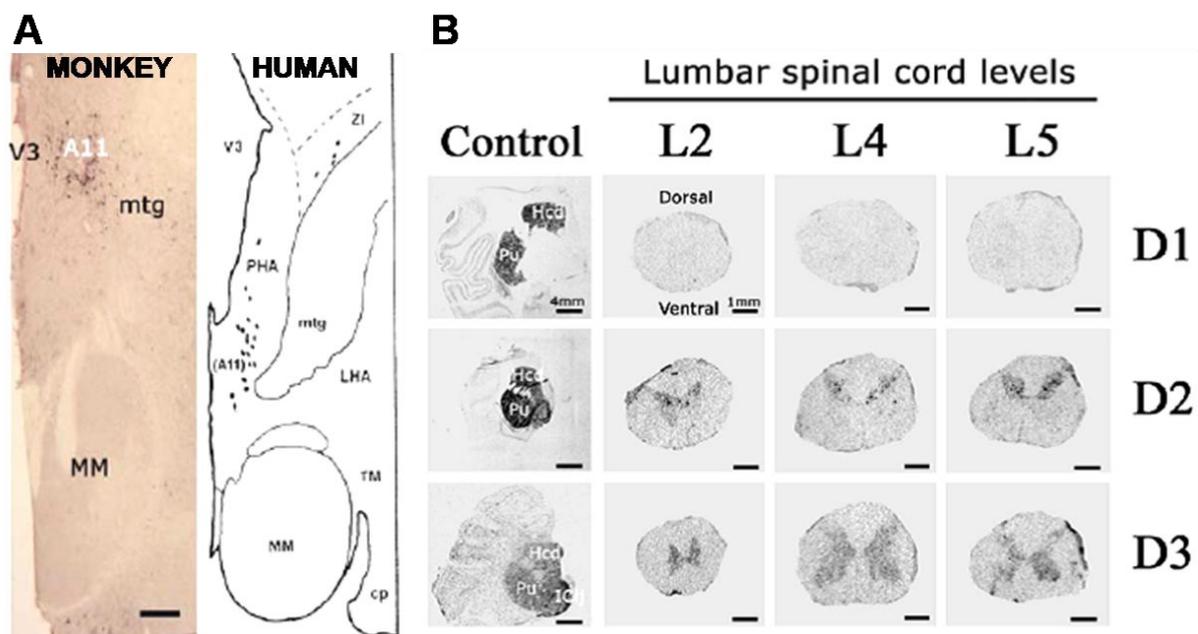
### **Effet de la délétion du récepteur D3**

Le récepteur dopaminergique de type D3 joue un rôle dans les processus sensoriels et nociceptifs. Ainsi, une approche génétique par invalidation de ce récepteur (modèle murin KO-D3) a été proposée et a conduit à un comportement hyperactif chez ces animaux (Accili et al., 1996). En effet, à faible dose l'effet modulateur de la dopamine sur les réflexes spinaux est dépresseur chez des souris normales et devient facilitateur chez des souris KO pour le récepteur D3 (Clemens and Hochman, 2004). De plus, l'expression circadienne de la TH chez ces animaux a adopté un profil d'expression inversé au rythme normal (Clemens et al., 2005). Etant donné que des variations circadiennes de la libération de dopamine au niveau de l'hypothalamus ont été rapportées (Carlsson et al., 1980), les auteurs ont proposé que cela pouvait expliquer l'augmentation de l'excitabilité médullaire chez les souris KO-D3. Sur le plan comportemental, ces souris développent une hyperactivité, une augmentation de l'activité locomotrice et de l'hypertension artérielle (Accili et al., 1996, Xu et al., 1997). Ce phénotype peut ressembler aux caractéristiques des patients chez lesquels de l'hypertension a été rapporté (Ali et al., 1991, Espinar-Sierra et al., 1997).

## B. II. 5. b. Intérêt d'un modèle primate non humain

Il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle de primate non humain pour reproduire la MWE. Les similitudes neuroanatomiques entre l'homme et le primate non-humain font de ce dernier un modèle d'intérêt crucial pour mieux comprendre les mécanismes impliquant des dérégulations du métabolisme du fer et de la dopamine.

Un marquage rétrograde précédemment réalisé dans notre laboratoire sur le macaque naïf, a permis d'identifier que la voie A11, était l'unique voie dopaergique projetant vers la moelle épinière (Barraud et al., 2010). De plus, des marquages d'acide ribonucléique par hybridation *in situ* chaude, ont permis de révéler certaines différences entre la répartition des récepteurs dopaminergiques médullaires chez le primate non humain comparé au rongeur. En effet, alors que les récepteurs dopaminergiques D3 sont distribués de manière diffuse dans la substance grise de la moelle épinière, le récepteur D2 est uniquement localisé dans les cornes dorsales de la moelle épinière et le récepteur D1 est absent (**Figure 15**) (Barraud et al., 2010).



**Figure 15** : Organisation neuroanatomique du macaque. Adapté d'après (Barraud et al., 2010)

**A-** Caractérisation immunohistochimique du domaine d'expression de la tyrosine hydroxylase au niveau de l'aire A11 chez le singe comparée à l'Homme. **B-** Caractérisation du domaine d'expression des récepteurs dopaminergiques par hybridation *in situ* chaude, au niveau de la moelle épinière de singe, à différents niveaux de la partie lombaire. cp=pédoncule cérébral ; LHA=aire hypothalamique latérale ; MM=noyau mamillaire médian ; mtg= tractus mammillotegmentaire ; PHA=aire hypothalamique postérieure ; TM=noyau tubéromammillaire ; V3=ventricule 3 ; ZI=zona incerta.

## **B. III. Maladie de Parkinson**

### **B. III. 1. Généralités**

La maladie de Parkinson (MP) est une pathologie neurodégénérative chronique et d'aggravation progressive affectant 1,5% de la population générale âgée de plus de 65 ans et qui atteint autant les hommes que les femmes (de Rijk et al., 1997). Elle a été décrite pour la première fois en 1817 par le médecin anglais Sir James Parkinson comme « paralysie agitante » (Parkinson, 1817).

Avant l'âge de 20 ans, la MP est exceptionnelle (Parkinson juvénile) et nécessite de rechercher une cause génétique. La forme précoce (avant 40 ans) représente moins de 10% des cas. En France, la MP est la deuxième cause de handicap moteur après l'accident vasculaire cérébral.

Les mécanismes impliqués dans le processus neurodégénératif de la MP ne sont pas encore clairement compris. Si elle ne constitue pas une maladie génétique au sens propre du terme, son étiologie encore inconnue peut cependant faire intervenir des prédispositions génétiques (enzymes de détoxification de la chaîne respiratoire mitochondriale, gènes intervenant dans le maintien de l'homéostasie dopaminergique), ainsi qu'une possible toxicité environnementale telle que l'exposition à certains pesticides (Semchuk et al., 1992, Seidler et al., 1996). L'exception est constituée de quelques formes familiales (autosomales dominantes, environ 10% des cas) où l'on retrouve par exemple des mutations ponctuelles sur le gène codant pour l'alpha-synucléine (Polymeropoulos et al., 1997) et des formes autosomales récessives, à début précoce, liées à une mutation de la parkine (Kitada et al., 1998). La perturbation du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale a été mise en évidence dans la forme idiopathique, localement dans la substance noire ou de manière plus discutée dans d'autres tissus (plaquettes sanguines) (Benecke et al., 1993, Schapira, 1994).

## B. III. 2. Clinique

### B. III. 2. a. *Symptômes moteurs*

Les troubles moteurs associés à la MP sont souvent qualifiés de symptômes cardinaux. Ils regroupent les quatre manifestations les plus courantes et les plus handicapantes décrites chez les patients parkinsoniens :

---

L'**akinésie et la bradykinésie** qui correspondent à la raréfaction/privation du mouvement et à la lenteur de son exécution (Wilson, 1925). En réalité, il s'agit d'un défaut dans l'initiation du mouvement, avec l'apparition d'un délai significatif entre la volonté de réaliser le mouvement et l'exécution de celui-ci.

La **rigidité** est assimilée à une hypertonie musculaire généralisée. Elle est continue et homogène. La commande volontaire descendante trouve le muscle dans un état de préparation anormale et nécessite la mise en route de mécanismes compensatoires pour surmonter les contraintes physiques additionnelles. La rigidité concerne la quasi-totalité des muscles avec une prédominance du versant fléchisseur sur le versant extenseur (Delwaide et al., 1986).

Le **tremblement de repos** constitue le symptôme le plus caractéristique de la maladie, même s'il est absent dans environ 20% des cas. Il s'agit d'un tremblement qui commence généralement de façon unilatérale et qui prédomine au niveau des extrémités des membres supérieurs avec un pic de fréquence de 4 à 6 hertz (Stanley-Jones, 1956).

L'**instabilité posturale** est une manifestation plus tardive dans l'évolution de la maladie. Elle se manifeste par des troubles de l'équilibre pouvant conduire à des chutes, ce qui en fait l'un des symptômes les plus handicapants (Bloem, 1992).

---

Le diagnostic de la maladie de Parkinson repose sur des critères d'évaluation clinique identifiés par un syndrome parkinsonien, lui-même défini par la présence d'une bradykinésie associée, au minimum, à l'un des symptômes suivants : tremblement de repos (4-6 Hz), rigidité extrapyramidale et instabilité posturale (Quinn, 1997).

Les symptômes moteurs cardinaux de la maladie participent à l'émergence des troubles du sommeil. En effet, si les tremblements de repos s'estompent habituellement avec le début du sommeil, ils peuvent reprendre en cas d'éveils ou micro-éveils nocturnes, empêchant ainsi le

patient de se rendormir (Stern et al., 1968). De plus, ils peuvent s'associer aux mouvements du corps et aux changements des stades de sommeil et se transformer au cours du sommeil lent en contractions musculaires répétitives qui ont un effet délétère sur le sommeil en le fragmentant. La rigidité peut persister au cours du sommeil, surtout chez les patients avec des fluctuations motrices. Elle est surtout axiale et contribue largement aux douleurs nocturnes des patients. Enfin, l'akinésie/bradykinésie empêche la mobilité nocturne et les ajustements posturaux (van Hilten et al., 1993).

Des mouvements périodiques du sommeil touchent environ un tiers des patients (Happe et al., 2003). Souvent associés à la MWE, ils se traduisent dans leur forme la plus élémentaire par une extension rythmique du gros orteil et une dorsiflexion du pied survenant à des intervalles plus ou moins réguliers, qui fragmentent le sommeil des patients. Des akathisies nocturnes ont également été mentionnées. Elles surviennent plus volontiers chez les patients bradykinétiques et rigides (Lang and Johnson, 1987). C'est une sensation subjective d'impatience qui empêche le patient de rester immobile. Sa caractéristique principale est que, contrairement à la MWE, elle n'est pas soulagée par le mouvement ou l'activité.

#### *B. III. 2. b. Symptômes non moteurs*

Alors qu'elle a longtemps été définie comme étant une pathologie exclusivement motrice, la maladie de Parkinson apparaît aujourd'hui comme une maladie plus complexe. En effet, d'autres symptômes « non-moteurs » de la maladie contribuent grandement à la dégradation de la qualité de vie des patients. Dans certains cas, ces manifestations non-motrices occupent le premier plan chez des patients par ailleurs bien équilibrés d'un point de vue moteur. Négligée dans un premier temps, la prise en compte de ces troubles apparaît être un enjeu important dans les années à venir, afin de proposer une prise en charge plus globale de cette pathologie. De plus, certains de ces signes non-moteurs sont à envisager comme des éléments prédictifs d'évolution vers une éventuelle MP.

Parmi ces troubles non-moteurs, on retrouve des perturbations olfactives (80% des cas), des troubles dysautonomiques avec une hypotension orthostatique, des troubles gastro-intestinaux, vésico-sphinctériens (dans plus de 70% des cas), mais aussi un déficit cognitif de type syndrome dysexécutif sous-cortico-frontal. Des troubles de l'humeur, des difficultés dans la discrimination visuelle des contrastes ont également été rapportés (Mathias and Polinsky, 1999, Bonuccelli et al., 2003)(Rascol et al., 2003, Hawkes, 2008). Dans plus de 40% des cas, les patients parkinsoniens sont également sujets à des douleurs chroniques se traduisant sous diverses formes : douleurs musculo-squelettiques, douleurs neuropathiques, douleurs liées à des dystonies, douleurs centrales et akathisies (Ford, 2010).

*B. III. 2. c. Troubles du sommeil*

Les troubles du sommeil sont fréquents dans les pathologies neurodégénératives (Tandberg et al., 1999, Martinez-Martin et al., 2007) et en particulier dans la maladie de Parkinson avec une prévalence comprise entre 66 et 96% des patients (Kales et al., 1971) (Lees et al., 1988, Larsen, 2003). En effet, dès sa première description de la maladie, James Parkinson mentionna des troubles du sommeil. Au-delà des symptômes moteurs, ces troubles suscitent un intérêt grandissant puisqu'ils constituent une importante source de dégradation de la qualité de vie des patients et que certains troubles pourraient constituer des marqueurs précliniques de la maladie et ainsi favoriser un diagnostic plus précoce. Il n'y a toutefois pas de troubles du sommeil spécifiques à la maladie. Ceux-ci se manifestent sous différentes formes, à la fois la nuit et la journée. C'est pourquoi les plaintes émises par les patients se combinent de manière variable et associées : insomnie d'endormissement, une fragmentation du sommeil, réveil matinal précoce ou somnolence diurne excessive.

La première des plaintes chez les patients souffrant de la MP est l'insomnie, caractérisée par une fragmentation de l'architecture du sommeil avec de nombreux réveils soudains (Factor et al., 1990, Tandberg et al., 1998). Les réveils nocturnes peuvent être prolongés et conduisent à une réduction significative du temps de sommeil total entraînant fatigue et somnolence. Plusieurs études ont révélé que ces interruptions de la continuité du sommeil étaient plus fréquentes chez des sujets parkinsoniens que chez des sujets témoins appariés en âge (Factor et al., 1990, Olanow et al., 2000, Comella, 2007). La fragmentation du sommeil peut survenir durant n'importe quel stade de sommeil, mais elle est plus importante durant les stades de sommeil léger (1 et 2) (Askenasy and Yahr, 1985). De nombreuses parasomnies ont également été rapportées (van Hilten et al., 1993). Elles comprennent les cauchemars, les vocalisations et hallucinations nocturnes ou les attaques de panique. L'une des parasomnies les plus fréquentes est le trouble du comportement en sommeil paradoxal, qui peut parfois précéder la survenue des troubles moteurs et semble y prédisposer. En effet, une étude sur le sujet menée en 1996 a révélé que 38% des personnes présentant un trouble du comportement en sommeil paradoxal idiopathique ont développé un syndrome parkinsonien (Schenck et al., 1996). Le trouble du comportement en sommeil paradoxal se manifeste par un comportement auto- et/ou hétéro-agressif exprimant le vécu d'un rêve en l'absence d'atonie musculaire. Le patient en général n'en garde pas le souvenir, contrairement au conjoint. Enfin, les patients affectés par la maladie de Parkinson présentent également un risque important de développer des désordres respiratoires nocturnes de type syndrome d'apnée du sommeil (Chotinaiwattarakul et al., 2011).

Par conséquent, l'ensemble de ces troubles conduit à une réduction du temps total de sommeil et donc de son efficacité. Ils contribuent également au développement d'insomnies psychophysiologiques conditionnées par une anxiété anticipatoire (peur d'aller au lit).

Selon une enquête nationale (Ghorayeb et al., 2007), la somnolence diurne excessive est une plainte récurrente chez plus de 29% des patients parkinsoniens. La somnolence se définit comme un état subjectif de besoin de sommeil. Elle est anormale quand elle se manifeste par des endormissements involontaires plus ou moins contrôlables au cours de la journée ou quand la sieste devient anormalement prolongée. Elle génère une sensation subjective de mauvaise vigilance et nécessite de lutter pour résister à l'envie de dormir et pour maintenir un niveau d'éveil suffisant à l'exécution des activités quotidiennes. Cette somnolence a longtemps été négligée par les patients et les médecins du fait que la majorité des patients ne se rendaient pas compte de leur état somnolent en raison de son développement insidieux et progressif (Brodsky et al., 2003).

D'une manière intéressante, il a été suggéré que l'état de somnolence excessive pouvait précéder la survenue de la maladie de Parkinson. Une étude longitudinale a en effet montré que des sujets somnolents étaient trois fois plus susceptibles de développer une maladie de Parkinson (Abbott et al., 2005).

Finalement, la cause des troubles du sommeil dans la maladie de Parkinson semble être multifactorielle. Les effets de l'âge, les troubles moteurs nocturnes, le processus neurodégénératif, l'anxiété, la dépression, les douleurs, et les dysautonomies pourraient intervenir dans des proportions variables pour expliquer cette forte prévalence.

### B. III. 3. Physiopathologie

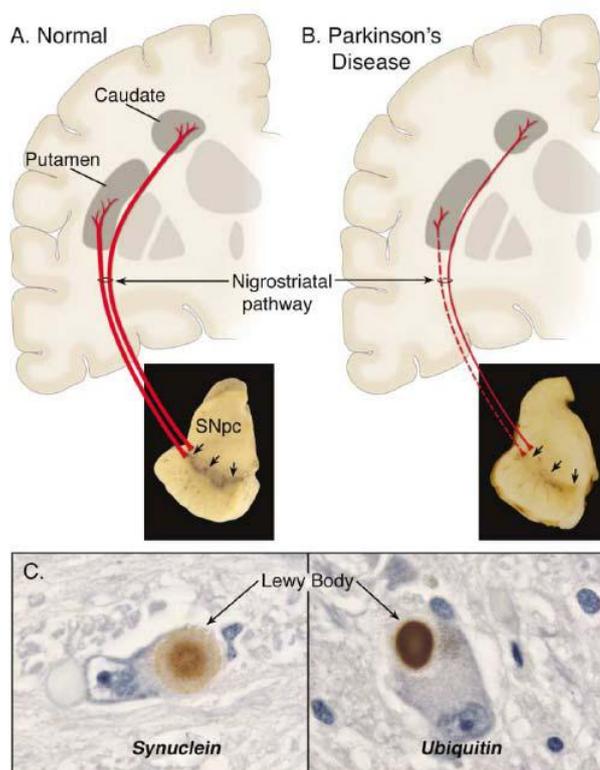
#### *B. III. 3. a. Altérations cytopathologiques et modèle de Braak*

Les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson sont essentiellement la conséquence d'une dégénérescence de la voie dopaminergique nigro-striée (Hassler, 1938). Ceux-ci apparaissent lorsque au moins 50% des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte ont disparu et que la dénervation dopaminergique de leur région cible, le striatum, a dépassé 75% (Damier et al., 1999) (**Figure 16**). Néanmoins, au cours de la maladie de Parkinson, toutes les voies dopaminergiques cérébrales sont atteintes. La plus touchée reste la voie nigro-striée, mais le déficit concerne également les voies méso-

limbique et méso-corticale qui peuvent jouer un rôle dans la genèse des troubles cognitifs et certains aspects de l'akinésie (Javoy-Agid and Agid, 1980, Scatton et al., 1982).

Par ailleurs, les neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée, qui projettent sur les parties « motrices » dorso-latérales du striatum, sont davantage affectés que ceux qui projettent sur les zones plus « cognitives » ventrales (Hirsch et al., 1988).

La dégénérescence cellulaire n'est jamais totale, même dans les structures les plus vulnérables comme la substance noire, mais diverses études laissent à penser que le processus de neurodégénérescence est continu. Dans la substance noire des patients affectés par la maladie de Parkinson, la perte des neurones dopaminergiques est d'environ 1% par an, alors que chez le sujet normal la dégénérescence est deux fois moins rapide (Riederer and Wuketich, 1976, Scherman et al., 1989). Cependant, la maladie de Parkinson est une maladie plus diffuse. En effet, si les lésions des systèmes dopaminergiques constituent l'essentiel des anomalies observées, d'autres systèmes neuronaux sont aussi touchés. Des pertes d'environ 50% des neurones noradrénergiques du locus coeruleus (Cash et al., 1987), d'environ 40% des neurones sérotoninergiques du raphé (Halliday et al., 1990) et d'environ 40% des neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert et du noyau pédonculopontin ont ainsi été rapportées (Jellinger, 1991). D'un point de vue neuropathologique, la maladie de Parkinson fait partie des synucléonopathies, groupe de maladies extrapyramidales incluant, entre autres, l'atrophie multisystématisée et la démence à corps de Lewy. Ces maladies sont caractérisées par la présence anormale d'agrégats d'alpha-synucléine, formant des inclusions neuronales éosinophiles cytoplasmiques caractéristiques : les corps de Lewy (Spillantini et al., 1998). Ceux-ci sont constitués de neurofilaments contenant, en plus des agrégats de synucléine, entre autres, de l'ubiquitine (**Figure 16**) (Uitti and Calne, 1993).



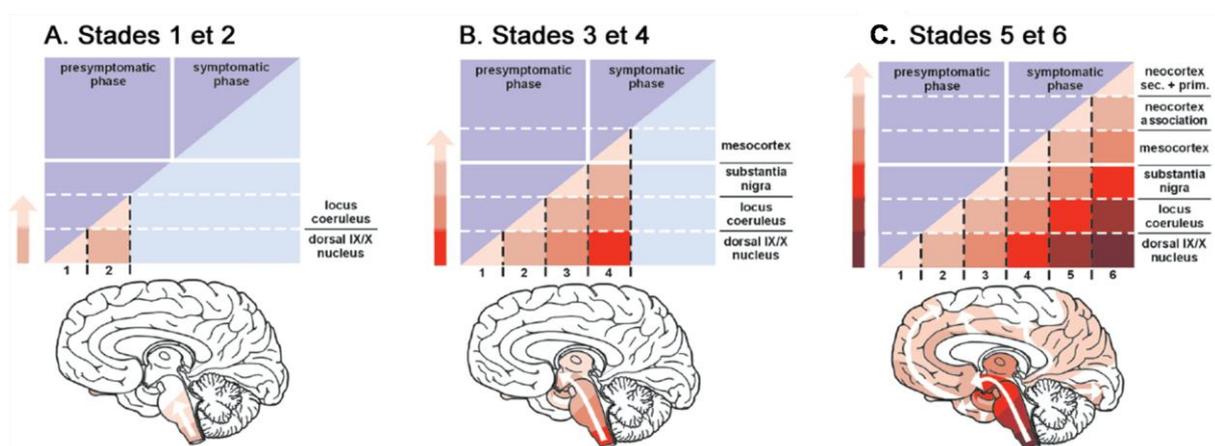
**Figure 16 : Neuropathologie de la maladie de Parkinson.** D'après (Dauer and Przedborski, 2003).

**A-** Représentation schématique de la voie nigro-striée normale (lignes rouges). Elle est composée de neurones dopaminergiques dont les corps cellulaires sont localisés au niveau de la substance noire pars compacta (SNc, flèches). Ces neurones projettent (ligne rouge solide) au niveau de la structure d'entrée des ganglions de la base, le striatum (putamen et noyau caudé). La photographie représente la pigmentation normale de la SNc produite par la neuromélanine dans les neurones dopaminergiques. **B-** Représentation schématique de la voie nigro-striée en condition pathologique (lignes rouges). Dans la maladie de Parkinson, la voie nigro-striée dégénère et entraîne une perte importante des neurones dopaminergiques projetant vers le putamen et une perte un peu moins importante des neurones projetant vers le Noyau Caudé. La photographie représente la dépigmentation en neuromélanine au niveau de la SNpc, suite à une perte en neurones dopaminergiques. **C.** Marquage immunohistochimique ciblant les inclusions neuronales appelées corps de Lewy dans un neurone dopaminergique. La microphotographie de gauche montre une immunoréaction ciblant l'alphasynucléine et révélant un corps de Lewy (flèche noire). La microphotographie de droite cible l'ubiquitine et démasque également la présence d'un corps de Lewy.

Les travaux anatomo-pathologiques de Braak ont également contribué à souligner le caractère diffus de la maladie de Parkinson (Braak et al., 2003). Néanmoins, ces études doivent être nuancées, étant donné qu'elles ne relatent que la distribution des corps de Lewy à différents stades de la maladie et non l'évolution du processus neurodégénératif *per se*. De plus, il est impossible de savoir si les patients classés dans les stades précliniques auraient

par la suite développé une maladie de Parkinson. La théorie de Braak identifie six stades d'évolution de la maladie de Parkinson au cours desquels l'extension du processus neurodégénératif s'effectue de façon lente et progressive, en corrélation avec l'évolution des signes cliniques (**Figure 17**). Cette théorie suggère que les deux premiers stades, pouvant s'étaler sur plusieurs décennies, correspondraient aux phases précliniques ou prémotrices de la maladie. A ce stade, les inclusions semblent majoritairement localisées au niveau du bulbe olfactif et du pont, incluant le complexe subcoeruleus/coeruleus, le raphé et des noyaux de la formation réticulée. Les symptômes les plus caractéristiques de cette phase prémotrice seraient les troubles de l'olfaction, la constipation, les troubles dysautonomiques et certains troubles du sommeil comme le trouble du comportement en sommeil paradoxal ou la somnolence diurne excessive (**Figure 17**).

Les stades 3 et 4, marqueraient la transition entre les stades préclinique et clinique. Des corps de Lewy se développent notamment dans la substance noire et témoigneraient de l'apparition des troubles moteurs classiques (**Figure 17**). Les stades 5 et 6, phases tardives, correspondent à l'atteinte du néocortex, ce qui rendrait compte des désordres cognitifs de la maladie (**Figure 17**).



**Figure 17** : Progression graduelle du processus neuropathologique de la maladie de Parkinson, d'après la théorie de Braak. D'après (Braak et al., 2002).

Ces diagrammes permettent de visualiser sur l'axe des abscisses l'extension du processus en terme de sévérité : **(A)** pendant la phase « préclinique » (stades 1 et 2), les corps de Lewy sont localisés au niveau du bulbe olfactif, du système nerveux entérique, du complexe coeruleus/subcoeruleus **(B)** la phase « clinique » (stades 3 et 4), atteinte de la substance noire et **(C)** la phase « tardive » (stades 5 et 6) où les corps de Lewy sont retrouvés au niveau du cortex cérébral. Code couleur : plus le rouge est foncé, plus la proportion de corps de Lewy est importante.

Alors que la perte des neurones de la SNc peut atteindre jusqu'à 80% dans les stades avancés de la maladie, la dégénérescence au niveau de la VTA varie entre 36 et 55% (Uhl et al., 1985). Le fait que la VTA ne soit pas directement impliquée dans les symptômes moteurs de la MP a conduit à une mise à l'écart, de la part des premiers travaux, de l'étude des altérations de la voie mésolimbique. Cependant, des études plus récentes ont démontré un rôle important de cette voie dans des aspects plus cognitifs de la maladie comme l'apathie (Levy and Dubois, 2006, Thobois et al., 2013), la rigidité cognitive (Brown and Marsden, 1990) ou les déficits attentionnels (Troster, 2008).

Etonnamment, il a fallu attendre les années 1950 pour faire le lien entre la perte neuronale au niveau de la SNc et la déplétion dopaminergique dans le striatum. Dans une étude sur l'akinésie induite par la réserpine chez la souris, Carlsson et collègues ont découvert une déplétion dopaminergique dans le striatum qui pouvait être corrigée par la L-DOPA (Carlsson et al., 1957, Carlsson et al., 1958). Des analyses post-mortem sur des patients parkinsoniens akinétiques ont par la suite confirmé une sévère déplétion dopaminergique au niveau du striatum (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). Des travaux ultérieurs ont indiqué que la baisse des taux de dopamine dans le striatum dorsal pouvait atteindre 75% avant que les premiers symptômes moteurs n'apparaissent (Scherman et al., 1989). Enfin, dans les années 1960, des études ont montré que la dopamine provenant de la SNc était présente au niveau des terminaisons dans le striatum et que les neurones de la SNc envoyaient leurs axones dans le striatum (Anden et al., 1964, Dahlstroem and Fuxe, 1964). Toutes ces études ont contribué à établir le lien entre la mort neuronale dans la SNc, la déplétion dopaminergique dans le striatum et les troubles moteurs.

*B. III. 3. b. Impact de l'excès de fer sur le système dopaminergique*

Bien que, la théorie d'une accumulation de fer dans la maladie de Parkinson reste discutée, la plupart des études sur l'implication du fer dans les processus neurodégénératifs s'accordent à décrire des taux anormalement élevés dans la substance noire, variant de 33% à 176%, en fonction de l'évolution de la MP au moment de la réalisation des autopsies (Dexter et al., 1989, Loeffler et al., 1995).

Les travaux de Riederer et collègues ont décrit une augmentation significative des taux de fer dans la substance noire issue des sujets parkinsoniens à un stade avancé (Riederer et al., 1989). Ces résultats ont été confirmés par des marquages histologiques de la SNc provenant de sujets parkinsoniens (Faucheux et al., 2002) et par des analyses quantitatives par spectroscopie sur cellule unique, révélant des concentrations en fer deux fois supérieures à la normale (Oakley et al., 2007). De plus, des études d'imageries (imagerie par résonance magnétique et par échographie transcranienne) ont montré une augmentation des taux de fer dans la substance noire *in vivo*, corrélant avec les taux tissulaires post-mortem (Gorell et al., 1995, Ryvlin et al., 1995, Berg et al., 2002).

Il a été proposé que les dépôts de fer retrouvés dans la couronne des corps de Lewy de la SNc issue de patients parkinsoniens (Castellani et al., 2000) pouvaient induire et/ou augmenter l'accumulation de l'alpha-synucléine (Golts et al., 2002), suggérant que le fer jouerait un rôle non négligeable dans l'accumulation d'alpha-synucléine et la formation des corps de Lewy. De plus, des dépôts de fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) ont également été retrouvés dans la microglie, les oligodendrocytes, les astrocytes ainsi que dans les neurones de la substance noire, dans le putamen et le globus pallidus provenant de patients atteints de la MP (Zecca et al., 2004). Par ailleurs, des études ont montré une augmentation du nombre de cellules microgliales (souvent associées aux processus neurodégénératifs) contenant de la ferritine dans la substance noire des individus parkinsoniens (Jellinger et al., 1990).

Finalement, une augmentation du fer sous sa forme réactive associée à la neuromélanine a été mise en évidence dans la substance noire des patients parkinsoniens présentant une perte neuronale sévère. Ces données argumentent en faveur d'un rôle central de la neuromélanine dans la régulation de la réactivité du fer (Faucheux et al., 2003).

#### B. III. 4. Traitements de la maladie de Parkinson

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif ni préventif agissant sur le processus de neurodégénérescence de la maladie (Goetz et al., 2005). Ainsi, les traitements à disposition visent à contrôler essentiellement les troubles moteurs de la maladie de Parkinson. Il s'agit dans un premier temps d'approches pharmacologiques permettant de compenser l'effet de la déplétion dopaminergique de la SNc. Elles visent à (i) rétablir les taux de dopamine circulant (dopa-thérapie), (ii) stimuler les récepteurs dopaminergiques (agonistes dopaminergiques), (iii) potentialiser les effets de ces derniers en inhibant la dégradation de la dopamine résiduelle (inhibiteurs enzymatiques). D'autre part, une approche neurochirurgicale a été développée et consiste à stimuler à haute fréquence le noyau sous-thalamique.

##### *B. III. 4. a. Approche neurochirurgicale : la stimulation cérébrale profonde*

Le noyau sous-thalamique fait partie d'un ensemble de structures sous-corticales appelé ganglions de la base ou noyaux gris centraux s'inscrivant dans le système extrapyramidal. Parmi les altérations les plus marquantes de la MP, on retrouve une hyperactivité du noyau sous-thalamique tant au niveau électrophysiologique (Bergman et al., 1994, Kreiss et al., 1997) que métabolique (Mitchell et al., 1985, Vila et al., 1996). Pour ces raisons, il a été proposé qu'une inhibition du noyau sous-thalamique puisse améliorer les symptômes cliniques de la maladie de Parkinson. En 1993, des chercheurs ont proposé un traitement par stimulation à haute fréquence du noyau sous-thalamique (Benazzouz et al., 1993). Cette technique améliore l'ensemble des symptômes moteurs majeurs de la maladie de Parkinson (Pollak et al., 1993, Limousin et al., 1998) et permet notamment de diminuer la médication pharmacologique antiparkinsonienne (environ 50 à 80% de la dose journalière), pouvant même aller chez certains patients jusqu'à son arrêt total (Vingerhoets et al., 2002). Cependant, si la stimulation cérébrale profonde présente des avantages cliniques évidents, permettant notamment une réduction importante des effets secondaires des traitements pharmacologiques, elle présente l'inconvénient de nécessiter l'implantation d'appareils de stimulation à demeure, nécessitant des réglages fréquents pour une utilisation optimale, ainsi que des facteurs restrictifs pour l'inclusion des patients.

##### *B. III. 4. b. La L-DOPA*

Le traitement de référence de la maladie de Parkinson est représenté par la DOPA-thérapie. En effet, au cours des années 1960, la découverte de la lévodopa (L-DOPA), précurseur de la dopamine, a révolutionné le traitement de la maladie de Parkinson

(Birkmayer and Hornykiewicz, 1961, Cotzias et al., 1969). Si ce traitement est efficace dans un premier temps, de nombreuses complications motrices apparaissent ensuite et rendent difficile un traitement L-dopaergique sur le long terme. Classiquement, le traitement de la maladie de Parkinson par la L-DOPA suit trois étapes :

- La période dite de « lune de miel » variant de 3 à 6 ans durant laquelle les patients ont une qualité de vie quasiment normale.
- Les périodes de fluctuations et de complications motrices, affectant plus de 60% des patients après 6 ans de traitement.
- Enfin, on retrouve une détérioration de fin de dose (*wearing off*) qui correspond à une perte progressive des effets de la L-dopa, les symptômes moteurs réapparaissant plus rapidement. Des phénomènes de blocage-déblocage (*on-off*) apparaissent également.

Ainsi, l'efficacité du traitement varie chez un même patient parallèlement à la disponibilité plasmatique de la L-DOPA. Si le taux est élevé, des périodes de dyskinésies apparaissent. A l'inverse, lorsque le taux chute, des périodes d'akinésie et de bradykinésie succèdent aux dyskinésies. Enfin, la troisième période, la plus handicapante, correspond à la perte d'efficacité quasi-totale de la L-DOPA conduisant à l'apparition de signes non L-DOPA sensibles.

#### *B. III. 4. c. Les agonistes dopaminergiques*

Parmi les médicaments utilisés pour retarder l'utilisation de la L-DOPA, les agonistes des récepteurs dopaminergiques (couramment nommés agonistes dopaminergiques) sont souvent prescrits en première intention. De par leur plus longue élimination plasmatique que la L-DOPA, leur utilisation fut d'abord proposée comme un moyen d'obtenir une stimulation dopaminergique plus stable et donc éviter les fluctuations motrices. Leur utilisation régulière a commencé dans les années 1980 avec les agonistes dérivés de l'ergot de seigle comme la bromocriptine, la cabergoline et le pergolide ou non-dérivés de l'ergot de seigle comme l'apomorphine. Les agonistes possèdent une sélectivité modérée pour les différents sous-types de récepteurs dopaminergiques. En effet, ils agissent principalement sur les récepteurs de type D2 (soit les récepteurs D2, D3 et D4) mais montrent une certaine affinité pour les récepteurs D1 (pour l'apomorphine et le pergolide tout du moins).

Des études ont montré que les patients, débutant leur traitement avec des agonistes dopaminergiques, avaient de plus faibles risques de développer des complications motrices que les patients commençant avec de la L-DOPA (Montastruc et al., 1989, Rascol et al., 2000, Rascol et al., 2011). Ceci donna lieu à une utilisation des agonistes dopaminergiques

en première intention, complétés avec de la L-DOPA, lorsque les symptômes ne peuvent plus être réduits par les agonistes dopaminergiques uniquement.

Dans les années 1990, les dérivés de l'ergot de seigle ont été remplacés par des agonistes dopaminergiques non-dérivés de l'ergot de seigle comme le ropinirole ou le pramipexole qui sont des agonistes sélectifs complets des récepteurs D2/3 (Coldwell et al., 1999). Rapidement utilisés en monothérapie dans les stades précoces, ils ont été décrits comme retardant l'apparition des complications motrices en comparaison à la L-DOPA (Parkinson-Study-Group, 2000). Après 6 années de suivi, les études ont montré que dans la plupart des cas, la L-DOPA était ajoutée à ces traitements chez la plupart des patients (Miyasaki, 2010).

A ce jour, malgré les effets secondaires (décrits ci-dessous), les agonistes dopaminergiques sont utilisés en première intention pour retarder l'utilisation de la L-DOPA.

#### B. III. 5. Traitements dopaminergiques et cycles veille-sommeil

Bien que les traitements dopaminergiques permettent d'améliorer considérablement les symptômes moteurs de la MP, des troubles moteurs nocturnes liés aux traitements dopaminergiques ont été constatés. Les dyskinésies, en rapport avec l'effet cumulatif des doses de L-DOPA, peuvent être plus marquées le soir et retarder ainsi l'endormissement. L'effet des traitements antiparkinsoniens sur le sommeil des patients reste néanmoins débattu, notamment en raison du peu de connaissances concernant les interactions entre le système dopaminergique et les systèmes régulateurs de l'alternance veille-sommeil. Seulement peu d'études cliniques ont montré que l'efficacité du traitement dopaminergique sur les symptômes moteurs de la maladie pouvait améliorer la qualité du sommeil des patients (Askenasy and Yahr, 1985). De même, une amélioration du sommeil des patients sous stimulation cérébrale profonde a été démontrée (Antonini et al., 2004).

En revanche, de nombreuses études ont rapporté une altération de la qualité du sommeil sous traitements dopaminergiques, notamment en raison des cauchemars et des hallucinations qu'ils produiraient (Sharf et al., 1978, van Hilten et al., 1994). D'autres ont montré que la durée du traitement dopaminergique corrélait avec les troubles du sommeil (Sweet and McDowell, 1975, Lesser et al., 1979). Enfin, certains travaux suggèrent que les traitements dopaminergiques pourraient être impliqués dans les attaques de sommeil et la somnolence diurne en montrant notamment un effet sédatif dose-dépendant des agonistes dopaminergiques et de la lévodopa (Andreu et al., 1999, Ferreira et al., 2000). Ainsi, dans

une enquête épidémiologique française sur la somnolence diurne excessive dans la maladie de Parkinson, l'importance de la dose cumulée du traitement dopaminergique apparaît comme l'un des principaux facteurs de risque (Ghorayeb et al., 2007).

En effet, la plupart des études sur les problèmes de somnolence diurne ont attribué ces effets aux traitements dopaminergiques et ont notamment incriminé les agonistes dopaminergiques D2/D3 (Homann et al., 2002). Ainsi, ce type de traitement engendre des « attaques de sommeil », caractérisées par des accès soudains et irrésistibles de sommeil, durant l'éveil (Askenasy, 2003). Cette somnolence n'est pas sans conséquence, puisque 16% des patients interrogés ont reconnu avoir somnolé au volant et 11% ont reconnu avoir eu des épisodes brutaux d'endormissement lors de la conduite automobile (Frucht et al., 1999).

#### B. III. 6. Modèles animaux des troubles du sommeil dans la MP

L'absence de modèles naturels ou spontanés développant un syndrome parkinsonien a conduit au développement et à l'utilisation de nombreux modèles animaux expérimentaux. La neurotoxine de référence pour l'induction de la MP a été découverte au début des années 1980, lorsque de jeunes toxicomanes ont rapidement développé un syndrome parkinsonien suite à des injections intraveineuses de MPTP synthétisé par inadvertance (Langston et al., 1983). Bien qu'utilisé chez le rongeur, le MPTP provoque chez le singe un syndrome parkinsonien sévère dont la symptomatologie partage de grandes similitudes avec celle de la MP chez l'Homme (Burns et al., 1983, Doudet et al., 1985).

##### *B. III. 6. a. Modèle rongeur*

En général, relativement peu d'études ont utilisé les modèles rongeurs de la MP pour étudier les possibles altérations des cycles veille-sommeil. Chez cet animal, une lésion des neurones dopaminergiques peut être obtenue par une injection intracérébrale de MPTP. Une étude réalisée chez le rat, a montré qu'une lésion de 50% des neurones dopaminergiques de la SNc par des injections intracérébrales de MPTP était suffisante pour induire des perturbations significatives des paramètres du sommeil avec, notamment une diminution du SP au début de l'intoxication, suivi d'un léger rebond (Lima et al., 2007). De plus, chez la souris traitée à la roténone, une diminution du sommeil paradoxal et du sommeil lent profond a été rapportée (Garcia-Garcia et al., 2005).

En revanche, deux études chez la souris intoxiquée au MPTP présentant de faibles lésions de la substance noire compacte (30%) n'ont pas montré d'altération du sommeil paradoxal (Monaca et al., 2004, Laloux et al., 2008b) Les auteurs ont alors testé l'hypothèse d'une

implication des traitements dopaminergiques, dans l'accentuation des troubles veille-sommeil. Ils ont montré que ces traitements modifient les paramètres du sommeil à la fois chez les animaux contrôles et intoxiqués au MPTP, en augmentant notamment l'éveil, ainsi que la latence et la durée du sommeil paradoxal (Laloux et al., 2008a).

Etant donné les différences fondamentales entre l'organisation des cycles veille/sommeil des rongeurs (animal nocturne) et de l'Homme, il apparaît nécessaire d'utiliser des modèles ayant une organisation plus proche de celle de l'Homme afin de renforcer la pertinence des résultats.

#### *B. III. 6. b. Intérêt du primate non humain*

Le modèle de référence de la maladie de Parkinson est celui du primate non-humain intoxiqué au MPTP. Sur le plan moteur, une intoxication au MPTP reproduit l'ensemble des caractéristiques de la maladie, à savoir l'akinésie/bradykinésie, la rigidité et l'instabilité posturale. En revanche, si les tremblements posturaux sont bien présents, le tremblement de repos n'est pas observé chez la plupart des primates, mis à part le singe vert (Bergman et al., 1998, Guehl et al., 2003). La réponse bénéfique à la L-DOPA et le développement de complications motrices à long terme dopa-induites (dyskinésies) sont également similaires à ceux observés dans la maladie de Parkinson (Bezard et al., 2001, Aubert et al., 2005).

Outre les symptômes moteurs, des études récentes ont montré que le modèle du singe intoxiqué au MPTP reproduisait également les troubles gastro-intestinaux (Chaumette et al., 2009), cognitifs (Decamp and Schneider, 2004) et cardiovasculaires (Oiwa et al., 2003), rapportés dans la forme sporadique humaine de la maladie.

Cependant, la pertinence du modèle singe MPTP pour l'étude des troubles veille-sommeil observés dans la maladie humaine n'a quasiment pas été exploitée (Almirall et al., 1999, Barraud et al., 2009). En réalité, il n'existe pas un modèle du primate non-humain intoxiqué au MPTP mais des modèles puisque divers protocoles d'intoxication ont été développés. Ceux-ci peuvent varier en fonction du mode d'administration du MPTP (intra-carotidien de manière uni- ou bilatérale, intraveineux, intra-péritonéal ou sous-cutané), du régime d'intoxication (modèles d'intoxication aigus vs modèles chroniques) et par conséquent en fonction de la sévérité des lésions neuronales induites. D'un point de vue anatomopathologique, le modèle du primate intoxiqué au MPTP reproduit le motif des lésions des systèmes dopaminergiques observées dans la maladie de Parkinson (Forno et al., 1993). En effet, on retrouve une dégénérescence préférentielle des terminaisons

dopaminergiques au niveau du putamen par rapport au noyau caudé (Moratalla et al., 1992) ; une perte plus importante au niveau de la SNc par rapport à la VTA avec une perte préférentielle au niveau des segments ventraux et latéraux de la SNc (Sirinathsinghji et al., 1992, Varastet et al., 1994, Bezard et al., 2001)(Bezard et al., 2006).

En outre, comme dans la maladie de Parkinson (Hirsch et al., 1988), les neurones contenant de la neuromélanine sont plus sensibles à l'effet toxique du MPTP (Herrero et al., 1993, Purisai et al., 2005). Cependant, il est admis que les effets toxiques du MPTP ne sont pas limités aux régions dopaminergiques des lésions des systèmes noradrénergiques et sérotoninergiques ont été relevées (Mitchell et al., 1985, Pifl et al., 1991), celles-ci étant néanmoins d'une plus faible amplitude que celles observées dans la voie nigro-striée ; d'autres études ont mentionné des lésions dans des systèmes non monoaminergiques en décrivant des pertes de neurones GABAergiques et glycinergiques de la rétine (Cuenca et al., 2005) et du globus pallidus (Emborg et al., 2006).

De plus, ce modèle ne reproduit pas toutes les caractéristiques de la maladie de Parkinson, comme la présence de corps de Lewy, même si des inclusions intra-neuronales ont tout de même été décrites (Forno et al., 1986, Purisai et al., 2005), ou encore le paramètre temporel de la maladie humaine à savoir une progression lente et continue des lésions neurologiques. Toutefois, des modèles chroniques ont été développés afin de mieux reproduire l'évolution chronique et naturelle de la maladie de Parkinson (Bezard et al., 2001).

Finalement, le modèle du singe intoxiqué au MPTP a permis, malgré ses limitations, de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la maladie et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par exemple, des études électrophysiologiques ont révélé que l'hyperactivité du noyau sous-thalamique était un facteur clé dans la genèse des troubles moteurs (Bergman et al., 1990). Cette découverte conduisit au développement de la stimulation cérébrale profonde visant à inhiber l'hyperactivité de ce noyau (Benazzouz et al., 1993, Limousin et al., 1998), technique décrite précédemment (section B. III. 4. a).

De plus, des travaux récents menés au sein de l'équipe ont confirmé la similitude architecturale des cycles veille-sommeil entre le primate non humain et l'homme. Par ailleurs, ces recherches ont retrouvé des troubles du sommeil chez les singes rendus parkinsoniens, avec notamment l'apparition de somnolence diurne excessive ainsi que des altérations du sommeil paradoxal (Barraud et al., 2009). Ces résultats ont conduit à la validation de l'utilisation du primate non humain intoxiqué au MPTP comme étant le modèle le plus approprié pour l'étude des troubles du sommeil dans le cadre de la MP.

# **OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE**

## Objectifs du projet de recherche

La maladie de Willis-Ekbom et la maladie de Parkinson partagent des altérations du cycle veille-sommeil et leur physiopathologie impliquent des dysfonctionnements de la transmission dopaminergique ainsi qu'une perturbation du métabolisme du fer.

Comme décrit dans l'introduction, la physiopathologie de la MWE reste mal connue. Comprendre cependant l'interaction entre les deux acteurs principaux supposés de cette maladie, le fer et la dopamine, est un premier pas nécessaire et fondamental pour élucider les mécanismes sous tendant le développement des symptômes de cette maladie et en rationaliser les stratégies thérapeutiques. C'est guidé par cet objectif principal que nous avons voulu tester l'impact d'une carence en fer sur les principaux systèmes monoaminergiques impliqués dans la MWE, notamment la dopamine et la sérotonine. A terme, les résultats de ces travaux pourraient nous permettre d'avancer vers un modèle de MWE chez le primate non humain. Afin de bien mener à terme notre objectif principal, nous avons dans un premier temps, et pour la première fois chez le primate non humain, évalué les variations circadiennes du fer à la fois au niveau sanguin et au niveau du LCR chez le macaque naïf puis mesuré les taux des monoamines *in vivo* et *post-mortem* à différents niveaux de carence martiale. De plus, nous avons évalué les conséquences de cette carence martiale induite et progressive sur l'activité locomotrice globale de ces animaux.

Par ailleurs, les symptômes non-moteurs les plus fréquents et les plus handicapants de la MP sont la somnolence diurne excessive et les troubles du sommeil paradoxal. Bien que les mécanismes pathologiques puissent induire ces troubles du cycle veille-sommeil, les agonistes dopaminergiques D2/D3 prescrits aux patients sembleraient les aggraver. Ainsi, nous avons cherché à évaluer l'implication des agonistes dopaminergiques dans les troubles du sommeil dans un modèle expérimental de la MP. Pour cela nous avons utilisé le modèle primate non humain intoxiqué au MPTP qui reproduit les principaux symptômes cliniques et altérations pathologiques observées chez les patients.

Après avoir confirmé l'émergence de la somnolence diurne excessive et l'altération du sommeil paradoxal induite par une intoxication au MPTP, l'objectif de cette seconde partie était de tester l'impact des agonistes dopaminergiques sélectifs des récepteurs D1 et D2 sur ces symptômes.

En nous intéressant parallèlement à la MWE et à la MP, nous essayerons d'appréhender les conséquences des modifications dopaminergiques sur les altérations du repos.

# **MATERIELS ET METHODES**

## MATERIELS ET METHODES

### C. Animaux

L'ensemble des expériences de ce projet de recherche a été réalisé chez le primate non humain. Nous avons choisi ce modèle d'étude du fait des remarquables similitudes qu'il partage avec l'Homme tant du point de vue de l'organisation neuroanatomique que de l'architecture des cycles veille/sommeil (Kripke et al., 1968, Balzamo et al., 1977, Barraud et al., 2009). Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec la Directive du Conseil de la Communauté Européenne (2010/63/EU) pour le bien être des animaux de laboratoire, dans des locaux sous accréditation de l'*Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC)*. Les animaux ont été hébergés dans des cages individuelles avec un environnement enrichi soit par l'introduction d'objets dans leur cage et surtout par les interactions visuelles et auditives avec leurs congénères. Pour chaque expérience les conditions d'hébergement étaient contrôlées : température ( $24\pm 1^\circ\text{C}$ ), humidité ( $50\pm 20\%$ ), lumière (cycle de 12h de lumière et de 12h de nuit). Les animaux recevaient de la nourriture et de l'eau *ad libitum* (animaux utilisés pour l'étude des cycles veille-sommeil).

La partie *in vivo* des expériences concernant l'impact d'une carence en fer sur le métabolisme dopaminergique, a été intégralement réalisée en Chine, avec l'approbation de l'*Institute of Laboratory Animal Sciences* (Académie Chinoise des Sciences Médicales de Pékin, 10021, Chine). Pour cette partie 20 singes cynomolgus mâles adultes (*Macaca fascicularis*) âgés de  $7\pm 2$  ans et pesant entre 5 et 7,60kg ont été utilisés. Ces animaux originaires de l'élevage de Xiexin (Beijing, People's Republic of China), étaient hébergés dans des cages individuelles (80cm de hauteur x 60cm largeur x 70cm longueur). Les animaux étaient régulièrement suivis par une équipe de maintenance spécialisée dans les soins pour primate non humain, sous contrôle vétérinaire.

La partie concernant l'impact des agonistes dopaminergiques sur les troubles veille-sommeil, chez un modèle primate non humain de la maladie de Parkinson, a été intégralement réalisée dans les locaux de l'Université Bordeaux Ségalen, en accord avec la législation du Ministère de l'Agriculture et de la Forêt (87-848). Pour cette partie 3 singes rhésus femelles adultes (*Macaca mulatta*) âgées de  $10\pm 3$  ans et pesant entre 5 et 7kg ont été utilisées. L'intégralité des expériences de cette partie s'inscrit dans un protocole de prise en charge du bien être des animaux de laboratoire identifié et validé par le Comité d'Ethique de l'Université Bordeaux Ségalen (CEEA50 ; saisine n° 50120102). Les animaux étaient hébergés dans des

cages individuelles (80cm de hauteur x 85cm de largeur x 100cm de profondeur), en conformité avec les recommandations du « Weatherall report for the use of non-human primates » (Weatherall, 2006) et étaient rassemblés dans la même pièce afin d'établir un environnement rassurant et favorisant les interactions sociales au travers de contacts visuels et auditifs. De cette manière, les animaux ont eu un sommeil de base normal et reposant comme le montrent nos résultats en conditions de base.

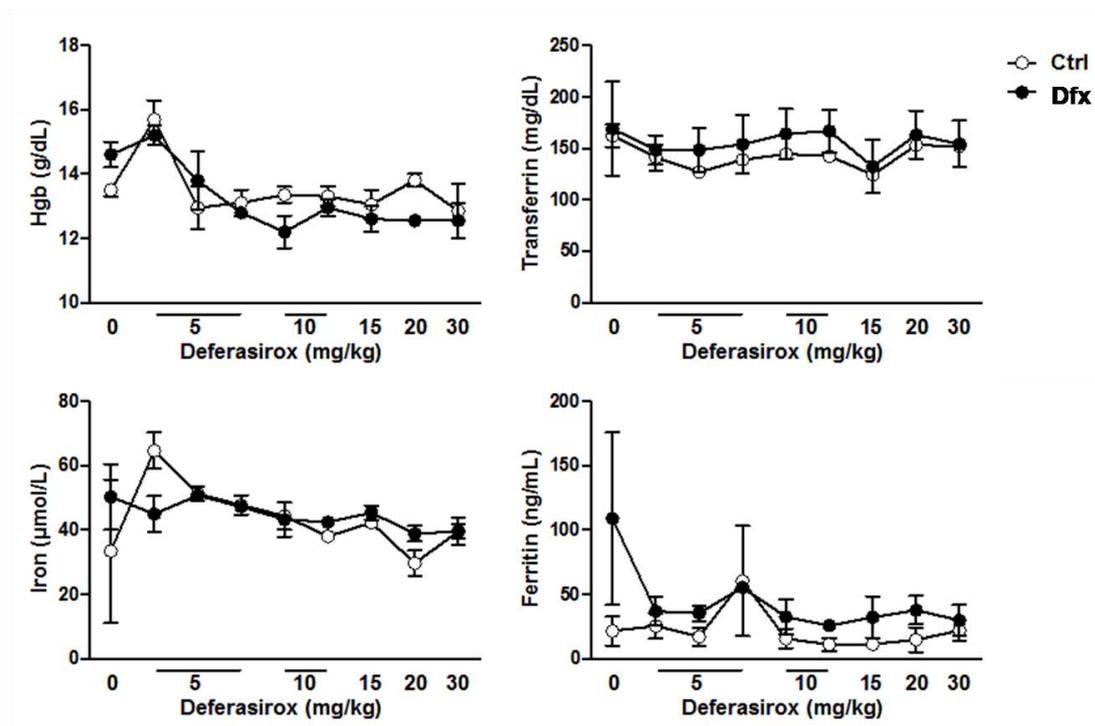
## **D. Modèle macaque d'une carence en fer sérique**

En raison du caractère exploratoire et novateur de notre expérimentation, la mise en place d'une carence en fer sérique chez le primate non humain a nécessité une phase de mise au point. En effet, les traitements utilisés chez l'humain pour réduire les taux de fer sérique (Brittenham, 2011), ainsi que les méthodes utilisées chez le rat pour induire une anémie (Youdim and Yehuda, 1985, Chen, 1995, Nelson et al., 1997) se sont révélées inefficaces chez le macaque. Aussi, et après plusieurs tentatives infructueuses de produire une carence martiale chez nos animaux, nous avons mis en place un protocole consistant en des saignées répétées, en vue de reproduire sur le moyen terme les conditions de carence en fer sérique parfois observées chez les patients affectés par la MWE (Sun et al., 1998, Mizuno et al., 2005, Allen and Earley, 2007). Les différentes approches sont présentées ci-dessous.

### **D. I. Effet d'un traitement par chélateur de fer**

Dans une étude pilote, nous avons testé les effets du déferasirox (Exjad, Novartis Pharma, Suisse) sur deux animaux pendant 3 mois. Le déferasirox est un chélateur de fer utilisé pour réduire les taux de fer sérique anormalement élevés, notamment chez les personnes qui reçoivent des transfusions sanguines sur le long terme ou chez ceux atteints d'hémochromatose (Brittenham, 2011). Ainsi, 2 animaux ont reçu des doses croissantes de déferasirox par gavage. Des analyses de sang et de sérum ont été réalisées tous les 14 jours pendant 2 mois puis tous les 7 jours pendant 1 mois, pour déterminer à partir de quel moment et de quelle dose le déferasirox diminue les taux d'hémoglobine, de fer et de ferritine. Après 3 mois de traitement et après utilisation de doses supramaximales de déferasirox pendant une durée suffisante et nécessaire recommandée pour voir apparaître chez l'homme un effet thérapeutique, aucune variation n'a été observée pour ces paramètres au niveau de la circulation sanguine périphérique, comparé aux concentrations de base de

ces mêmes animaux et à ceux de 2 autres animaux naïfs, qui avaient reçu en parallèle des gavages d'eau. Les résultats sont présentés ci-dessous (**Figure 18**).



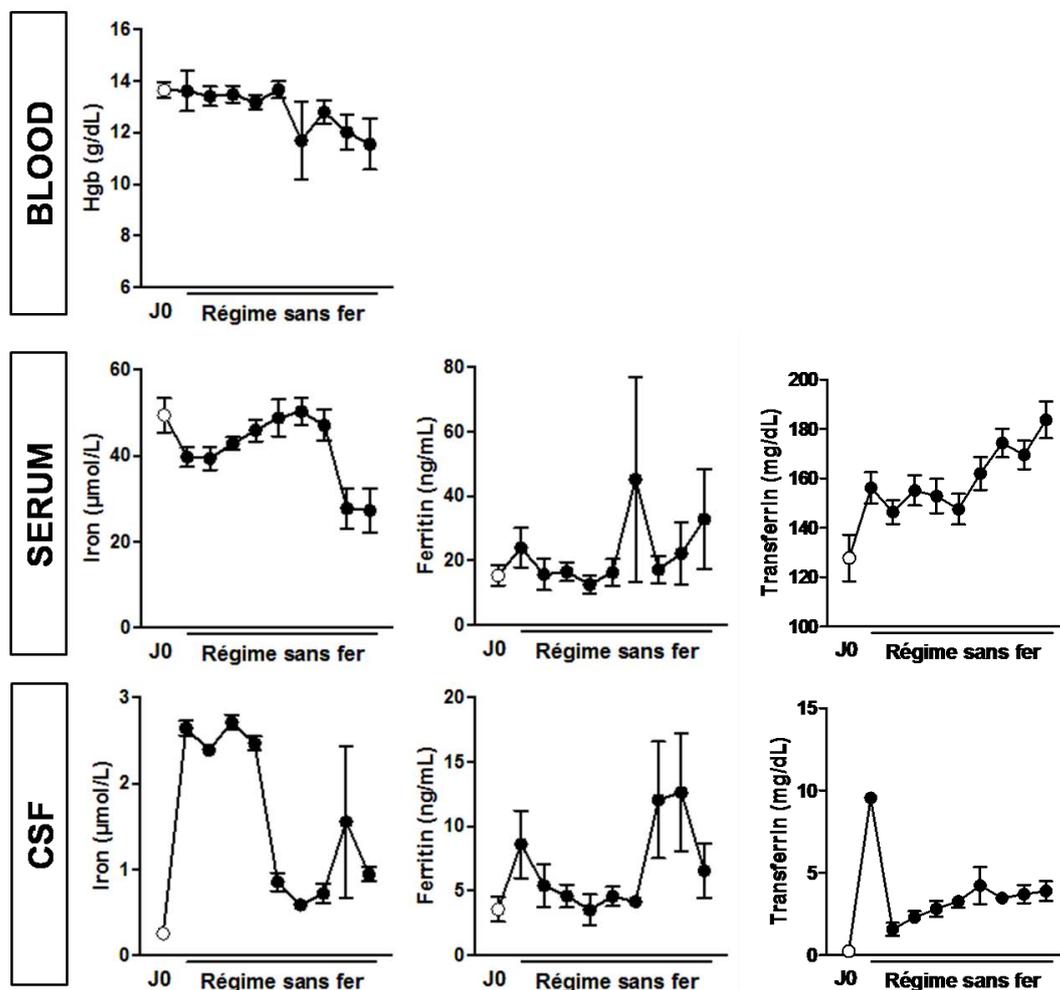
**Figure 18** : Profil des taux de fer sérique et des protéines associées au cours du traitement au déférasirox.

Les concentrations sont présentées en g/dL, mg/dL, µmol/L et ng/mL de manière respective pour l'hémoglobine, la transferrine, le fer et la ferritine, ± l'erreur standard. Ctrl=contrôle ; Dfx=déférasirox ; Hgb=hémoglobine.

## D. II. Effet d'un régime alimentaire privé en fer

N'obtenant pas de réponse avec le traitement au déférasirox sur le moyen terme et avec les doses supramaximales utilisées chez l'Homme (Brittenham, 2011), nous avons mis en place un protocole de carence par régime alimentaire dépourvu de fer, telles que les carences en fer sérique sont généralement induites pour les modèles de l'anémie chez le rongeur (Youdim and Yehuda, 1985, Chen, 1995, Nelson et al., 1997). Ainsi, 9 animaux ont reçu des quantités déterminées de nourriture strictement dépourvue en fer (80g/animal/jour) (SAUE Ltd Old World Monkey pellets, Pékin, Chine). Tous les animaux étaient nourris à heures fixes trois fois par jours (30g à 8h et 14h puis 20g à 19h). La teneur de fer dans l'eau était également contrôlée (<0,3mg/L). Les taux d'hémoglobine, de fer, de ferritine et de transferrine étaient dosés dans le sang, le sérum et le LCR tous les 14 jours.

Après plus de trois mois de régime alimentaire dépourvu de fer, ni la concentration du fer, ni celle de ses protéines associées n'avaient varié dans le sérum, indiquant que les singes ne présentaient aucun signe biologique de déplétion en fer sérique. Ce n'est que qu'au bout de 14 semaines que nous avons observé une baisse soudaine des taux d'hémoglobine et de fer sérique. Cependant, l'état général des animaux étant sévèrement affaibli, nous avons dû, par souci éthique, procéder à l'arrêt du protocole expérimental (avis de l'expert vétérinaire chargé du suivi des animaux). L'évolution des taux d'hémoglobine ainsi que ceux de fer, de ferritine et de transferrine dans le sérum et le LCR sont présentés ci-dessous (**Figure 19**).



**Figure 19** : Variation des taux de fer et des protéines associées au cours du régime alimentaire carencé en fer.

Les concentrations sont présentées en g/dL,  $\mu\text{mol/L}$ , ng/mL, et mg/dL de manière respective pour l'hémoglobine, le fer, la ferritine et la transferrine  $\pm$  l'erreur standard. J0=dosages avant le début du protocole, au jour 0 ; CSF=liquide céphalorachidien ; Hgb=hémoglobine.

### D. III. Effet d'un protocole de saignées répétées (PSR)

Finalement, en raison de l'échec des protocoles précédant visant à obtenir un niveau de carence en fer contrôlé, nous avons considéré que ni le traitement par chélateur de fer, ni un régime alimentaire privé en fer ne constituaient des approches satisfaisantes pour induire une carence en hémoglobine et en fer sérique sur le moyen terme et sans compromettre l'intégrité sanitaire des animaux. Aussi, nous avons élaboré un protocole expérimental original consistant à réaliser des saignées répétées, nommé ici PSR, en suivant les recommandations de l'Association des Industries Pharmaceutiques de la Fédération Européenne et celles du Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives décrites pour le singe cynomolgus (Diehl et al., 2001). Comme décrit par une étude réalisée chez le macaque, les prélèvements sanguins répétés induisent des réductions du taux d'hémoglobine et de fer sérique sur le moyen terme (Wills, 1935).

Ainsi, les 9 animaux utilisés pour le PSR ont reçu un régime alimentaire classique, adapté aux apports nutritionnels journaliers pour macaque, dont la teneur moyenne en fer était de 150mg/kg de nourriture (80g/animal/jour) (SAUE Ltd Old World Monkey pellets, Pékin, Chine) afin d'éviter la détérioration de leur état de santé général. Les animaux ont été séparés en 3 groupes distincts ayant subi soit 4 (groupe1), soit 6 (groupe 2), soit 8 (groupe 3) saignées. Le volume d'une saignée correspondait à 5% du volume sanguin total (**Tableau 1**), chaque saignée était espacée de 4 jours et la durée totale du PSR était de 30 jours (**Tableau 2**). Le sang prélevé toutes les deux saignées a été utilisé pour tester les taux d'hémoglobine et pour en extraire le sérum. De plus, une ponction lombaire était effectuée parallèlement et simultanément aux prélèvements sanguins destinés à contrôler la progression des paramètres du métabolisme du fer. Les concentrations d'hémoglobine étaient analysées le jour même du prélèvement, tandis que les échantillons de sérum et de LCR ont été stockés à -80°C et analysés en même temps à la fin du protocole (voir la partie Résultats).

| Weight (g) | Total BV (g) | BW (ml) | Weight (g) | Total BV (g) | BW (ml) |
|------------|--------------|---------|------------|--------------|---------|
| 4000       | 320          | 16      | 6600       | 528          | 26,4    |
| 4100       | 328          | 16,4    | 6700       | 536          | 26,8    |
| 4200       | 336          | 16,8    | 6800       | 544          | 27,2    |
| 4300       | 344          | 17,2    | 6900       | 552          | 27,6    |
| 4400       | 352          | 17,6    | 7000       | 560          | 28      |
| 4500       | 360          | 18      | 7100       | 568          | 28,4    |
| 4600       | 368          | 18,4    | 7200       | 576          | 28,8    |
| 4700       | 376          | 18,8    | 7300       | 584          | 29,2    |
| 4800       | 384          | 19,2    | 7400       | 592          | 29,6    |
| 4900       | 392          | 19,6    | 7500       | 600          | 30      |
| 5000       | 400          | 20      | 7600       | 608          | 30,4    |
| 5100       | 408          | 20,4    | 7700       | 616          | 30,8    |
| 5200       | 416          | 20,8    | 7800       | 624          | 31,2    |
| 5300       | 424          | 21,2    | 7900       | 632          | 31,6    |
| 5400       | 432          | 21,6    | 8000       | 640          | 32      |
| 5500       | 440          | 22      | 8100       | 648          | 32,4    |
| 5600       | 448          | 22,4    | 8200       | 656          | 32,8    |
| 5700       | 456          | 22,8    | 8300       | 664          | 33,2    |
| 5800       | 464          | 23,2    | 8400       | 672          | 33,6    |
| 5900       | 472          | 23,6    | 8500       | 680          | 34      |
| 6000       | 480          | 24      | 8600       | 688          | 34,4    |
| 6100       | 488          | 24,4    | 8700       | 696          | 34,8    |
| 6200       | 496          | 24,8    | 8800       | 704          | 35,2    |
| 6300       | 504          | 25,2    | 8900       | 712          | 35,6    |
| 6400       | 512          | 25,6    | 9000       | 720          | 36      |
| 6500       | 520          | 26      |            |              |         |

**Tableau 1 : Calcul du volume de sang théorique à prélever pour une saignée dans le cadre du PSR (5% du volume de sang total de l'animal).**

D'après les recommandations pour singe cynomolgus (Diehl et al., 2001).  
 Weight=poids de l'animal en gramme ;  
 Total BV=volume de sang total théorique (entre 6 et 10% du poids de l'animal, ici moyenné à 8% du poids) ;  
 BW=*blood withdrawal*, soit le volume d'une saignée en mL (5% du volume de sang total, lui-même ajusté en fonction de l'évolution du poids de l'animal).

| D23 = END of Part 1  |      |      |      |      |           |      |      |      |      |      |                |               |                |
|----------------------|------|------|------|------|-----------|------|------|------|------|------|----------------|---------------|----------------|
| D1 = START of Part 2 |      |      |      |      |           |      |      |      |      |      |                |               |                |
| Date                 | Days | BW   |      |      | SAMP/TEST | Date | Days | BW   |      |      | SAMP/TEST      | ACTIMETRY     |                |
|                      |      | Grp3 | Grp2 | Grp1 |           |      |      | Grp3 | Grp2 | Grp1 |                |               |                |
| 1                    |      |      |      |      |           | 1    | D6   |      |      |      |                |               |                |
| 2                    |      |      |      |      |           | 2    | D7   |      |      |      |                |               |                |
| 3                    |      |      |      |      |           | 3    | D8   |      |      |      |                |               |                |
| 4                    |      |      |      |      |           | 4    | D9   | BW 3 | BW 1 |      |                |               |                |
| 5                    |      |      |      |      |           | 5    | D10  |      |      |      |                |               |                |
| 6                    |      |      |      |      |           | 6    | D11  |      |      |      |                | 8am=Grp3      | 8pm=Grp3       |
| 7                    |      |      |      |      |           | 7    | D12  |      |      |      |                |               |                |
| 8                    |      |      |      |      |           | 8    | D13  | BW 4 | BW 2 |      | Grp3 + Grp2    |               |                |
| 9                    |      |      |      |      |           | 9    | D14  |      |      |      |                |               |                |
| 10                   |      |      |      |      |           | 10   | D15  |      |      |      |                |               |                |
| 11                   |      |      |      |      |           | 11   | D16  |      |      |      |                |               |                |
| 12                   |      |      |      |      |           | 12   | D17  | BW 5 | BW 3 | BW 1 |                |               |                |
| 13                   |      |      |      |      |           | 13   | D18  |      |      |      |                |               |                |
| 14                   |      |      |      |      |           | 14   | D19  |      |      |      |                | 8am=Grp3/Grp2 | 8pm= Grp3/Grp2 |
| 15                   |      |      |      |      |           | 15   | D20  |      |      |      |                |               |                |
| 16                   |      |      |      |      |           | 16   | D21  | BW 6 | BW 4 | BW 2 | Grp3+Grp2+Grp1 |               |                |
| 17                   |      |      |      |      |           | 17   | D22  |      |      |      |                |               |                |
| 18                   |      |      |      |      |           | 18   | D23  |      |      |      |                |               |                |
| 19                   |      |      |      |      |           | 19   | D24  |      |      |      |                |               |                |
| 20                   |      |      |      |      |           | 20   | D25  | BW 7 | BW 5 | BW 3 |                |               |                |
| 21                   |      |      |      |      |           | 21   | D26  |      |      |      |                |               |                |
| 22                   |      |      |      |      |           | 22   | D27  |      |      |      |                | 8am=Grp2/Grp1 | 8pm=Grp2/Grp1  |
| 23                   |      |      |      |      |           | 23   | D28  |      |      |      |                | 8am= Grp3     | 8pm=Grp3       |
| 24                   |      |      |      |      |           | 24   | D29  | BW 8 | BW 6 | BW 4 | Grp3+Grp2+Grp1 |               |                |
| 25                   |      |      |      |      |           | 25   | D30  |      |      |      |                |               |                |
| 26                   |      |      |      |      |           | 26   | D31  |      |      |      |                |               |                |
| 27                   | D1   | BW 1 |      |      |           | 27   | D32  |      |      |      |                |               |                |
| 28                   | D2   |      |      |      |           | 28   | D33  |      |      |      |                |               |                |
| 29                   | D3   |      |      |      |           | 29   | D34  |      |      |      |                |               |                |
| 30                   | D4   |      |      |      |           | 30   | D35  |      |      |      |                |               |                |
| 31                   | D5   | BW 2 |      |      | Grp3      | 31   | D36  |      |      |      |                |               |                |

**Tableau 2 : Planning indicatif des actions à réaliser pendant le PSR.**

BW=*blood withdrawal*, cases correspondant aux jours de saignées respectifs pour les animaux du groupe 3 (Grp3, case rouge), du groupe 2 (Grp2, cases vertes) et du groupe 1 (Grp1, case bleues) ; SAMP/TEST (cases bordeaux)=jours de tests pour l'hémoglobine et pour la collecte du sérum et du LCR ; ACTIMETRY(cases jaunes)=tests d'actimétrie diurne (8h-12h) ; ACIMETRY (cases bleues claires)=tests d'actimétrie nocturne (20h-8h) ; MICRODIALYSIS (cases gris-bleues)= jours de chirurgies pour la microdialyses *in vivo* pour les 9 animaux ayant subi le PSR + 2 animaux naïfs (espèces, âges, sexes équivalents à ceux des animaux ayant subi le PSR).

---

#### D. IV. Evaluation de l'activité locomotrice générale par actimétrie

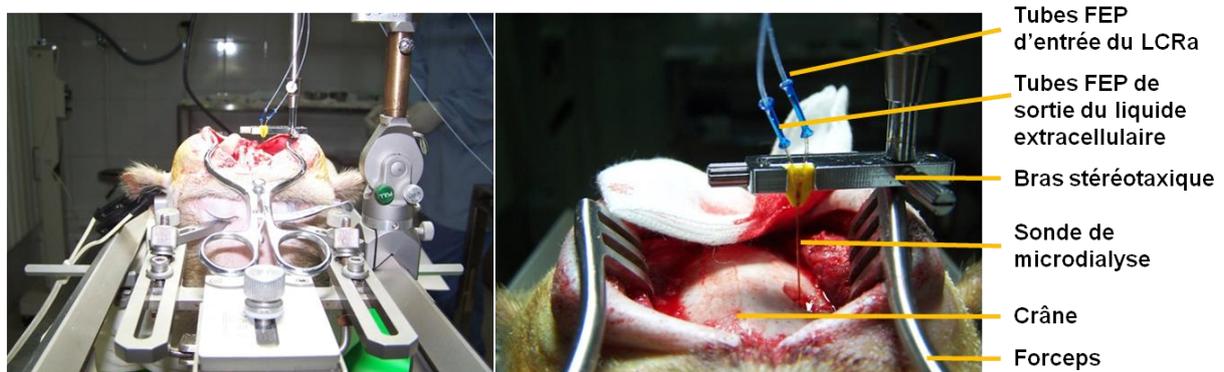
Des tests d'actimétrie ont été réalisés chez les 9 animaux avant et pendant le PSR. Ce test comportemental permet de mesurer l'activité locomotrice globale spontanée des animaux. Les animaux étaient placés individuellement dans des cages semblables aux cages de stabulation. Des capteurs infrarouges étaient disposés sur les côtés des cages, à différents niveaux de hauteur et de profondeur. Ainsi, les déplacements étaient quantifiés par un logiciel (Excalibur, University of Manchester) qui permettait de comptabiliser le total des déplacements de l'animal toutes les 5 minutes. Une séance d'habituation diurne et une séance d'habituation nocturne ont permis aux animaux d'être confrontés à l'environnement avant les tests, afin d'éviter les comportements exploratoires dus à la nouveauté lors des mesures de l'activité locomotrice. Les séances d'habituation et de tests diurnes ont été réalisées de 8h à 12h et les séances nocturnes de 20h à 8h le lendemain (**Tableau 2**).

#### D. V. Implantation de sondes de microdialyse

Les animaux ont reçu une dose de kétamine (10mg/kg injectée en intramusculaire) afin d'être intubés puis reliés au système d'anesthésie gazeuse par isoflurane (1,5%, Belamont, Nicholas Pyramal, Ltd). Les animaux ont ensuite été placés dans un cadre stéréotaxique (**Figure 20**) pour procéder à la chirurgie. L'os du crâne a été mis à nu pour permettre de percer une fenêtre dans le crâne de l'animal et placer la sonde de microdialyse (Sonde CMA11 - cut-off 6000 Daltons, PHYMEP, France) aux coordonnées stéréotaxiques ciblant le putamen (+18mm en position antéro-postérieur,  $\pm$ 10mm en position latérale et +14mm en position dorso-ventrale à partir des barres d'oreilles) (Martin and Bowden, 1996, Berton et al., 2009).

Une fois placée dans la structure cible, une période de 2 heures a été nécessaire pour l'équilibration de la sonde de microdialyse avant de commencer la collecte des échantillons. La sonde de microdialyse était reliée à 2 tubes (tubes FEP, 1 mètre, PHYMEP, France)

permettant soit de perfuser la sonde avec du LCR artificiel (HARVARD apparatus, Harvard Bioscience Company, USA), soit de récolter le liquide extracellulaire provenant directement du putamen de l'animal. Le LCR artificiel était perfusé à l'aide d'une pompe (Double corps, CMA 402, PHYPEP, France) réglée à 1 $\mu$ L/min (**Figure 20**). Les échantillons ont été récoltés en continu et chaque tube de collecte était changé toutes les 20 minutes, et ce pendant 2 heures. La récolte des dialysats s'est effectuée dans des tubes stériles sur de la glace, afin de préserver les monoamines de la dégradation enzymatique. Puis les échantillons ont été placés à -80°C avant d'être analysés.



**Figure 20** : Implantation de la sonde de microdialyse.

Singe cynomolgus placé dans le cadre stéréotaxique pendant l'expérience de microdialyse, sous anesthésie gazeuse (gauche). Agrandissement sur le dispositif de microdialyse (droite). LCRA=liquide céphalorachidien artificiel.

## D. VI. Dosages du fer et protéines associées

Les échantillons de sang, de sérum et de LCR prélevés au cours des différentes approches expérimentales de carence en fer décrites ci-dessus, ont systématiquement suivi le même processus d'analyse pour l'hémoglobine, le fer, la ferritine et la transferrine. Ces échantillons ont été analysés dans les laboratoires de l'*Institute of Laboratory Animal Sciences* (Académie Chinoise des Sciences Médicales de Pékin, 10021, Chine). Tous les prélèvements ont été réalisés sur animaux vigiles.

Pour les dosages d'hémoglobine, le sang a été prélevé à l'aide de tubes EDTA-K3E de 1,2mL (S-Monovette - 1,6mg K3EDTA - Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne), puis analysé par la méthode HiCN (SIEMENS ADVIA 60) qui est la technique de référence pour le dosage de l'hémoglobine. Cette méthode spectrophotométrique permet de quantifier la quantité d'hémoglobine dégradée en hémoglobinecyanide (HiCN) dont la longueur d'onde d'absorption est 540nm (Zwart, 1993).

Les échantillons de sérum ont été séparés à partir des prélèvements de sang, après 10 minutes de centrifugation (7000rpm) à 4°C, puis placés à -80°C avant d'être analysés. Les échantillons de LCR ont été récoltés entre la 3<sup>ème</sup> et la 5<sup>ème</sup> vertèbre lombaire, centrifugés (2000rpm) pendant 10 minutes à 4°C puis stockés à -80°C avant d'être analysés. Les dosages de fer ont été réalisés par la technique ferène (HITACHI 7080). Cette méthode repose sur l'absorbance du complexe coloré fer-ferène qui est mesuré à 604nm. Les dosages de ferritine ont été réalisés par chemiluminescence (ABBOTT ARCHITECT I2000). La ferritine de l'échantillon est retenue par des anticorps anti-ferritine, puis une solution d'activation est ajoutée afin de produire la réaction de chemiluminescence, mesurée en unité relative de lumière. La transferrine a été dosée par immunonéphélometry (HITACHI 7080). Cette technique repose sur la quantification de l'absorption de la lumière par des complexes antigènes-anticorps, en excès d'anticorps, selon la courbe d'Heidel Berger.

#### D. VII. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Les dialysats et les échantillons tissulaires ont été analysés par CLHP couplée à la détection électrochimique, avec des conditions distinctes pour les deux types d'analyse. En effet, l'analyse des dialysats (constituants extracellulaires) nécessite une très grande sensibilité (1 femtomole de limite de détection) contrairement aux échantillons tissulaires (constituants intracellulaires).

Les dialysats ont été directement injectés dans le système de CLHP à l'aide d'un injecteur manuel (vanne 7725i, Rhéodyne, CIL Cluzeau, Sainte-Foy la Grande). La phase mobile de la CLHP (0,1mM EDTA, 0,1mM d'acide octane sulfonique, 70mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 15% de méthanol, ajustée à pH 4,5) était délivrée dans le circuit par une pompe (système LC20-AD, Shimadzu) à un débit constant (0,25mL/min) à travers une colonne en phase inverse (Equisyl-BDS C18 ; Ø 2mm, L 250mm ; granulométrie 5µm). Suite à leur ségrégation, les molécules sont oxydées grâce à la cellule de détection électrochimique. Celle-ci est constituée d'une électrode de travail (potentiel d'oxydation : +500mV) et d'une électrode de référence Ag/AgCl (VT-03 ; AlphaMos, Toulouse, France). Après l'oxydation des monoamines et de leurs métabolites, par l'électrode de référence, un détecteur (AntecLeyden DECADE II, Alpha-mos) transforme le signal d'oxydation (les électrons libérés) en signal électrique qui est visualisé sur ordinateur (système AZUR).

Pour l'analyse des échantillons tissulaires, des « punches » de 300µm ont été prélevés dans les structures d'intérêt (noyau caudé, putamen, substance noire, hypothalamus latéral, cortex préfrontal, cornes dorsales et ventrales de la moelle épinière). Le tissu a été lysé

avec l'ajout de 400µl d'acide perchlorique HClO<sub>4</sub> (0,1 N), puis homogénéisé et centrifugé à 13000t/min pendant 30 minutes à 4°C, afin de prélever et d'injecter directement 20µl de surnageant *via* un injecteur automatique (Shimadzu, SIL-20AC, France). Le système de CLHP se compose d'une phase mobile (0,1mM EDTA, 2mM d'acide octane sulfonique, 70mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 7% de méthanol, ajustée à pH 4) délivrée à débit constant (1,2mL/min) à l'aide d'une pompe isocratique (Pompe GOLD 116, Beckman), dans une colonne en phase inverse (Kromasyl-ODS C8, Ø 4,6, L=150mm, granulométrie: 5µm), et une cellule de détection coulométrique (ESA 5011). La cellule est couplée à un détecteur (Coulochem 5100, ESA) et une interface d'acquisition (système Chromnav, Jasco, France).

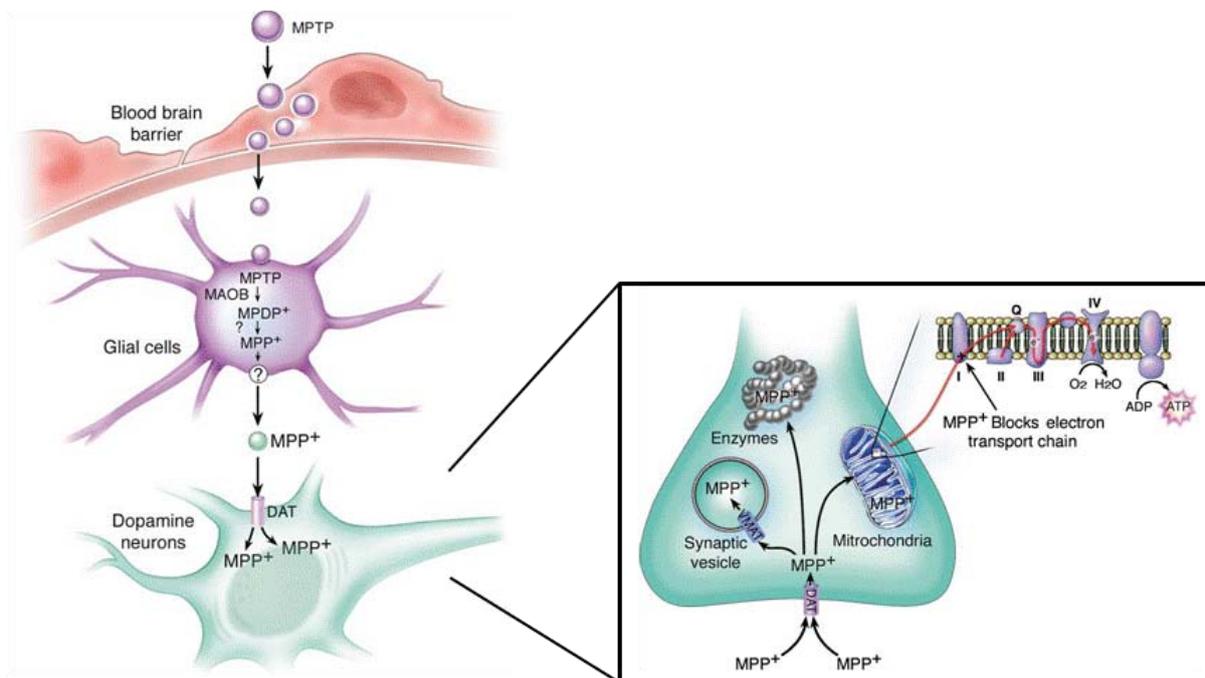
## **E. Modèle macaque de la maladie de Parkinson**

### **E. I. Injections de la neurotoxine MPTP**

Le syndrome parkinsonien a été induit chez 3 animaux, par des injections systémiques de 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), conduisant notamment à une dénervation massive de la voie nigro-striée (Langston et al., 1984).

Après dissolution dans une solution saline injectable (NaCl 0,9%), le MPTP a été administré par voie intraveineuse (saphène ou fémorale) sur animaux vigiles, à une concentration de 0,5 mg/kg suivant un protocole précédemment décrit : une injection tous les 3 à 4 jours jusqu'à l'obtention de symptômes parkinsoniens stables et sévères (Ghorayeb et al., 2000).

Le MPTP est une neurotoxine capable de franchir la barrière hémato-encéphalique en raison de sa nature hautement lipophile (Markey et al., 1984). Une fois dans le cerveau, le MPTP est converti en MPP<sup>+</sup> par la monoamine oxydase B (MAO-B) au niveau des cellules gliales ou dopaminergiques. Le MPP<sup>+</sup> est libéré dans l'espace extracellulaire, puis du fait de sa haute affinité pour le transporteur de la dopamine, il se concentre notamment dans les neurones dopaminergiques. Au niveau de ces neurones, le MPP<sup>+</sup> peut alors suivre 3 routes. En effet, il peut se concentrer au niveau des mitochondries où il bloque la chaîne de transporteur d'électrons (complexe I, effet toxique). Le MPP<sup>+</sup> peut également interagir avec des enzymes cytosoliques (effet toxique) ou encore être séquestré dans des vésicules synaptiques *via* le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT, effet protecteur). L'ensemble de ces perturbations conduit notamment à la formation de radicaux libres (les ROS=reactive oxygen species) entraînant une diminution de production d'ATP et par conséquent la mort cellulaire (**Figure 21**).



**Figure 21 :** Représentation schématique du métabolisme du MPTP suite à une administration systémique. Adapté d'après (Dauer and Przedborski, 2003).

## E. II. Evaluation de l'activité motrice de base

L'évolution clinique de l'activité motrice des animaux au fur et à mesure de l'induction du syndrome parkinsonien a été évaluée, tous les après-midi (14h) pendant 15 minutes à l'aide de l'échelle semi quantitative de Benazzouz (Benazzouz et al., 1993, Imbert et al., 2000). Cette échelle est basée sur la combinaison de sept symptômes moteurs : tremblements (score de 0 à 3), posture générale (0-3), activité locomotrice globale (0-3), vocalisations (normales : 0, à absentes : 2), blocages cinétiques (0-2), rigidité des membres (0-3 pour chaque membre supérieur) et mouvements dirigés vers un but tel que la nourriture, (0-3). Un score supérieur ou égal à 15 correspond à un syndrome parkinsonien sévère. L'activité locomotrice générale diurne et nocturne des animaux a été enregistrée grâce au dispositif de télémétrie (D70-EEE, Data Sciences International, St Paul, MN, USA) (Barraud et al., 2009).

### E. III. Implantation du dispositif de télémétrie

#### E. III. 1. Appareillage

Pour l'exploration du sommeil, les animaux ont été chroniquement implantés avec un radio-transmetteur permettant des enregistrements continus sur une longue durée (jusqu'à 90 jours théoriques) comme précédemment décrit (Barraud et al., 2009). Le transmetteur implanté consiste en un boîtier circulaire stérile (37 grammes, diamètre 5,5 cm) duquel sortent trois voies d'électrodes bipotentiels (D70-EEE, Data Sciences International, St Paul, MN, USA) servant à mesurer l'activité électroencéphalographique (EEG), électromyographique (EMG) et électrooculographique (EOG) avec un taux d'échantillonnage de 500 Hz. Le dispositif permettait également l'enregistrement de l'activité globale des animaux. L'allumage et l'extinction du transmetteur se faisaient grâce à un interrupteur magnétique activé par le passage d'un aimant à proximité de l'animal. Les câbles flexibles de 60 cm de long et constitués d'une électrode extensible enroulée en hélice entourée d'un tube de silicone flexible sont au nombre de 7 : un pour la masse, et 2 pour chaque autre voie d'enregistrement (EEG, EMG, EOG). Les signaux bioélectriques émis par le transmetteur implanté étaient transmis par télémétrie à 2 récepteurs positionnés sur la cage de l'animal, puis envoyés à une matrice d'échange reliée à un ordinateur, pour le stockage des données. Cette technique de télémétrie permettait donc aux animaux d'être totalement libres de leurs mouvements.

#### E. III. 2. Implantation chirurgicale du transmetteur

Après prémédication avec 1mg/kg de diazépam (Valium, Roche), 0,05 mg/kg d'atropine sulfate et 10 mg/kg kétamine chlorhydrate injecté en intramusculaire, les animaux ont été intubés et anesthésiés sous isoflurane volatil (2%). Le transmetteur a été implanté entre deux couches musculaires abdominales. Les câbles d'électrodes ont été remontés sous la peau jusqu'au crâne et l'extrémité des électrodes a été implantée directement dans une incision faite dans l'os et recouverte de ciment dentaire au niveau de la dépression orbitale (signal EOG), au niveau pariéto-occipital (signal EEG) et au niveau frontal (masse). Les deux électrodes EMG restantes ont été suturées au niveau du muscle trapèze. Les animaux ont été placés sous un traitement prophylactique antibiotique (amoxiciline 0,1mL/kg, 1 injection sous cutané par jour ; Duphamox LA, Fort Dodge A.H.) un jour avant l'opération et pendant les 2 semaines suivantes. Un traitement analgésique a été délivré par des injections quotidiennes intramusculaires de ketoprofène (2 mg/kg, Ketofen ; Merial,

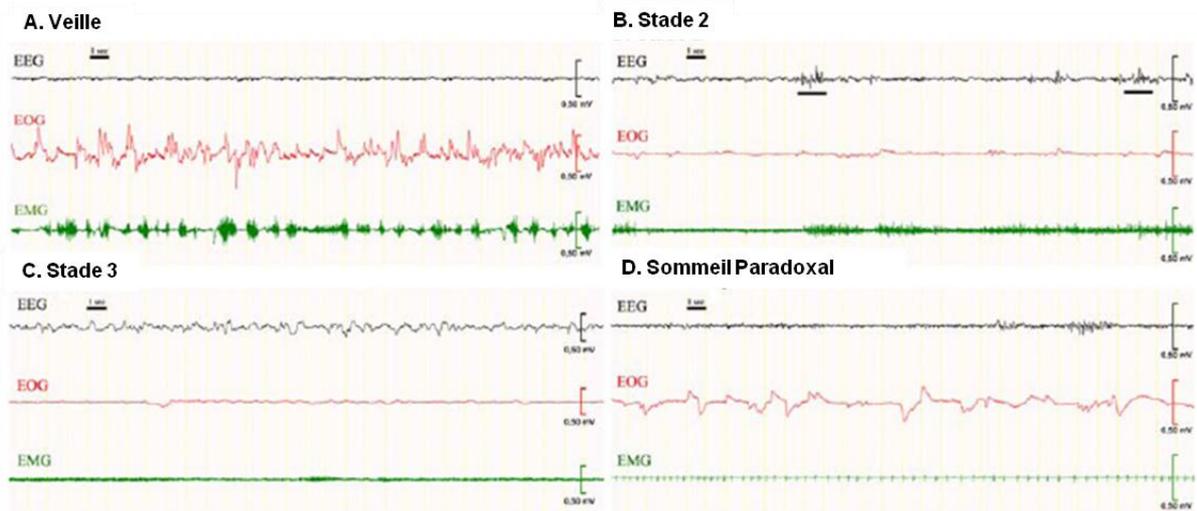
France) pendant 10 jours. Les animaux ont bénéficié d'une période de récupération postopératoire de 30 jours avant le début des enregistrements.

#### E. IV. Analyse des stades de vigilance

Les données relatives au sommeil des animaux ont été analysées de 20h (extinction des lumières) à 8h (allumage des lumières). Les données relatives à l'état de vigilance des animaux durant la journée ont été analysées de 8h à 20h. L'analyse des stades de sommeil a été réalisée en différé à l'aide du logiciel SleepSign for Animal (Kissei Comtec Co., Ltd, Matsumoto, Nagano, Japon) en étudiant l'amplitude, la durée et la fréquence des grapho-éléments EEG et leurs relations avec les mouvements oculaires et l'activité musculaire sur des époques de 30 secondes, comme chez l'homme.

L'analyse des stades de sommeil a été réalisée manuellement selon les mêmes critères que ceux définis chez l'homme par Rechtschaffen et Kales pour l'analyse du sommeil (Rechtschaffen A., 1968, Balzamo et al., 1977, Barraud et al., 2009). A chaque époque de 30 secondes a été attribué un stade de sommeil. Les stades de vigilance identifiés ont été l'éveil, le sommeil lent léger (stades 1-2), le sommeil lent profond (stade 3) et le sommeil paradoxal.

Le **stade d'éveil** a été repéré lorsqu'il y avait la combinaison d'un signal EEG rapide et de faible amplitude, d'un signal EOG de haute amplitude et de bouffées d'activités musculaires (**Figure 22A**). Le **stade 1** de sommeil a été identifié par la combinaison de mouvements oculaires ralentis (bas voltage), de fréquence EEG ralentie et d'une activité musculaire régulière et ralentie. Le **stade 2** a été reconnu lorsque des grapho-éléments caractéristiques sur le signal EEG apparaissaient (complexes « k-spindle ») couplés à une absence d'activité oculomotrice (**Figure 22B**). Comme chez l'homme, les stades de sommeil lent profond ont été identifiés lorsque le signal EEG était de faible fréquence et de haute amplitude : le **stade 3** a été déterminé lorsque ces ondes lentes ou ondes delta occupaient plus de 25% de l'époque (**Figure 22C**). Enfin, le **sommeil paradoxal** a été caractérisé par la combinaison d'un signal EEG rapide et peu ample, semblable à l'état de veille, combiné à des mouvements oculaires rapides ainsi qu'à une atonie musculaire (**Figure 22D**). Quelques artéfacts de mouvement ont été observés durant l'éveil. Peu d'artéfacts ont été détectés durant la nuit mais les époques polluées par des artéfacts ont été exclues de l'analyse. L'analyse des stades de vigilance a été réalisée en aveugle.



**Figure 22 :** Epoques de 30 secondes montrant : **(A) stade de veille** avec activité EOG importante (en rouge) rapide et de grande amplitude, activité EEG (en noir) rapide et de bas voltage, activité EMG (en vert) de haut voltage ; **(B) stade 2** avec des « spindles » caractéristiques de ce stade (fuseaux de sommeil) sur l'EEG (soulignés), réduction de l'activité oculaire et tonus musculaire régulier ; **(C) stade 3** avec des activités EEG faites de fréquences amples *delta* et d'une réduction du tonus musculaire ; **(D) sommeil paradoxal** avec une activité EEG en dents de scie, des mouvements oculaires rapides caractéristiques associés à une atonie musculaire.

## E. V. Traitements pharmacologiques

Afin de tester les conséquences d'une stimulation du système dopaminergique sur les cycles veille-sommeil, nous avons administré des agonistes dopaminergiques ciblant les récepteurs de type D1 ou D2, quand les animaux présentaient un syndrome parkinsonien stable (stabilisation des symptômes moteurs ainsi que des paramètres de sommeil depuis 2 semaines consécutives).

Une étude pilote précédemment menée dans notre laboratoire a permis de déterminer la dose d'utilisation de chaque agoniste en se basant sur un critère d'amélioration des symptômes moteurs de 50% au moins comme précédemment décrit (Boraud et al., 2001). Chaque agoniste a été administré par voie intramusculaire une fois par jour à 18h, pendant 5 jours consécutifs et un intervalle de 2 semaines de *wash-out* était respecté entre chaque séance de traitement. Le quinpirole (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), agoniste dopaminergique sélectif des récepteurs de type D2/D3 et le SKF 38393 (Sigma-Aldrich), agoniste sélectif des récepteurs dopaminergiques de type D1 ont été respectivement injectés à la dose de 1 mg/kg et 2,5mg/kg.

## F. Sacrifices des animaux et prélèvements

Suivant le type d'analyse *post-mortem* à réaliser, différentes techniques de sacrifice ont été utilisées, pour permettre l'extraction des cerveaux et des moelles épinières. Les animaux ayant subi le PSR et ont été euthanasiés avec une surdose de pentobarbital pendant l'anesthésie à l'isoflurane, à la fin du protocole de microdialyse (décrit ci-avant). Les animaux ayant été enregistrés pour l'étude des cycles veille-sommeil ont reçu une dose létale de kétamine chlorhydrate (Virbac, France) administrée par voie intramusculaire, puis perfusés *via* l'aorte ascendante avec 2 litres de NaCl à 0,9%, suivi de 3 litres de fixateur (paraformaldéhyde, PFA, 4% dans un tampon phosphate à pH 7,4).

Les tissus frais ont été prélevés, partagés en plusieurs sections frontales (pour les cerveaux) ou suivant les niveaux cervicaux, thoraciques et lombaires (pour les moelles épinières), puis congelés immédiatement dans de l'isopentane à -45°C, puis stockés à -80°C avant d'être utilisés. Les tissus perfusés ont été post-fixés pendant 24h à 4°C dans le PFA. Puis ils ont été rincés pendant 48 h à 4°C dans une solution de sucrose à 20% dans un tampon phosphate à pH 7,4, congelés à -45°C dans de l'isopentane, puis placés à -80°C.

## G. Analyses statistiques

Le logiciel *GraphPadPrism 4* a été utilisé pour l'ensemble des analyses statistiques. Les résultats des analyses descriptives sont présentés sous forme de pourcentages ou de moyennes, plus ou moins l'erreur standard. Des *one-way ANOVA* à mesures répétées suivies de tests *post-hoc* Newman-Keuls à comparaison multiples ont été réalisées pour établir les différences significatives entre les dosages des variations journalières de l'hémoglobine, du fer, de la ferritine et de la transferrine dans le sang, le sérum et le liquide céphalorachidien. Des *one-way ANOVA* suivies de test *post-hoc* Newman-Keuls à comparaison multiples ont été réalisées pour établir les différences significatives entre les dosages des taux extracellulaires de dopamine, de DOPAC, de sérotonine et de 5-HIAA. Ces mêmes tests statistiques ont été utilisés pour mettre en évidence les différences significatives entre les pourcentages de temps de sommeil total des enregistrements polysomnographiques chez les animaux naïfs, parkinsoniens et sous traitements pharmacologiques. Des tests de régressions linéaires ont été réalisés afin de déterminer dans quelle mesure une variable aléatoire va suivre la variation d'une variable indépendante. L'erreur standard est représentée par le symbole « ± ». Une différence significative est notée si la valeur de *p* est inférieure ou égale à 0,05 et une tendance est indiquée lorsque  $p < 0,08$ .

# RESULTATS

**Impact d'une carence en fer sérique, sur le système  
dopaminergique et l'activité locomotrice :**

***vers un modèle macaque de la maladie  
de Willis-Ekbom ?***

## RESULTATS

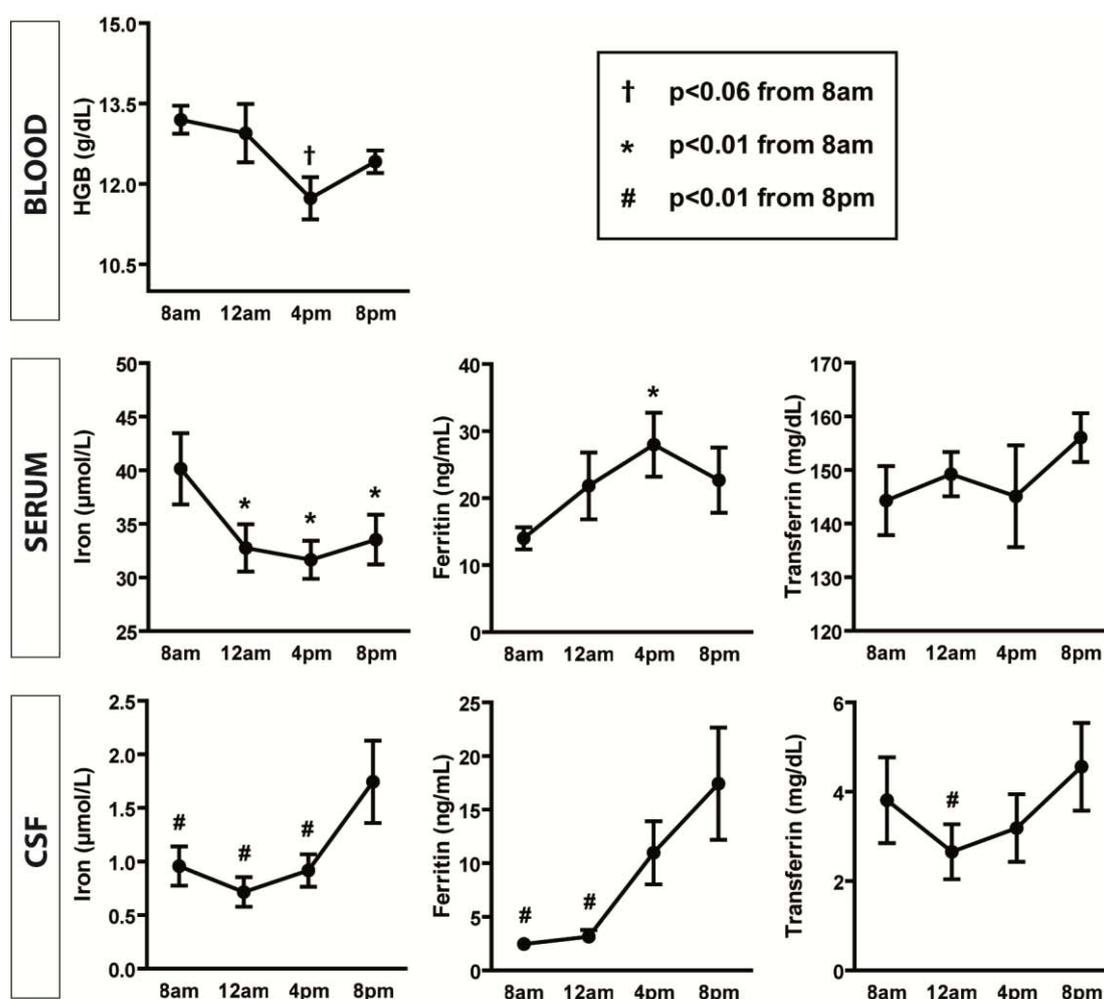
Les résultats de cette étude feront l'objet d'un article qui est actuellement en préparation :

**Iron serum depletion profoundly affects monoaminergic systems in macaque.**

Carole HYACINTHE, Thibaud THIOILLIER, Qin LI, Philippe de DEURWAERDERE, Erwan BEZARD, Imad GHORAYEB

### **H. Variations journalières des concentrations de fer et de ses protéines associées chez le macaque naïf**

Dans cette partie nous avons cherché à savoir si les concentrations du fer et des protéines associées, varient au cours de la journée de notre modèle d'étude, comme décrit chez l'homme. Pour cela, nous avons effectué une série de prélèvements de sang et de liquide céphalorachidien à différentes heures de la journée (8h, 12h, 16h et 20h) sur 18 macaques cynomolgus. Les résultats sont reportés ci-dessous (**Figure 23**).



**Figure 23 :** Variations journalières des concentrations du fer et des protéines associées.

Les prises de sang et ponctions lombaires ont été réalisées sur 18 animaux naïfs à 8h, 12h, 16h et 20h (respectivement 8am, 12am, 4pm et 8pm) avec un intervalle de 7 jours entre chaque prélèvement. Les résultats représentent les moyennes des concentrations de l'hémoglobine, du fer, de la ferritine et de la transferrine dans le sérum et le liquide céphalorachidien  $\pm$  l'erreur standard. CSF=cerebrospinal fluid (liquide céphalorachidien) ; HGB= hémoglobine.

### H. I. Variations journalières de l'hémoglobine

L'hémoglobine dans le sang présente des valeurs plus élevées le matin entre 8h et 12h avec une concentration maximale en fin de période nocturne (13,2g/dL à 8h). La concentration d'hémoglobine semble diminuer progressivement au cours de la journée avec une concentration minimale en milieu d'après-midi (11,73g/dL à 16h) (One-way ANOVA à mesures répétées  $F_{[3,71]}=2,71$  ;  $p<0,06$  par rapport à 8h), puis augmenter à nouveau en fin de journée (**Figure 23**).

## H. II. Variations journalières du fer

Les valeurs du fer dans le sérum varient au cours de la journée (One-way ANOVA à mesures répétées  $F_{[3,71]}=9,27$  ;  $p<0,0001$ ). Le profil des concentrations de fer dans le sérum fait penser à une courbe en U avec un pic de concentration à 8h (40,2 $\mu$ mol/L), suivi d'une claire diminution jusqu'au milieu de l'après-midi atteignant une valeur minimale de 31,7 $\mu$ mol/L à 16h. Tous les prélèvements réalisés après 8h présentent des taux significativement inférieurs à celui du pic de concentration (12h, 16h et 20h ; Newman-Keuls,  $p<0,01$  pour chaque heure de prélèvement) (**Figure 23**).

Les valeurs de fer du LCR oscillent au cours de la journée (One-way ANOVA à mesures répétées  $F_{[3,71]}=4,48$  ;  $p<0,01$ ). Comme les taux de fer dans le sérum, on retrouve une courbe dont le motif rappelle une courbe en U mais décalée par rapport aux valeurs sériques. Le pic de concentration du fer dans le LCR est à 20h (1,7 $\mu$ mol/L). Tous les prélèvements réalisés avant 20h présentent des taux de fer significativement plus faibles (8h, 12h et 16h ; Newman-Keuls,  $p<0,01$  ;  $p<0,05$  ;  $p<0,01$  respectivement pour chaque heure de prélèvement) avec une valeur minimale de 0,71 $\mu$ mol/L à 12h (**Figure 23**).

## H. III. Variations journalières de la ferritine

Les valeurs de ferritine dans le sérum évoluent au cours de la journée (One-way ANOVA à mesures répétées  $F_{[3,71]}=4,56$  ;  $p<0,01$ ). Le motif de variation de la ferritine dans le sérum est directement inversé par rapport à celui identifié pour le fer sérique. En effet, on retrouve une courbe faisant penser à un U inversé, avec un pic de concentration à 16h (28ng/mL). Contrairement au taux de fer sérique, la ferritine présente une valeur minimale à 8h (14ng/mL), significativement plus basse que celle du pic de concentration (Newman-Keuls,  $p<0,01$ ). Les taux de ferritine augmentent de manière marquée entre 8h et 16h puis semblent décroître à nouveau jusqu'à 20h (**Figure 23**).

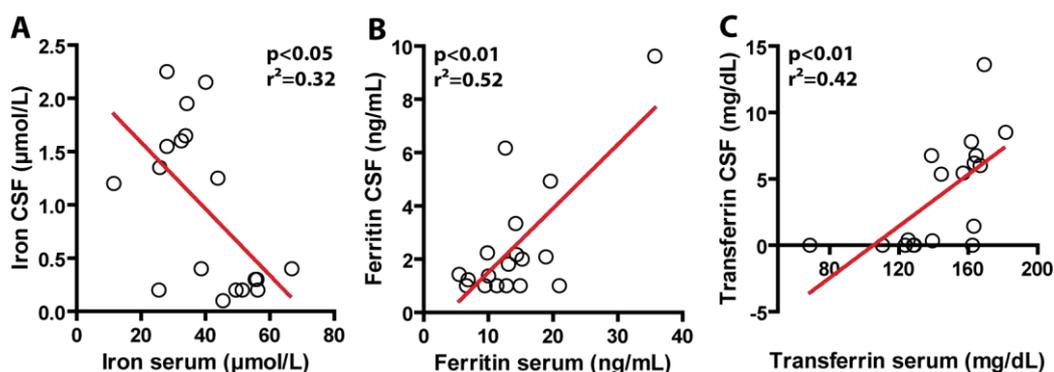
Les valeurs de ferritine du LCR marquent une progression constante entre 8h et 20h (One-way ANOVA à mesures répétées  $F_{[3,71]}=5,47$  ;  $p<0,01$ ), et atteignent une concentration maximum à 20h (17,42ng/mL). Comme pour les concentrations de fer mesurées dans le LCR, les plus faibles valeurs de ferritine du LCR sont mesurées en première partie de journée avec un taux minimum à 8h (2,47ng/mL). Les prélèvements effectués en première partie de journée présentent des taux de ferritine significativement plus faibles que ceux mesurés à 20h (8h et 12h ; Newman-Keuls,  $p<0,01$  pour chaque heure de prélèvement) (**Figure 23**).

#### H. IV. Variations journalières de la transferrine

Les valeurs de transferrine dans le sérum sont globalement constantes au cours de la journée, bien qu'il semble que la valeur la plus haute soit obtenue dans les prélèvements de 20h (156mg/dL) et la plus faible dans les prélèvements de 8h (144mg/dL) (**Figure 23**).

Les valeurs de transferrine du LCR en revanche, oscillent tout au long de la journée (One-way ANOVA à mesures répétées  $F_{[3,71]}=3,51$  ;  $p<0,05$ ) et présentent un motif de variation en U, similaire à celui du fer mesuré dans le LCR. En effet, comme pour le fer du LCR, la transferrine présente un pic de concentration à 20h (4,56mg/dL) et une valeur minimum significativement plus faible à 12h (2,66mg/dL ; Newman-Keuls,  $p<0,05$ ) (**Figure 23**).

#### H. V. Comparaison entre les taux de fer, de ferritine et de transferrine entre le sérum et le LCR



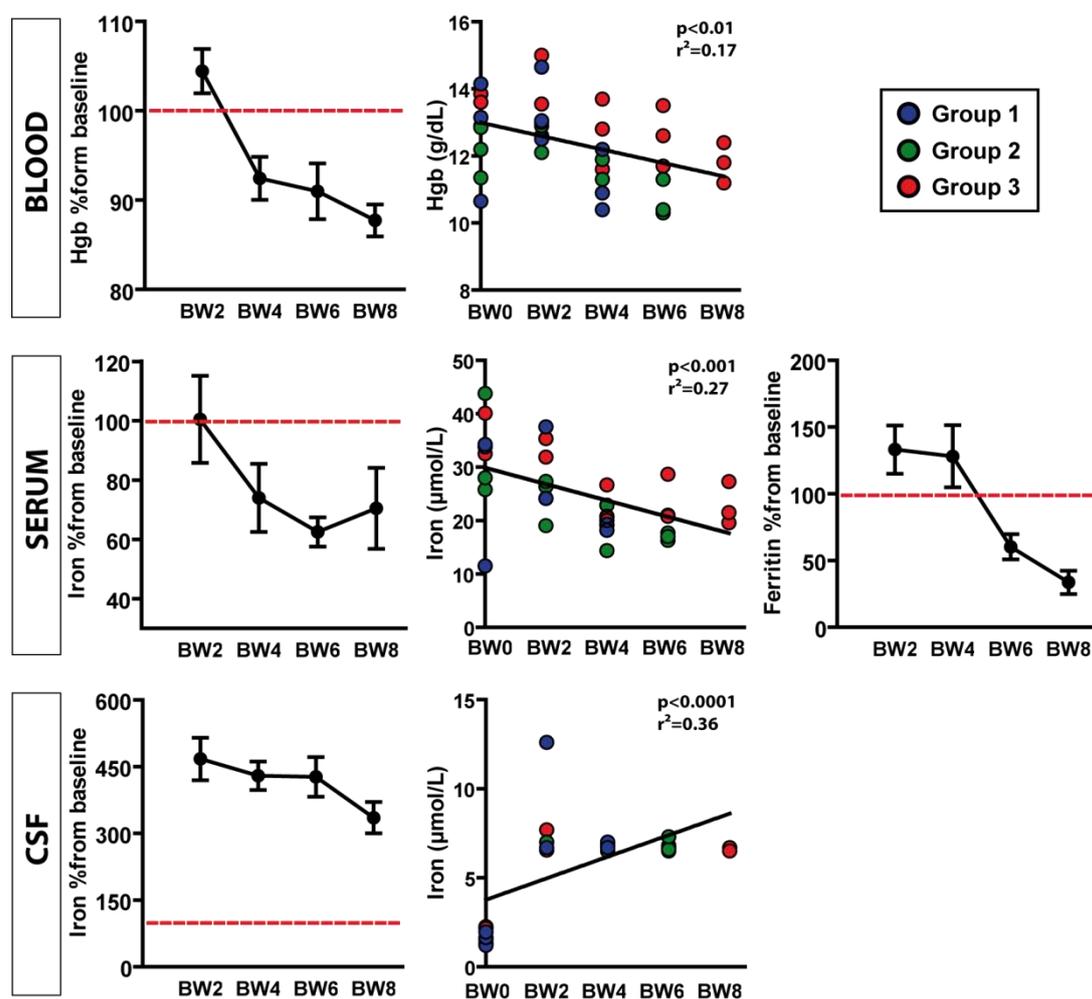
**Figure 24** : Variations des taux de fer (A), ferritine (B) et de transferrine (C) dans le LCR en fonctions des concentrations sériques chez le macaque naïf.

Les résultats représentent les concentrations de fer, de ferritine et de transferrine respectivement exprimées en µmol/L, ng/mL et en mg/dL dans les prélèvements effectués à 8h, sur 18 animaux.  $r^2$ =coefficient de détermination de la régression linéaire. CSF=cerebrospinal fluid (liquide céphalorachidien).

Nos résultats indiquent une correspondance entre les taux de fer, de ferritine et de transferrine entre le sérum et le LCR chez les animaux naïfs. En effet, on observe une diminution des taux de fer dans le LCR en fonction de l'augmentation des taux de fer dans le sérum ( $r^2=0,30$  ;  $p<0,05$ ) (**Figure 24A**). A l'inverse, les taux de ferritine et de transferrine augmentent dans le LCR en fonction de l'augmentation des taux sériques soit de ferritine ( $r^2=0,52$  ;  $p<0,01$ ) (**Figure 24B**), soit de transferrine ( $r^2=0,42$  ;  $p<0,01$ ) (**Figures 24C**).

## I. Impact du protocole de saignées répétées sur les concentrations du fer et des protéines associées

Dans cette partie, nous avons étudié l'impact d'une carence en fer sérique sur le système dopaminergique. Pour cela, nous avons cherché à établir une carence en fer sérique afin de reproduire le déficit en fer sérique retrouvé chez certains patients qui présentent les symptômes de la MWE. Pour cela nous avons élaboré un protocole de saignées répétées (PSR) consistant à prélever un 5% du volume total de sang par jour, tous les 4 jours à heure fixe. Les résultats sont présentés ci-après (**Figure 25**).



**Figure 25 : Impact du PSR sur les concentrations d'hémoglobine, de fer et de ferritine, dans le sérum et le liquide céphalorachidien.**

Les résultats sont exprimés en pourcentages des valeurs contrôles  $\pm$  l'erreur standard et la ligne en discontinue rouge (100%) représente les taux de base. Les valeurs de l'hémoglobine et du fer sont exprimées respectivement en g/dL et en  $\mu\text{mol/L}$  pour les régressions linéaires.  $r^2$ =coefficient de détermination de la régression linéaire. CSF=cerebrospinal fluid (liquide céphalorachidien) ; Hgb=hémoglobine ; BW0, 2, 4, 6, 8=blood withdrawal (correspond au nombre de saignées que les animaux ont reçu, de 0 à 8).

## I. I. Le PSR diminue les taux d'hémoglobine

Les concentrations d'hémoglobine décroissent progressivement à partir de 4 saignées (-8% comparé aux taux de base) et continuent de diminuer après 6 et 8 saignées (respectivement -10% et -13% comparées aux taux de base). La régression linéaire indique que les taux d'hémoglobine diminuent en fonction du nombre de saignées ( $r^2=0,17$  ;  $p<0,01$ ) (**Figure 25**).

## I. II. Le PSR diminue les taux de fer

Les concentrations de fer sérique sont diminuées chez les animaux ayant subi 6 et 8 saignées (respectivement -37% et -29% comparées aux taux de base). La régression linéaire indique que les taux de fer sérique diminuent en fonction du nombre de saignées ( $r^2=0,27$  ;  $p<0,001$ ) (**Figure 25**).

Les concentrations de fer dans le LCR en revanche sont distinctement augmentées à partir de 2 saignées (+367% comparé aux taux de base). De manière intéressante, ces concentrations tendent à diminuer légèrement chez les animaux ayant subi 8 saignées mais restent toutefois bien supérieures aux concentrations basales (+235% comparées aux taux de base). De plus, la régression linéaire indique que la quantité de fer dans le LCR augmente avec le nombre de saignées ( $r^2=0,36$  ;  $p<0,0001$ ) (**Figure 25**).

## I. III. Le PSR diminue les taux de ferritine

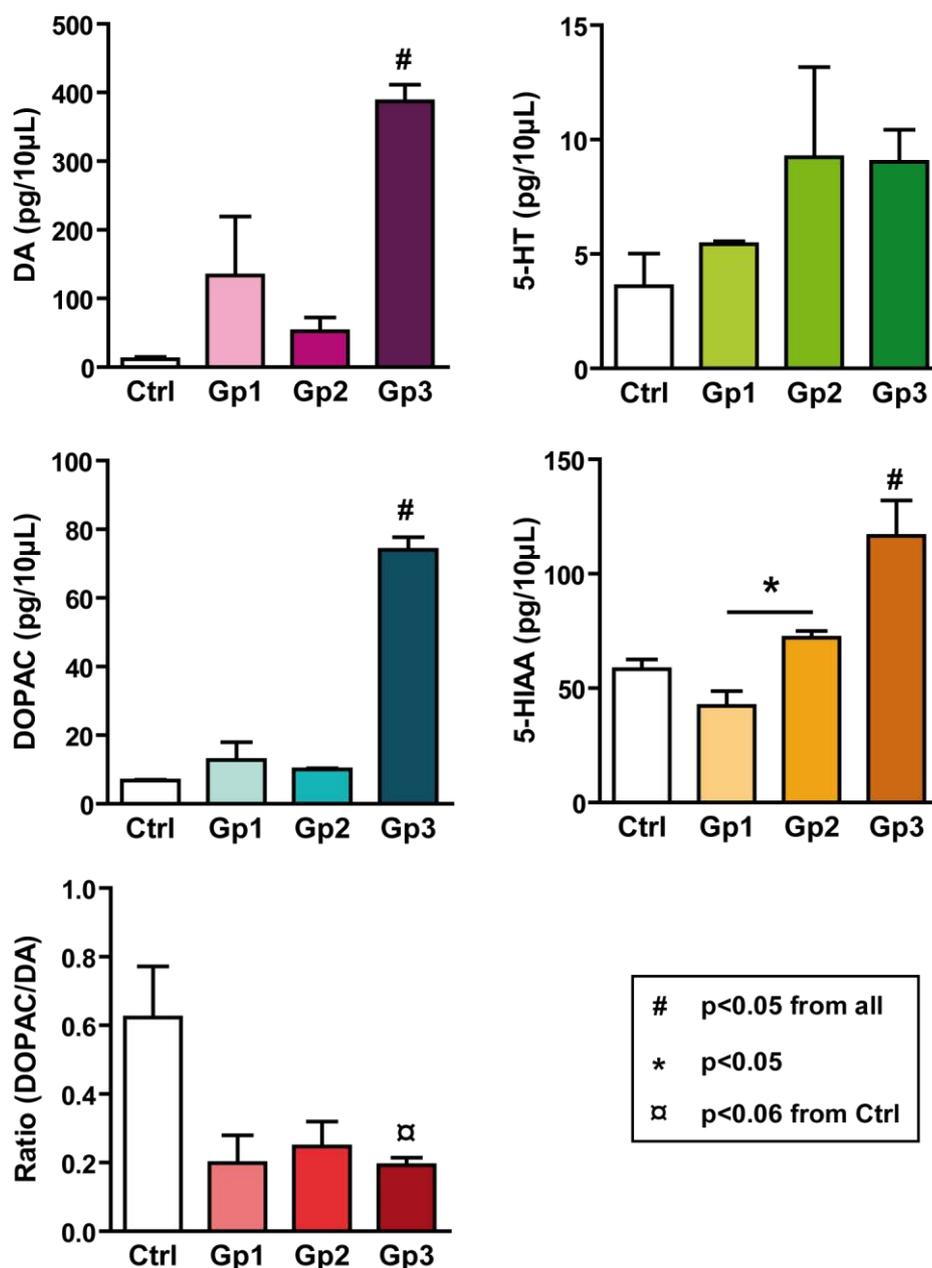
Les concentrations de ferritine dans le sérum suivent le même profil que le fer sérique puisqu'elles sont diminuées chez les animaux ayant subi 6 et 8 saignées (respectivement -40% et -66,3% comparées au taux de base) (**Figure 25**).

Les concentrations de ferritine dans le LCR n'ont pu être clairement déterminées en raison de quantités trop faibles et donc indétectables chez les animaux soumis au PSR.

Par ailleurs, nous n'avons observé aucune variation des taux de transferrine ni dans le sérum ni dans le LCR.

## **J. Impact du PSR sur les concentrations des monoamines *in vivo* dans le striatum**

Dans cette partie nous avons cherché à déterminer l'influence du PSR sur les taux extracellulaires des monoamines au niveau du striatum. L'objectif ici, était de déterminer si le bouleversement de l'homéostasie du fer et de ses biomarqueurs engendré par le PSR, affectait le métabolisme extracellulaire des neurotransmetteurs. Pour cela, nous avons prélevé le liquide interstitiel au niveau du striatum, à la fin du PSR, ainsi que sur des animaux naïfs, par la technique de microdialyse *in vivo*. Les concentrations des monoamines et de leurs métabolites ont ensuite été quantifiées par chromatographie à haute performance. Les résultats sont présentés ci-après (**Figure 26**).



**Figure 26 : Impact du PSR sur les taux extracellulaires *in vivo* des monoamines et de leurs métabolites dans le striatum.**

Les résultats sont exprimés en pg/10μL de dialysat ± l'erreur standard. DA=dopamine ; DOPAC=acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; 5-HT=sérotonine ; 5-HIAA=acide 5-hydroxyindolacétique ; Ctrl=groupe contrôle contenant 2 animaux naïfs ; Gp1, Gp2, Gp3=groupe 1, groupe 2, groupe 3 ayant subi respectivement 4, 6 et 8 saignées et contenant chacun 3 animaux.

## J. I. Le PSR induit l'augmentation des taux extracellulaires de DA et de DOPAC

Les valeurs de la dopamine sont significativement augmentées dans le groupe ayant subi 8 saignées (groupe 3), (one-way ANOVA,  $F_{[3,9]}=7,62$  ;  $p<0,05$  ; Newman-Keuls,  $p<0,05$  comparé à tous les groupes). Les taux mesurés dans le groupe 3 sont remarquablement plus élevés que ceux du groupe contrôle (+3237,1%) (**Figure 26**).

Les valeurs de DOPAC sont également significativement augmentées dans le groupe ayant subi 8 saignées (groupe 3), (one-way ANOVA,  $F_{[3,9]}=70,17$  ;  $p<0,0001$  ; Newman-Keuls,  $p<0,001$  comparé à tous les groupes). Les taux mesurés dans le groupe 3 sont distinctement augmentés comparés à ceux du groupe contrôle (+996,3%) (**Figure 25**).

## J. II. Le PSR induit l'augmentation extracellulaire de 5-HIAA

Les valeurs de 5-HIAA sont significativement augmentées dans le groupe ayant subi 8 saignées (groupe 3), (one-way ANOVA,  $F_{[3,9]}=16,71$  ;  $p<0,01$  ; Newman-Keuls,  $p<0,01$  comparé à tous les groupes). Les taux extracellulaires de 5-HIAA sont distinctement augmentés chez les animaux ayant subi 8 saignées (groupe 3) comparés à ceux du groupe contrôle (+99,9%). De plus, les taux extracellulaires de 5-HIAA augmentent progressivement, puisque que l'on observe déjà une augmentation significative des concentrations de 5HIAA chez les animaux ayant subi 6 saignées (groupe2), comparée à celles des animaux ayant subi 4 saignées (groupe 1) (+71,2% ;  $p<0,05$ ) (**Figure 26**).

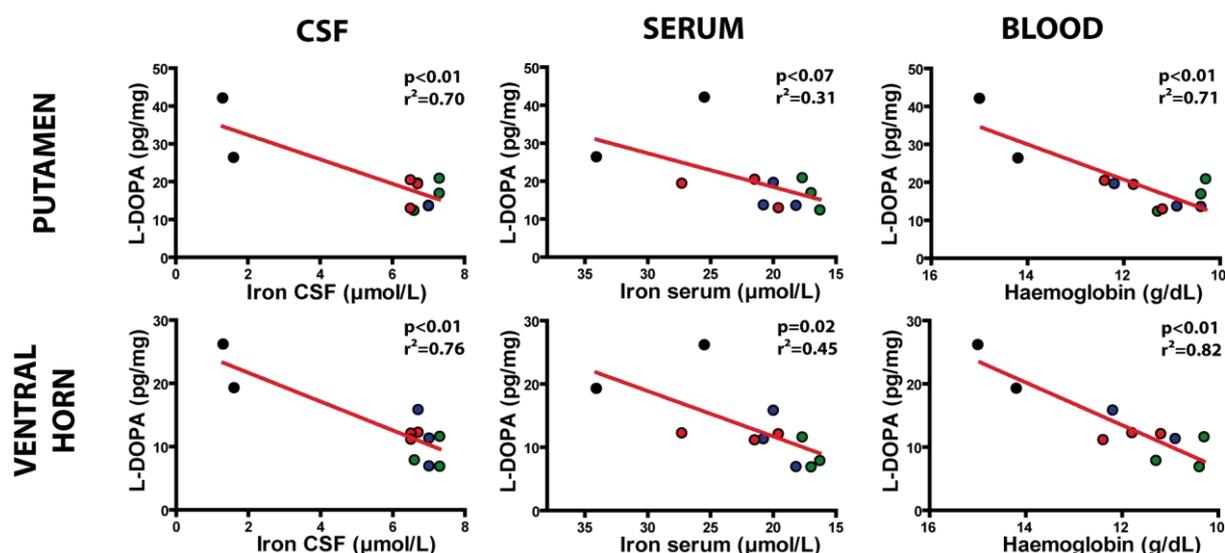
Bien que non significative, les résultats indiquent une augmentation progressive des taux extracellulaires de sérotonine chez les animaux ayant subi 4, 6 et 8 saignées (respectivement +50%, +156,4%, +151,4% comparés aux valeurs contrôles) (**Figure 26**).

## K. Impact du PSR sur le métabolisme tissulaire des monoamines

Dans cette partie nous avons exploré les liens entre les modifications du métabolisme du fer et le métabolisme tissulaire des monoamines. Pour cela, nous avons effectué des dosages tissulaires *post-mortem* pour la L-DOPA, la dopamine et pour la sérotonine, ainsi que de leurs métabolites respectifs dans différentes régions du SNC. Nous avons utilisé ces

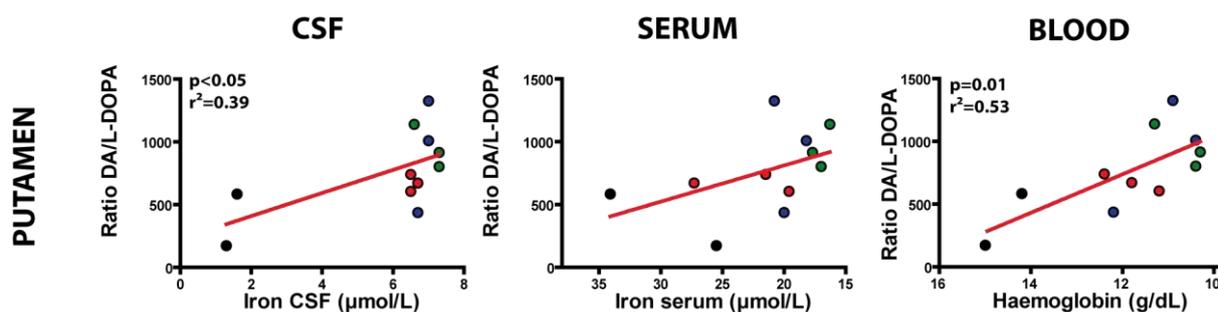
mesures pour étudier si la variation de ces composants neurochimiques se faisait en fonction de la modification des taux de fer dans le LCR, le sérum et en fonction de l'hémoglobine à travers les coefficients de détermination obtenus par régressions linéaires. Les résultats sont présentés ci-après (**Figures 27-32**).

### K. I. Modification de la synthèse de dopamine : variations des taux de L-DOPA et du ratio DA/L-DOPA



**Figure 27** : Variations des taux de L-DOPA tissulaires en fonction des concentrations de fer dans le liquide céphalorachidien et le sérum, ainsi que des taux d'hémoglobine. Noter que les abscisses pour les graphiques de fer sérique et l'hémoglobine du sang décroissent de gauche à droite. Les valeurs de L-DOPA sont exprimées en pg/mg de tissu. Les valeurs de fer et hémoglobine sont exprimées respectivement en μmol/L et en g/dL.  $r^2$ =coefficient de détermination de la régression linéaire. CSF=cerebrospinal fluid (liquide céphalorachidien) ; L-DOPA=L-3,4-dihydroxyphénylalanine.

Les résultats indiquent une modification des taux de L-DOPA, suivant les concentrations de fer dans le sérum et le LCR, et d'hémoglobine. Ainsi, on observe une diminution des taux de L-DOPA dans le putamen ( $r^2=0,70$  ;  $p<0,01$ ) et dans la corne ventrale de la moelle épinière ( $r^2=0,76$  ;  $p<0,01$ ) en fonction de l'augmentation des taux de fer dans le LCR. A l'inverse, les taux de L-DOPA diminuent avec la baisse des niveaux de fer sérique et d'hémoglobine dans le putamen (respectivement  $r^2=0,31$  ;  $p=0,07$  et  $r^2=0,71$ ,  $p<0,01$ ), ainsi que dans la corne ventrale (respectivement  $r^2=0,45$  ;  $p<0,05$  et  $r^2=0,82$  ;  $p<0,01$ ) (**Figure 27**).

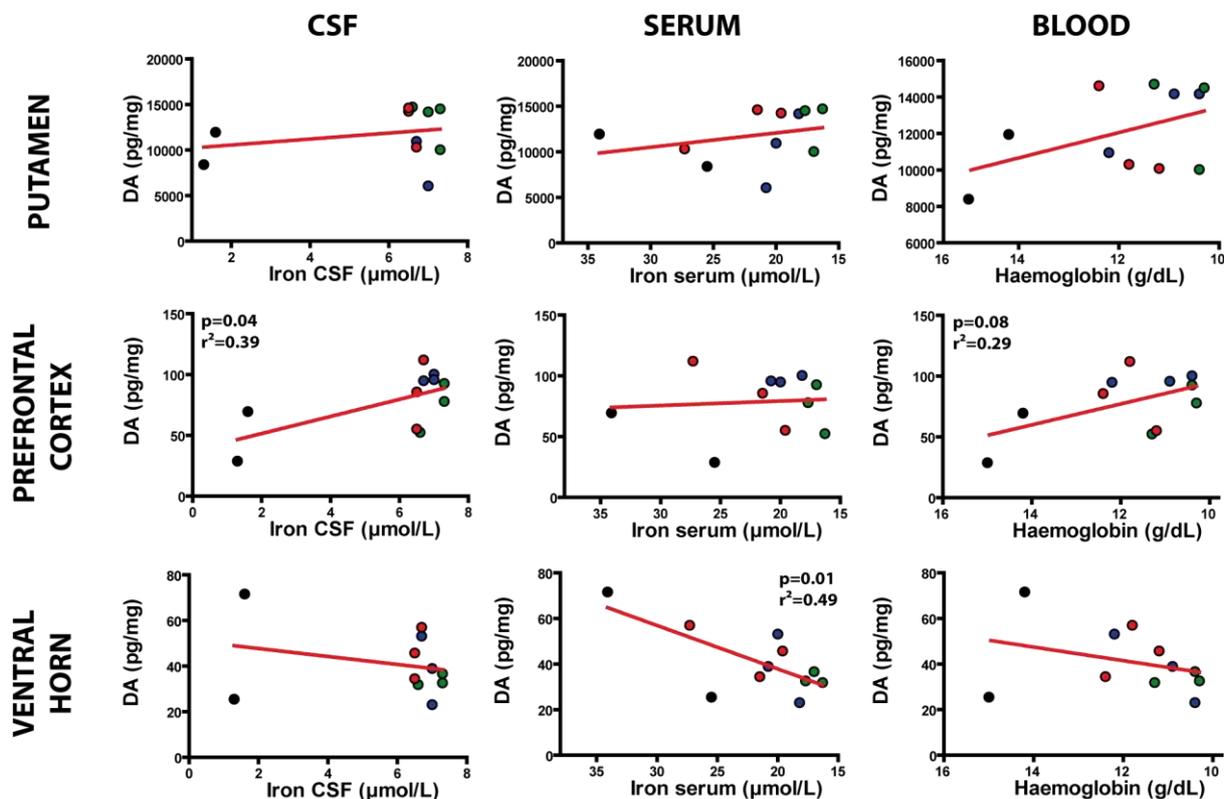


**Figure 28** : Variations du ratio DA/L-DOPA en fonction des concentrations de fer dans le liquide céphalorachidien et le sérum, ainsi que des taux d'hémoglobine.

Noter que les abscisses pour les graphiques de fer sérique et l'hémoglobine du sang décroissent de gauche à droite.  $r^2$ =coefficient de détermination de la régression linéaire. CSF=cerebrospinal fluid (liquide céphalorachidien) ; DA=dopamine ; L-DOPA=L-3,4-dihydroxyphénylalanine.

Nos résultats indiquent que le ratio (DA/L-DOPA) croît en fonction de l'augmentation des taux de fer dans le LCR ( $r^2=0,39$  ;  $p<0,05$ ) ainsi qu'avec la baisse du taux d'hémoglobine ( $r^2=0,53$  ;  $p=0,01$ ) au niveau du putamen (**Figure 28**).

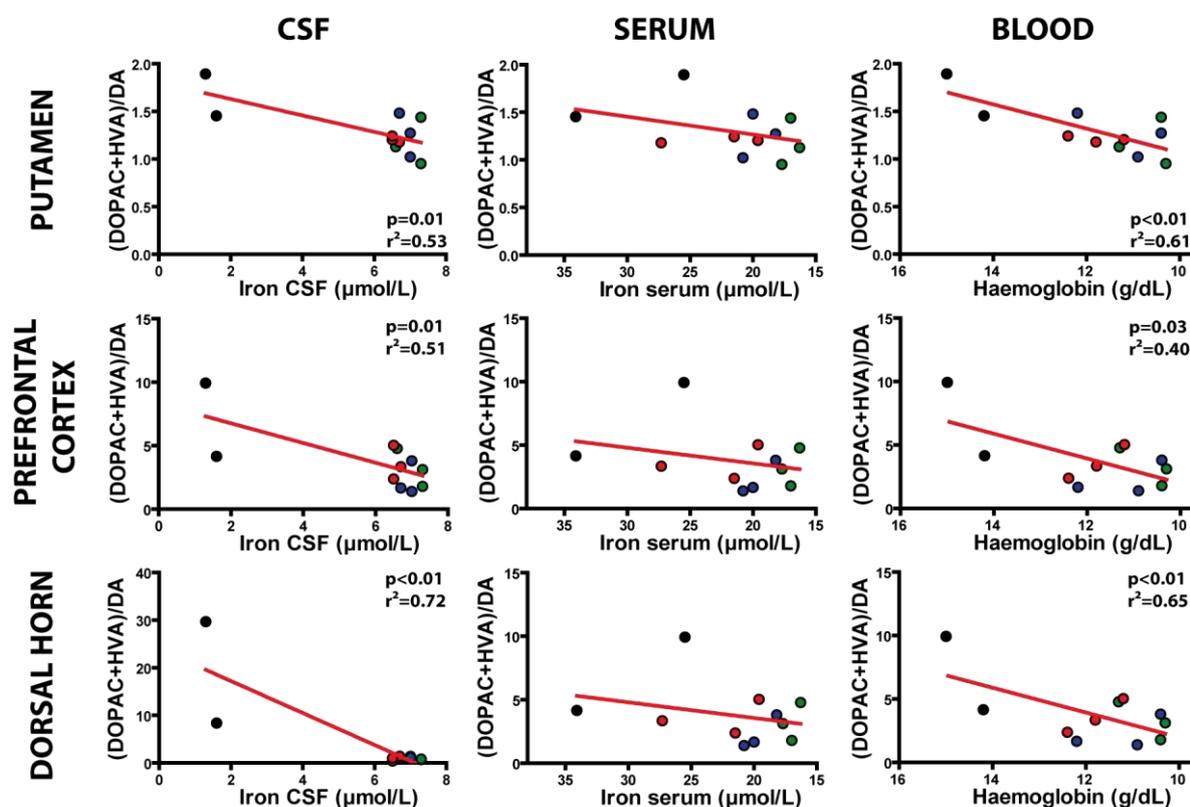
K. II. Modification des taux de dopamine dans les régions extrastriales



**Figure 29 : Variations des taux de dopamine tissulaire en fonction des concentrations de fer dans le liquide céphalorachidien et le sérum, ainsi que des taux d'hémoglobine.** Noter que les abscisses pour les graphiques de fer sérique et l'hémoglobine du sang décroissent de gauche à droite. Les valeurs de dopamine sont exprimées en pg/mg de tissu. Les valeurs de fer et hémoglobine sont exprimées respectivement en  $\mu\text{mol/L}$  et en g/dL.  $r^2$ =coefficient de détermination de la régression linéaire. CSF=cerebrospinal fluid (liquide céphalorachidien) ; DA=dopamine.

Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence de variation des taux de dopamine au niveau du striatum. En revanche, on observe que les niveaux de dopamine dans le cortex préfrontal augmentent en fonction des taux de fer du LCR ( $r^2=0,39$  ;  $p<0,05$ ). De manière cohérente avec ce résultat, on observe une tendance indiquant que les concentrations de DA augmentent en fonction des taux d'hémoglobine qui diminuent ( $r^2=0,29$  ;  $p=0,08$ ). Enfin, on observe que les taux de DA de la corne ventrale de la moelle épinière diminuent avec ceux de fer dans le sérum ( $r^2=0,49$  ;  $p<0,01$ ) (**Figure 29**).

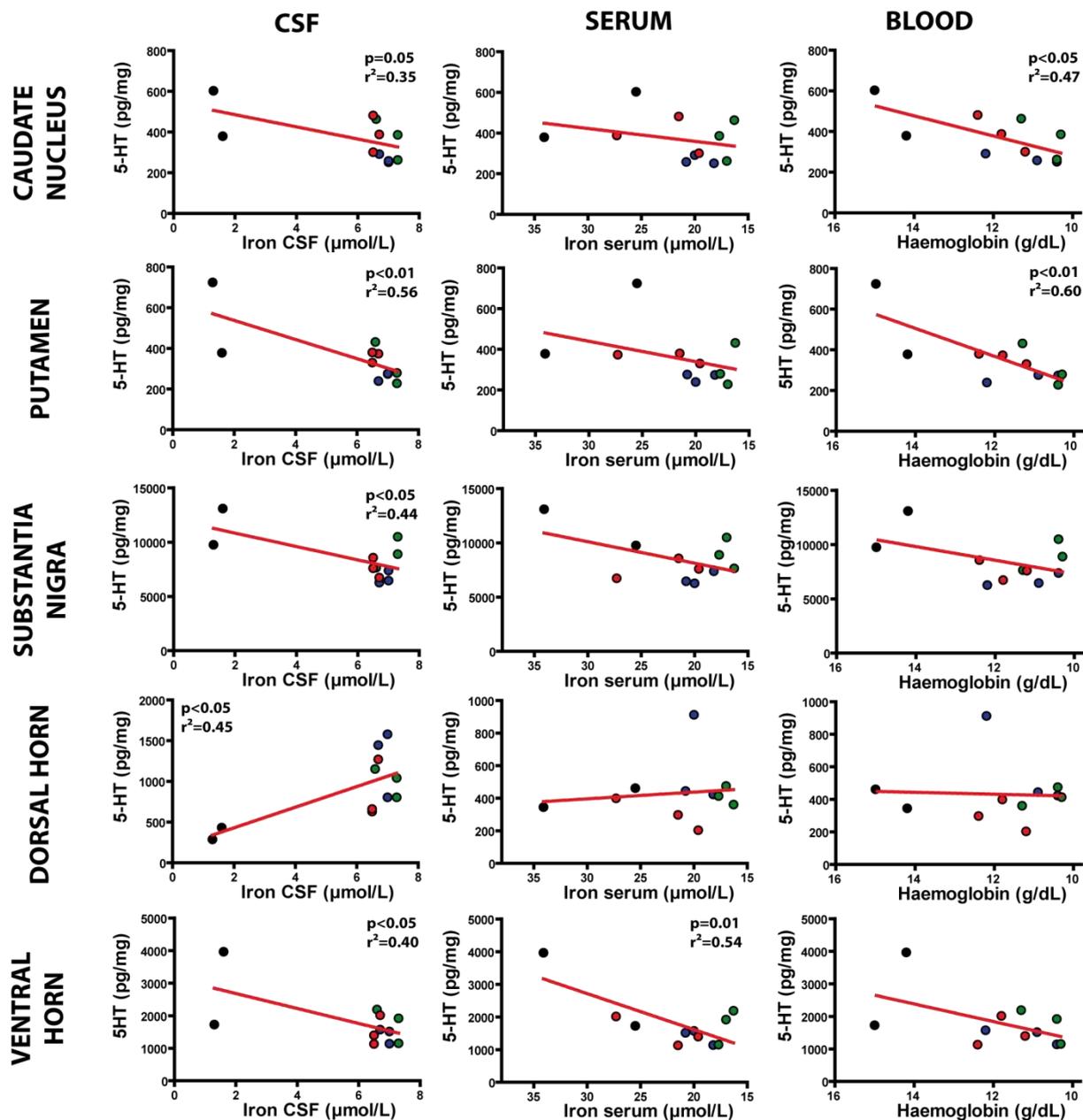
### K. III. Modification de la dégradation de la dopamine : variations du ratio (DOPAC+HVA)/DA



**Figure 30** : Variations du ratio (DOPAC+HVA)/DA en fonction des concentrations de fer dans le liquide céphalorachidien et le sérum, ainsi que des taux d'hémoglobine. Noter que les abscisses pour les graphiques de fer sérique et l'hémoglobine du sang décroissent de gauche à droite. Les valeurs de dopamine sont exprimées en pg/mg de tissu. Les valeurs de fer et hémoglobine sont exprimées respectivement en μmol/L et en g/dL.  $r^2$ =coefficient de détermination de la régression linéaire. CSF= *cerebrospinal fluid* (liquide céphalorachidien) ; DA=dopamine ; DOPAC=acide 3,4-dihydroxyphénylacétique, HVA=acide homovanillique.

Nos résultats indiquent que le ratio (DOPA+HVA)/DA diminue avec l'augmentation des taux de fer du LCR dans le putamen ( $r^2=0,53$  ;  $p<0,01$ ), dans le cortex frontal ( $r^2=0,51$  ;  $p<0,01$ ) ainsi que dans la corne dorsale de la moelle épinière ( $r^2=0,72$  ;  $p<0,01$ ). A l'inverse, ce ratio augmente avec la baisse des taux d'hémoglobine dans le putamen ( $r^2=0,61$  ;  $p<0,01$ ), dans le cortex frontal ( $r^2=0,40$  ;  $p<0,05$ ) ainsi que dans la corne dorsale de la moelle épinière ( $r^2=0,65$  ;  $p<0,01$ ). En revanche, nous n'avons établi aucune relation significative avec les taux de fer sérique (**Figure 30**).

K. IV. Modification de la dégradation de la sérotonine : variations des taux de 5-HT et de 5-HIAA

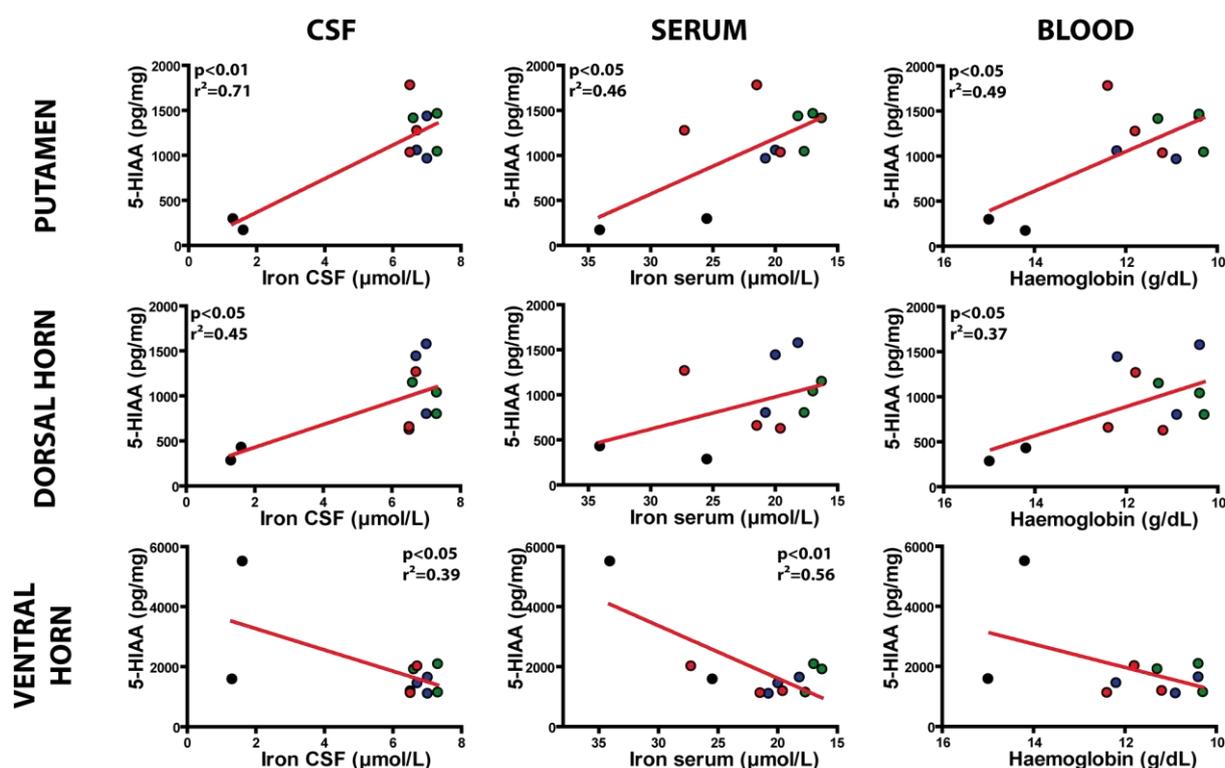


**Figure 31** : Variations des taux de sérotonine en fonction des concentrations de fer dans le liquide céphalorachidien et le sérum, ainsi que des taux d'hémoglobine.

Noter que les abscisses pour les graphiques de fer sérique et l'hémoglobine du sang décroissent de gauche à droite. Les valeurs de fer et hémoglobine sont exprimées respectivement en µmol/L et en g/dL. r²=coefficient de détermination de la régression linéaire. CSF=cerebrospinal fluid (liquide céphalorachidien) ; 5-HT=sérotonine.

Les résultats observés montrent que les taux de sérotonine diminuent en fonction de l'augmentation des concentrations de fer dans le LCR dans le noyau caudé ( $r^2=0,35$  ;  $p<0,05$ ), le putamen ( $r^2=0,56$  ;  $p<0,01$ ), la substance noire ( $r^2=0,44$  ;  $p<0,05$ ) ainsi que dans la corne ventrale ( $r^2=0,40$  ;  $p<0,05$ ). A l'inverse, on remarque une augmentation des taux de sérotonine avec la hausse des niveaux de fer du LCR dans la corne dorsale de la moelle épinière ( $r^2=0,45$  ;  $p<0,05$ ) (**Figure 31**).

De même, on observe une diminution des taux de sérotonine avec la baisse des concentrations de fer sérique ( $r^2=0,54$  ;  $p<0,01$ ) dans la corne ventrale de la moelle épinière. Enfin, nos résultats indiquent une diminution des taux de sérotonine en fonction de la diminution des niveaux d'hémoglobine dans le noyau caudé ( $r^2=0,47$  ;  $p<0,05$ ) et dans le putamen ( $r^2=0,60$  ;  $p<0,01$ ) (**Figure 31**).



**Figure 32** : Variations des taux de 5-HIAA en fonction des concentrations de fer dans le liquide céphalorachidien et le sérum, ainsi que des taux d'hémoglobine.

Noter que les abscisses pour les graphiques de fer sérique et l'hémoglobine du sang décroissent de gauche à droite. Les valeurs de fer et hémoglobine sont exprimées respectivement en  $\mu\text{mol/L}$  et en g/dL.  $r^2$ =coefficient de détermination de la régression linéaire. CSF=cerebrospinal fluid (liquide céphalorachidien) ; 5-HIAA=acide 5-hydroxyindolacétique.

Nos résultats indiquent que les concentrations du 5-HIAA varient en fonction des concentrations de fer et de l'hémoglobine. Ainsi, les taux de 5-HIAA augmentent en fonction des taux de fer du LCR dans le putamen ( $r^2=0,71$  ;  $p<0,01$ ) et dans la corne dorsale de la moelle épinière ( $r^2=0,45$  ;  $p<0,05$ ). A l'inverse, ils diminuent dans la corne ventrale de la moelle épinière ( $r^2=0,39$  ;  $p<0,05$ ) (**Figure 32**).

Les taux de 5-HIAA en périphérie varient inversement à ceux observés dans le LCR pour toutes les structures. Ainsi, les taux de 5-HIAA augmentent en fonction de l'augmentation des taux de fer sérique ( $r^2=0,46$  ;  $p<0,05$ ) et de la diminution des taux d'hémoglobine ( $r^2=0,49$  ;  $p<0,05$ ) dans le putamen. De même, ils augmentent en fonction de la diminution des taux d'hémoglobine ( $r^2=0,37$  ;  $p<0,05$ ) dans la corne dorsale de la moelle épinière. A l'inverse, les taux de 5-HIAA diminuent en fonction de la baisse des taux de fer sérique ( $r^2=0,56$  ;  $p<0,01$ ) dans la corne ventrale de la moelle épinière (**Figure 31**).

### K. V. Résumé des variations des concentrations tissulaires observées

Le tableau ci-dessous (**Tableau 3**), récapitule les différentes variations observées pour les monoamines, leurs métabolites, ainsi que les ratios illustrant soit la synthèse DA/L-DOPA, soit la dégradation (DOPAC+HVA)/DA soit en fonction de l'augmentation de fer dans le LCR, soit en fonction de la diminution de fer dans le LCR, ou encore en fonction de la diminution de l'hémoglobine.

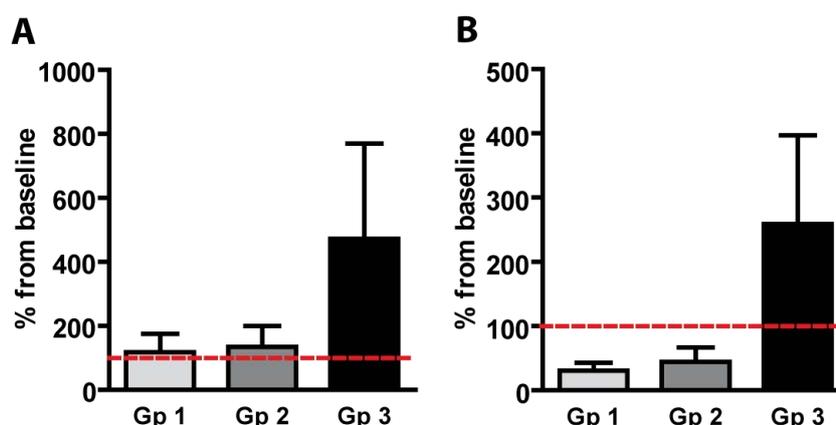
|                | [Fer] LCR ↗, [Fer] SERUM ↘, [Hgb] SANG ↘ |         |     |    |    |     |
|----------------|--|---------|-----|----|----|-----|
|                | NOYAU CAUDE                              | PUTAMEN | CPF | SN | CD | CV  |
| L-DOPA         |  | ↘↘↘     |     |    |    | ↘↘↘ |
| DA/L-DOPA      |  | ↗       |     |    |    | ↗   |
| DA             |  |         | ↗↗  |    |    | ↘   |
| (DOPAC+HVA)/DA |  | ↘↘      | ↘↘  |    | ↘↘ |     |
| 5-HT           | ↘↘                                       | ↘↘      |     | ↘  | ↗  | ↘↘  |
| 5-HIAA         |  | ↗↗↗     |     |    | ↗  | ↘↘  |

**Tableau 3 : Modifications des concentrations des monoamines et de leurs métabolites en fonction de la variation des niveaux de fer et d'hémoglobine induite par le PSR.**

Chaque flèche de couleur dans le tableau correspond au sens variation d'une substance neurochimique dosée dans une région cérébrale, en fonction soit de l'augmentation du fer dans le LCR ([Fer] LCR↗), soit de la diminution du fer dans le sérum ([Fer] SERUM↘), soit de la diminution de l'hémoglobine dans le sang ([Hgb] SANG↘). Exemple=les taux de L-DOPA dans le putamen diminuent en fonction de la hausse de fer dans le LCR. 5-HIAA=acide 5-hydroxyindolacétique ; 5-HT=sérotonine ; CPF=cortex préfrontal ; CD=corne dorsale de la moelle épinière ; CV=corne ventrale de la moelle épinière ; DA=dopamine ; DOPAC=acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; HVA=acide homovanillique ; L-DOPA=L-3,4-dihydroxyphénylalanine ; SN=substance noire.

## L. Impact du PSR sur le comportement locomoteur

Dans cette partie nous avons étudié l'impact du PSR sur le comportement locomoteur des animaux afin de savoir si une dérégulation du métabolisme du fer influence le comportement moteur global. Pour cela, nous avons mesuré l'activité locomotrice diurne et nocturne chez les animaux naïfs avant le début du PSR, puis après le maximum de saignée appliquées à chaque groupe.

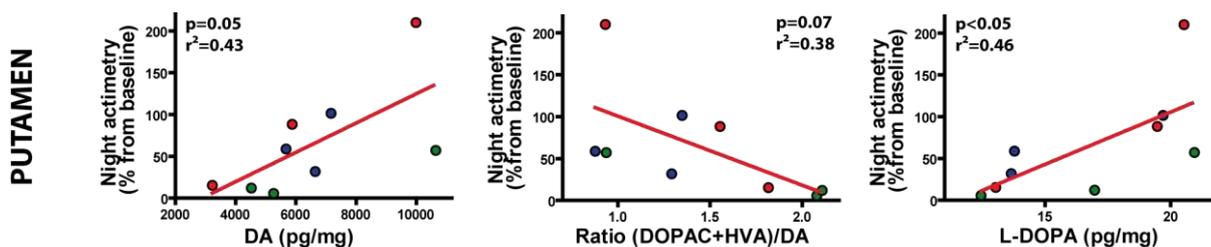


**Figure 33 : Variations du comportement locomoteur mesuré par actimétrie.**

Les résultats sont exprimés en pourcentages des valeurs contrôles  $\pm$  l'erreur standard. La ligne rouge discontinue représente les valeurs du niveau de base mesurées sur les mêmes animaux avant le début du PSR. Mesure de l'activité locomotrice diurne (de 8h à 12h) (A) et nocturne (de 00h à 6h) (B) chez les animaux ayant subi 4 saignées (groupe 1), 6 saignées (groupe 2) ou 8 saignées (groupe 3). Gp1, Gp2, Gp3= groupe 1, groupe 2, groupe 3 de manière respective contenant chacun 3 animaux.

Les valeurs de l'activité locomotrice diurne pour les animaux ayant subi 4 et 6 saignées (groupes 1 et 2), sont similaires à celles du niveau de base. En revanche, les animaux ayant subi 8 saignées (groupe 3) ont tendance à être plus actifs (+372% comparé à l'activité diurne de base) (Figure 33A).

Les valeurs d'activité locomotrices nocturnes, suivent le même type de profil puisque seul le groupe d'animaux ayant subi 8 saignées (groupe 3) présente une augmentation de l'activité locomotrice globale (+158,8% comparé à l'activité nocturne de base). En revanche, les animaux des groupes ayant subi respectivement 4 et 6 saignées ont tendance à présenter des niveaux d'actimétrie diminués (-69,4% et -55,7% comparé à l'activité nocturne de base respectivement pour les groupes 1 et 2) (Figure 33B). Bien que le faible nombre d'animaux et la variabilité individuelle, en particulier remarquée au sein du groupe 3, ne nous permettent pas d'établir une différence significative, un test de Kruskal-Wallis, nous indique une différence d'activité intergroupes (tendance à  $p < 0,07$ ).



**Figure 34 :** Variations de l'activité locomotrice nocturne en fonction des concentrations de dopamine, du ratio (DOPAC+HVA)/DA et de L-DOPA dans le putamen.

Les valeurs de dopamine et de L-DOPA sont exprimées en pg/mg de tissus. Les valeurs correspondant à l'actimétrie nocturne (de 00h à 6h), sont exprimées en pourcentage des taux de base.  $r^2$ =coefficient de détermination de la régression linéaire. DA=dopamine ; DOPAC=l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; HVA=acide homovanillique.

Les résultats obtenus indiquent que l'activité locomotrice nocturne augmente avec les taux tissulaires de dopamine ( $r^2=0,43$  ;  $p=0,05$ ) et de L-DOPA ( $r^2=0,46$  ;  $p<0,05$ ) dans le putamen. En revanche, une tendance indique que l'activité locomotrice nocturne diminue avec le métabolisme de dégradation de la dopamine représenté par le ratio (DOPAC+HVA)/DA ( $r^2=0,38$  ;  $p=0,07$ ) (**Figure 34**).

**Impact des agonistes dopaminergiques  
sur les troubles du sommeil, chez un modèle  
macaque de la maladie de Parkinson.**

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article publié dans le journal *Neurobiology of Diseases*.

**D1 receptor agonist improves sleep-wake parameters  
in experimental parkinsonism**

Carole HYACINTHE, Quentin BARRAUD, François TISON, Erwan BEZARD, Imad GHORAYEB

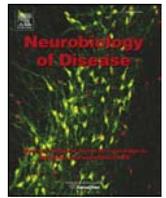
Dans cet article, nous avons évalué l'impact des agonistes des récepteurs dopaminergiques sur les troubles du sommeil chez un modèle macaque de la maladie de Parkinson. Pour cela nous avons induit un syndrome parkinsonien chronique par intoxication au MPTP chez des animaux munis d'un système télémétrique d'enregistrements polysomnographiques. Ainsi nous avons confirmé les effets d'une intoxication au MPTP, précédemment décrit par une étude menée au sein de notre laboratoire. En effet, nous avons observé une apparition de somnolence diurne excessive (SDE) rapidement après le début du protocole d'intoxication, ainsi qu'une suppression du sommeil paradoxal (SP) dès la première injection de MPTP. Puis nous avons montré qu'un traitement de 5 jours consécutifs au quinpirole (agoniste sélectif des récepteurs dopaminergiques D2) n'avait pas d'effet ni sur la SDE ni sur le SP. En revanche, nous avons montré qu'un traitement au SKF38393 diminue substantiellement la SDE et rétablit le SP aux niveaux de base.

Ces résultats ouvrent de nouvelles pistes pour l'exploration des mécanismes mis en jeu dans les troubles du sommeil observés chez les patients parkinsoniens, ainsi que dans l'élaboration de nouvelles thérapies, utilisant les agonistes des récepteurs D1 dans la prise en charge des troubles du sommeil liés à la maladie de Parkinson.



Contents lists available at ScienceDirect

## Neurobiology of Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ynbdi](http://www.elsevier.com/locate/ynbdi)

# D1 receptor agonist improves sleep–wake parameters in experimental parkinsonism

Q1 Carole Hyacinthe<sup>a,b,1</sup>, Quentin Barraud<sup>a,b,1,2</sup>, François Tison<sup>a,b,c</sup>, Erwan Bezard<sup>a,b,d</sup>, Imad Ghorayeb<sup>a,b,e,\*</sup>

4 <sup>a</sup> Université de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France

5 <sup>b</sup> CNRS, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, Bordeaux, France

6 <sup>c</sup> Service de Neurologie, CHU de Bordeaux Haut-Lévêque, Pessac, France

7 <sup>d</sup> Institute of Laboratory Animal Sciences, China Academy of Medical Sciences, Beijing, China

8 <sup>e</sup> Département de Neurophysiologie Clinique, CHU de Bordeaux Pellegrin, Bordeaux, France

9

## ARTICLE INFO

## Article history:

11 Received 9 August 2013

12 Revised 12 October 2013

13 Accepted 29 October 2013

14 Available online xxx

## Keywords:

19 Sleep disorders

20 Excessive daytime sleepiness

21 Rapid eye movement sleep

22 Parkinson's disease

23 Non-human primate

## ABSTRACT

Both excessive daytime sleepiness (EDS) and rapid eye movement (REM) sleep deregulation are part of 25 Parkinson's disease (PD) non-motor symptoms and may complicate dopamine replacement therapy. We report 26 here that dopamine agonists act differentially on sleep architecture in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- 27 tetrahydropyridinemacaque monkey. Continuous sleep and wake electroencephalographic monitoring revealed 28 no effect of the selective dopamine D2 receptor agonist quinpirole on EDS, whereas the selective dopamine D1 29 receptor agonist SKF38393 efficiently alleviated EDS and restored REM sleep to baseline values. The present re- 30 sults question the relevance of abandoning D1 receptor agonist treatment in PD as it might actually improve 31 sleep-related disorders. 32

© 2013 Published by Elsevier Inc. 33

## Introduction

38 Sleep disturbances and excessive daytime sleepiness (EDS) are 39 among the most frequent and disabling non-motor symptoms of 40 Parkinson's disease (PD) (Ghorayeb et al., 2007). They negatively im- 41 pact the quality of life of PD patients as well as that of their caregivers 42 and in some cases even more than the motor symptoms of the disease. 43 Excessive daytime sleepiness is multifactorial and is known to correlate 44 both with PD severity (Ondo et al., 2001) and high daily levodopa- 45 equivalent dosage (Ghorayeb et al., 2007). Drug-induced EDS is a partic- 46 ular problem as many dopamine agonists have EDS as an adverse effect 47 (Knie et al., 2011), while rapid eye movement (REM) sleep alteration 48 with recurrent vivid dreams is another complication of dopaminergic 49 treatments (Pappert et al., 1999). This suggests that dopaminergic

51 medication may be deleterious to sleep–wake cycle regulation and 52 may make the global management of the motor and non-motor symp- 53 toms of PD more complex. Given the similarity between motor and 54 non-motor clinical features of PD patients and that of the 1-methyl-4- 55 phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) macaque monkey (Barraud 56 et al., 2009; Bezard et al., 2001), we assessed the effects of D1- and 57 D2-like receptor agonists (SKF38393 and quinpirole, respectively) on 58 the sleep–wake pattern of macaques rendered parkinsonian with 59 MPTP. Long-term and continuous monitoring of sleep–wake param- 60 eters were determined using electroencephalogram (EEG), electrooculo- 61 gram (EOG) and electromyogram (EMG) telemetry recordings in 62 unrestrained animals (Barraud et al., 2009).

## Material and methods

## Animals

63 64 Nine adult female macaque monkeys (3 *Macaca mulatta*, Bioprime, 65 France and 6 *Macaca fascicularis*, Xierxin, China) were fed according to 66 standard husbandry protocols and had *ad libitum* access to water. All 67 experiments were performed in accordance with French (87–848, 68 Ministère de l'Agriculture et de la Forêt) and European Communities 69 Council Directive (2010/63/EU) guidelines for the care of laboratory 70 animals and were approved by the Ethical Committee of University 71 Bordeaux Segalen (CEEA50; protocol: 50120102). Animals were housed 72 individually in a facility with other primates, thereby providing visual 73

Abbreviations: EDS, excessive daytime sleepiness; EEG, electroencephalogram; EMG, electromyogram; EOG, electrooculogram; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; PD, Parkinson's disease; REM, rapid eye movement sleep.

\* Corresponding author at: Université de Bordeaux, Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293, Bâtiment 3B étage 1, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France. Fax: +33 556 986 182.

E-mail addresses: [carole.hyacinthe@u-bordeaux2.fr](mailto:carole.hyacinthe@u-bordeaux2.fr) (C. Hyacinthe), [quentin.barraud@epfl.ch](mailto:quentin.barraud@epfl.ch) (Q. Barraud), [francois.tison@chu-bordeaux.fr](mailto:francois.tison@chu-bordeaux.fr) (F. Tison), [erwan.bezard@u-bordeaux2.fr](mailto:erwan.bezard@u-bordeaux2.fr) (E. Bezard), [imad.ghorayeb@u-bordeaux2.fr](mailto:imad.ghorayeb@u-bordeaux2.fr) (I. Ghorayeb).

Available online on ScienceDirect ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)).

<sup>1</sup> The authors equally contributed.

<sup>2</sup> Present address: Center for Neuroprosthetics and Brain Mind Institute, Swiss Federal Institute of Technology (EPFL), 1015 Lausanne, EPFL SV BMI – station 19, Switzerland.

and auditory contact. This reassuring environment provided normal restorative sleep as evidenced by the baseline sleep data.

## Drugs

In the three EEG-recorded animals, four to five intravenous injections of MPTP (0.5 mg/kg, Sequoia, SRP-066458, UK) were given to awake animals every four days until symptoms of parkinsonism were observed, as described elsewhere (Barraud et al., 2009). Short-term repeated pharmacological challenges were performed once the parkinsonian symptoms had stabilized. Quinpirole or SKF38393 were injected intramuscularly in awake animals once a day at 6 pm during a 5-day period. An interval washout period of 2 weeks was observed between the two drug sessions: Quinpirole: 1 mg/kg ((-)-quinpirole-hydrochloride (LY-171555), Q102, Sigma-Aldrich, France) and SKF38393: 2.5 mg/kg ((R)-(+)-SKF-38393-hydrochloride, S101, Sigma-Aldrich, France). Six MPTP-intoxicated macaque monkeys (Bezard et al., 2013; Marti et al., 2012) previously presented were used. A dose search with a criterion of at least 50% improvement of parkinsonian motor symptoms was first conducted on these parkinsonian monkeys (Fig. 1), 100% improvement being defined as the most effective L-dopa dose (Bezard et al., 2013; Marti et al., 2012).

## Clinical monitoring of parkinsonism

Motor status was monitored 5 days/week at 4 pm by two trained observers during 15-minute observation periods (Barraud et al., 2009) using a semi-quantitative parkinsonian monkey rating scale that assesses the following clinical symptoms: tremor, general spontaneous activity, body posture, vocalization, freezing, rigidity and arm movements (Barraud et al., 2009; Bezard et al., 2001; Imbert et al., 2000; Tass et al., 2012). Disability score ranged from 0 to 25 (normal state to maximal severity of parkinsonism). The acute state of severe parkinsonism was established when each animal reached a score  $\geq 15/25$  following MPTP administration. Parkinsonism was considered chronic when the animals reached a mildly symptomatic stage of stable parkinsonism (mean motor score =  $13.58 \pm 0.5$ ), usually four to six months after cessation of MPTP administration.

## Telemetry implantation and recording

The protocol for telemetry implantation has been previously described (Barraud et al., 2009). Animals were placed under gaseous anaesthesia (isoflurane, Belamont, Nicholas Piramal Ltd) to implant the radio-telemeter transmitter (D70-EEE, Data Sciences International,

MN, USA) within the abdominal muscle layer (Barraud et al., 2009). EEG, EOG and EMG electrodes (500 Hz sampling rate recording), were fixed respectively to the parieto-occipital part of the skull, the orbital arch bone and the lateral trapezius muscle (Barraud et al., 2009). Animals were allowed to recover for one month after surgery. Biopotential signs were transmitted to receivers and relayed to a computer through a data exchange matrix (Barraud et al., 2009). The transmitter was magnetically switched on and off. Data was acquired consecutively  $5 \times 24\text{h}/\text{week}$  over 1 month in baseline condition and then data recordings were continuously collected 24 h a day, 5 days a week at different time points of the experimental protocol and for all conditions. Five consecutive nights and days of telemetry recordings were thus collected during administration of both SKF38393 and quinpirole.

## Analysis of sleep and wake parameters

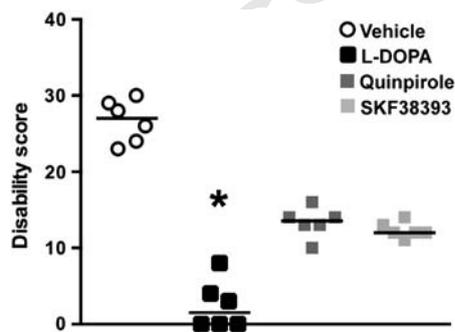
Nighttime sleep and daytime vigilance data were analyzed from 8 pm to 8 am and from 8 am to 8 pm respectively, as previously described (Barraud et al., 2009). Sleep staging was performed offline on SleepSign™ for Animal software (Kissei Comtec Co., Ltd, Japan) (Barraud et al., 2009). Sleep stage scoring was manually performed according to the Rechtschaffen and Kales criteria for the scoring of sleep in humans (Rechtschaffen and Kales, 1968). Vigilance stage scoring was performed as in humans in 30-second epochs, so that the whole epoch was assigned to one stage. Vigilance stages were blindly identified and scored by a qualified rater as described in our previous work (Barraud et al., 2009). As in humans, four vigilance stages were identified: wake, light sleep (stages 1–2), slow wave sleep (stage 3) (SWS) and REM sleep. Movement artefacts mostly appeared during diurnal wakefulness but no such gross artefacts were observed during the night. Any epochs obscured by such artefacts were excluded from the analysis.

## Statistical analysis

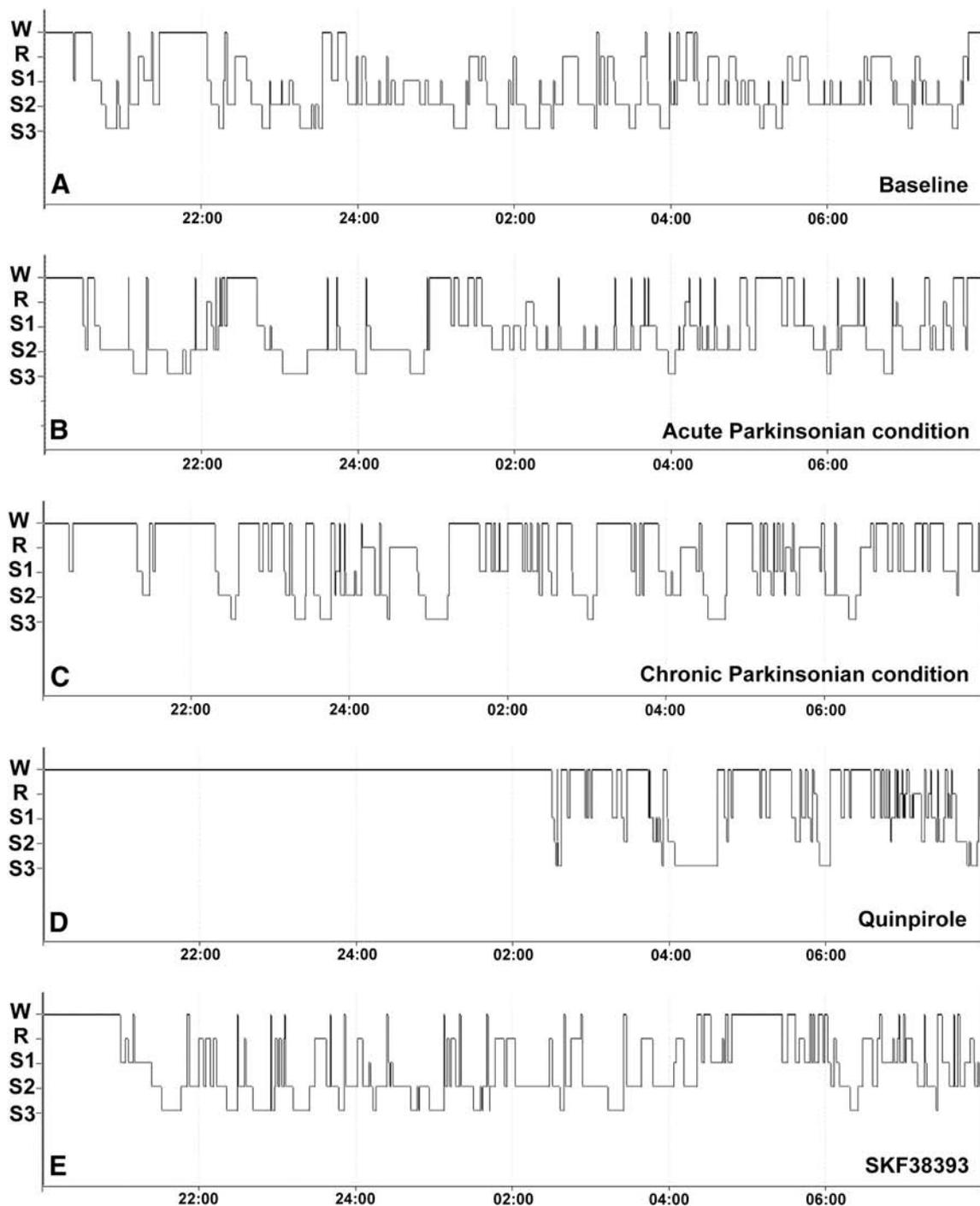
Appropriate standard statistical methods for the data analysis were applied using GraphPad Prism 5 software. One-way ANOVA with repeated measures followed by Newman–Keuls *post-hoc* analyses were used to highlight significant differences in EDS, REM sleep and other sleep parameters between the conditions (baseline, acute and chronic parkinsonian as well as quinpirole and SKF38393 challenges). Standard error (SEM) is represented by the  $\pm$  symbol. Statistical significance was considered at a probability (P) value  $\leq 0.05$ .

## Results

MPTP injections progressively impaired motor behaviour with the occurrence of bradykinesia and rigidity reminiscent of parkinsonism, as previously described (Barraud et al., 2009; Bezard et al., 1997, 2001). The remarkable baseline night-to-night consistency of sleep architecture (Fig. 2A) within each MPTP-injected animal was markedly disrupted the night after the first MPTP administration (Fig. 2B) and before the occurrence of any motor symptoms of parkinsonism (Barraud et al., 2009). In brief, sleep efficacy markedly deteriorated following MPTP, and progressive development of parkinsonism significantly increased this worsening. Progressive sleep deterioration and fragmentation (Figs. 2B, 2C) with decreased sleep efficacy (one-way ANOVA with repeated measures  $F_{[4,14]} = 57.2$ ,  $p < 0.001$ ;  $-12.4\%$  and  $-15.5\%$  respectively, acute and chronic parkinsonian conditions compared to baseline, Newman–Keuls  $p < 0.01$ ) and increased wake after sleep onset (WASO) periods were noticeable in the acute parkinsonian stage but were significant mostly during the chronic parkinsonian condition (one-way ANOVA with repeated measures  $F_{[4,14]} = 5.4$ ,  $p < 0.001$ ;  $+72.7\%$  compared to baseline, Newman–Keuls  $p < 0.01$ ) (Table 1).



**Fig. 1.** Parkinsonian disability score in six parkinsonian macaques after vehicle (saline solution), L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine; a tailored dose for each individual ranging between 15 and 20 mg/kg, PO) (Aubert et al., 2005; Bezard et al., 2013; Fernagut et al., 2010; Hill et al., 2004; Marti et al., 2012), quinpirole (1 mg/kg, IM) or SKF38393 (2.5 mg/kg, IM) administration. 100% improvement was achieved after the monkeys received a tailored dose of L-DOPA (Bezard et al., 2013; Marti et al., 2012) and the SFK and quinpirole doses were selected so as to reach 50% improvement of the maximum. Disability scores (nonparametric ratings) were analyzed using the Friedman test ( $F_r = 16.93$ ,  $p < 0.0001$ ) followed by Dunn's multiple comparisons test (\*:  $p < 0.05$  vs. vehicle).



**Fig. 2.** Representative hypnograms of baseline, acute and parkinsonian conditions and during pharmacological challenges. Each hypnogram illustrate a 12-hour period (presented on the abscissa axes) during nighttime for each condition. S1, S2 = light sleep stages; S3 = slow wave sleep stages; R = rapid eye movement sleep; W = wake. Note the relative similarities between the sleep architecture of the baseline condition (A) and following SKF38393 challenge (E). Note also the almost complete suppression of REM sleep in the acute parkinsonian condition (B) and the disruption of sleep architecture in the chronic parkinsonian condition (C). Following quinpirole challenge, sleep latencies were markedly increased (D).

Q2

### 172 Parkinsonism generates EDS and disturbs REM sleep

173 Consistent with previously reported data (Barraud et al., 2009),  
 174 daytime sleepiness rapidly appeared during the MPTP challenge  
 175 and persisted through the chronic phase of parkinsonism (one-way  
 176 ANOVA with repeated measures,  $F_{[4,14]} = 9.23$ ,  $p < 0.01$ ) after the  
 177 animals had coped with their motor symptoms (mean motor score =  
 178  $13.52 \pm 0.5$ ). The mean percentage of time spent asleep during daytime  
 179 was significantly increased in the acute parkinsonian condition (+178%  
 180 from baseline, Newman-Keuls  $p < 0.05$ ) and was even higher in the

chronic parkinsonian condition (+241.42% from baseline; Newman-  
 181 Keuls  $p < 0.05$ ) (Fig. 3A). As expected, MPTP administration almost  
 182 completely abolished REM sleep (one-way ANOVA with repeated mea-  
 183 sures,  $F_{[4,14]} = 36.09$ ,  $p < 0.0001$ ;  $-92.54\%$ , compared to baseline  
 184 Newman-Keuls  $p < 0.001$ ) (Fig. 3B). In the chronic parkinsonian  
 185 condition, REM sleep progressively reemerged (+829.0% compared  
 186 to the acute parkinsonian condition, Newman-Keuls  $p < 0.001$ )  
 187 but remained significantly lower than baseline values ( $-30.7\%$ ,  
 188 Newman-Keuls  $p < 0.05$ ) (Fig. 3B), as previously reported (Barraud  
 189 et al., 2009).  
 190

**Table 1** Relevant sleep parameters of animals in baseline, acute and chronic parkinsonian conditions, and during quinpirole or SKF38393 challenges. Total sleep time (TST) refers to the total sleep period minus the time spent awake during the sleep period time between 8 pm and 8 am. Values in lines 2 and 3 (respectively sleep stages 1–2 and 3) are expressed as the mean percentage of TST ± SEM. Sleep efficacy expressed as a percentage is defined as the ratio of TST to the sleep period time ± SEM. Wake after sleep onset (WASO), presented as a percentage, is defined as the total wake time between the first sleep onset and the last episode of sleep during the sleep period time ± SEM. One-way ANOVA with repeated measures followed by Newman–Keuls *post hoc* analysis. Significant differences between conditions are indicated from Baseline\*, Acute MPTP#, Chronic MPTP†, Quinpirole‡.

|                     | Baseline     | Acute parkinsonian condition | Chronic parkinsonian condition | Quinpirole      | SKF38393      |
|---------------------|--------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------|---------------|
| TST (min)           | 570.5 ± 17.7 | 519.9 ± 16.0                 | 492.2 ± 22.6                   | 231.1 ± 42.4*#† | 536.0 ± 26.0‡ |
| Sleep latency (min) | 14.8 ± 4.8   | 13.7 ± 5.5                   | 9.5 ± 2.6                      | 332.1 ± 20.7*#† | 14.2 ± 7.8‡   |
| % Stages 1–2        | 54.7 ± 2.9   | 63.3 ± 3.5                   | 50.3 ± 5.6#                    | 27.4 ± 4.1*#†   | 49.0 ± 5.9#‡  |
| % Stage 3           | 13.8 ± 1.8   | 9.8 ± 1.7                    | 9.7 ± 2                        | 11.6 ± 3.3      | 13.0 ± 3.6    |
| % Sleep efficacy    | 82.4 ± 2.4   | 72.2 ± 2.8*                  | 69.6 ± 3.5*                    | 47.6 ± 2*#†     | 75.5 ± 3*‡    |
| % WASO              | 17.6 ± 2.4   | 25.8 ± 2.4                   | 30.4 ± 3.5*                    | 52.4 ± 2*#†     | 24.0 ± 3.4‡   |

**Dopamine D2 receptor agonist did not improve EDS**

Quinpirole had a deleterious effect on sleep parameters as compared to acute and chronic parkinsonian conditions. Quinpirole dramatically and significantly increased sleep latencies (Fig. 2D) compared to all other conditions (one-way ANOVA with repeated measures  $F_{[4,14]} = 190.4, p < 0.001; +2143.9\%, +2324.1\%, +3395.8\%$  and  $+2238.7\%$  respectively compared to baseline, acute and chronic parkinsonian conditions, and to SKF38393, Newman–Keuls  $p < 0.001$ ) (Table 1). Quinpirole also significantly worsened WASO ( $+72.4\%$  compared to the chronic parkinsonian condition, Newman–Keuls  $p < 0.001$ ), leading to a sharp reduction in the total sleep time (one-way ANOVA with repeated measure,  $F_{[4,14]} = 40.2, p < 0.0001; -53.0\%$  compared to the chronic parkinsonian condition, Newman–Keuls  $p < 0.001$ ) (Table 1). These deep changes in sleep architecture resulted in a substantial deterioration of sleep efficacy ( $-31.6\%$  compared to the chronic parkinsonian condition, Newman–Keuls  $p < 0.001$ ).

Although EDS deteriorated following quinpirole challenge, it did not reach significance when compared to mean EDS values ( $+10\%$  from chronic parkinsonian condition values) (Fig. 3A). Quinpirole challenge also had no effect on REM sleep, as the decrease in REM sleep percentages compared to the baseline condition was maintained ( $-40.0\%$ , Newman–Keuls  $p < 0.01$ ) (Fig. 3B).

**D1 agonist improved EDS**

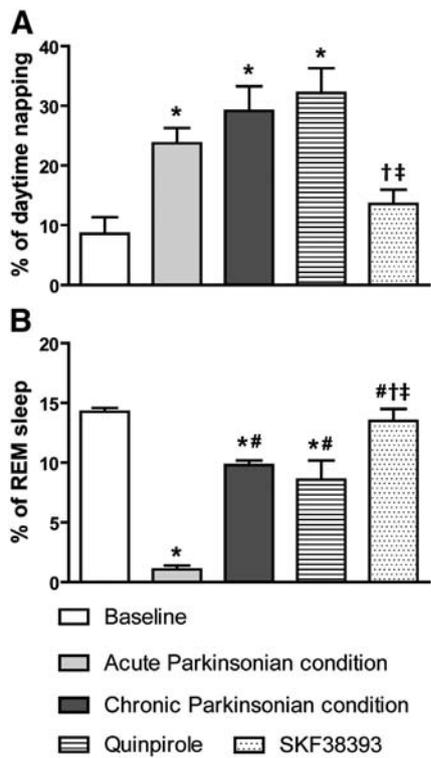
Considering relevant sleep parameters, SKF38393 had an overall favourable effect on sleep as it increased slow wave sleep to baseline levels and, albeit not significantly, reduced WASO periods and improved sleep efficacy (Table 1). SKF38393 significantly decreased EDS compared to both the chronic parkinsonian and quinpirole conditions ( $-53.46\%$  and  $-42.19\%$  respectively, Newman–Keuls  $p < 0.05$ ), and daytime napping returned to baseline physiologic values (Fig. 3A). Furthermore, SKF38393 successfully restored REM sleep to baseline levels (Fig. 2E). Indeed, REM sleep percentage was significantly increased following SKF38393 compared to the acute parkinsonian condition ( $+1168.90\%$ , Newman–Keuls  $p < 0.001$ ), the chronic parkinsonian condition ( $+36.58\%$ , Newman–Keuls  $p < 0.05$ ) and to REM sleep values obtained under quinpirole challenge ( $+57.57\%$ , Newman–Keuls  $p < 0.05$ ) (Fig. 3B).

**Discussion**

The present study demonstrates a clear dichotomy between the pharmacological effects of selective dopamine agonists on sleep–wake parameters in MPTP-intoxicated animals. While acute quinpirole challenges had no effect either on EDS or on REM sleep percentages compared to both acute and chronic parkinsonian conditions, both parameters were improved by the D1 agonist SKF38393 in the MPTP macaque model of PD.

The MPTP-intoxicated non-human primate replicates most of the essential motor symptoms observed in PD patients (Bezard et al., 2001). In addition, it reproduces the salient sleep–wake alterations observed in PD (Barraud et al., 2009). By sharing such motor and non-motor similarities with the human disease, the MPTP-intoxicated monkey appears to be a valuable and relevant model to investigate sleep–wake impairments and to test pharmacological approaches aiming to reverse these non-motor symptoms efficiently.

Although the currently marketed D2/D3 receptor agonists efficiently alleviate PD motor symptoms, most of them are known to induce incapacitating EDS in patients (Homann et al., 2002). The dopamine D2 receptor is known to play a major role in wakefulness and REM-sleep regulation in normal (Lima et al., 2008; Qu et al., 2010) and narcoleptic (Burgess et al., 2010) rodents, but the effects of D2 receptor agonists are still unclear. The biphasic action of acute administration of dopamine D2 agonists in rodents shows that low doses of quinpirole decrease arousal and increase REM sleep while large doses promote the opposite effects (Monti et al., 1989). Moreover, the impact of dopamine agonists on parkinsonism-related sleep disorders has been investigated mainly in



**Fig. 3.** EDS (A) and REM sleep (B) percentage variations in the acute and chronic parkinsonian conditions, and following quinpirole and SKF38393 challenges. Results are expressed either as the mean percentage of time spent asleep during daytime (8 am–8 pm) (A) or as the mean percentage of total REM sleep over total sleep time (B) ± SEM. One-way ANOVA with repeated measures followed by Newman–Keuls *post hoc* analysis. Significant differences between conditions are indicated from Baseline\*, Acute MPTP#, Chronic MPTP†, Quinpirole‡.

rodents. Indeed, enhancement of both wakefulness (Wisor et al., 2001) and D2 agonist-induced REM sleep (Dzirasa et al., 2006) has been reported in dopamine transporter-knockout mice. Contradictory results were however reported in the MPTP mouse model (Laloux et al., 2008). Since sleep architecture is different in nature between rodents and primates, and as rodent models of PD do not adequately replicate the motor and non-motor phenotype of PD, we used the MPTP macaque model to accurately decipher the exact impact of dopamine receptor stimulation upon wake–sleep parameters in parkinsonism. Short-term quinpirole challenges (5 days) had no significant effect on EDS or on REM sleep in MPTP-intoxicated monkeys. Furthermore, quinpirole had a deleterious effect on sleep parameters with a profound shortening of the animals' total sleep time and a dramatic increase in sleep latency, at least at the daily dosage we used in our protocol, thus confirming its arousal-inducing effect. Interestingly, it has been shown that D2/D3 agonists, although capable of reducing motor events during sleep, do not alleviate sleep arousal and deepening sleep in patients with restless legs syndrome (Manconi et al., 2012).

Interestingly, the dopamine D1 receptor agonist SKF38393 successfully alleviated EDS and restored REM sleep to baseline values in MPTP-treated monkeys. This result is compatible with the ability of the D1 receptor agonist to promote wakefulness in normal and narcoleptic rodents (Burgess et al., 2010; Ongini et al., 1985). D1 agonists are known to convey an antiparkinsonian action superior to D2/D3 agonists and comparable to that of levodopa (Gomez-Mancilla et al., 1993; Grondin et al., 1997; Rascol et al., 2001). ABT-431 was reported to be as active as levodopa in patients but was also highly prodyskinetic (Rascol et al., 2001), a well-known side-effect, since it has been demonstrated that D1 receptors are pivotal in generating dyskinesia (Aubert et al., 2005; Berthet et al., 2009). The potential of D1 receptor stimulation for reversing sleep disorders and EDS in PD should therefore be carefully weighed for its Janus-like potential in eliciting dyskinesia. Further studies are needed to assess the partial or full D1 agonist dose range for addressing these different motor and non-motor symptoms and to test the relieving potential of combined agonist therapies that could positively impact the daily life of PD patients.

## Conclusion

This pioneering study highlights the differential role of D2/D3 and D1 dopamine receptors in worsening or improving respectively the wake–sleep parameters in parkinsonism. Given the beneficial effects of the long-term administration of D2/D3 dopamine agonists on the motor symptoms of PD, our study emphasizes the fact that sleep-related disorders in PD should be considered in therapeutic approaches for improving the management of the disease.

## Acknowledgments

Dr. Imad Ghorayeb received unrestricted research donations from the French Association of Willis Ekbom disease (AFE). We thank Dr. Li Qin, Li Hao, Tho Hai Nguyen and Hugues Orignac from the Bordeaux primate facility for the technical assistance and animal care.

## References

- Aubert, I., et al., 2005. Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann. Neurol.* 57, 17–26.
- Barraud, Q., et al., 2009. Sleep disorders in Parkinson's disease: the contribution of the MPTP non-human primate model. *Exp. Neurol.* 219, 574–582.
- Berthet, A., et al., 2009. Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D1 dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-DOPA-induced dyskinesia. *J. Neurosci.* 29, 4829–4835.
- Bezard, E., et al., 1997. A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the monkey. *Brain Res.* 766, 107–112.
- Bezard, E., et al., 2001. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 21, 6853–6861.
- Bezard, E., et al., 2013. Study of the antidyskinetic effect of eltopazine in animal models of levodopa-induced dyskinesia. *Mov. Disord.* 28, 1088–1096.
- Burgess, C.R., et al., 2010. Dopaminergic regulation of sleep and cataplexy in a murine model of narcolepsy. *Sleep* 33, 1295–1304.
- Dzirasa, K., et al., 2006. Dopaminergic control of sleep–wake states. *J. Neurosci.* 26, 10577–10589.
- Fernagut, P.O., et al., 2010. Dopamine transporter binding is unaffected by L-DOPA administration in normal and MPTP-treated monkeys. *PLoS One* 5, e14053.
- Ghorayeb, I., et al., 2007. A nationwide survey of excessive daytime sleepiness in Parkinson's disease in France. *Mov. Disord.* 22, 1567–1572.
- Gomez-Mancilla, B., et al., 1993. Effect of adding the D1 agonist CY 208–243 to chronic bromocriptine treatment. I: evaluation of motor parameters in relation to striatal catecholamine content and dopamine receptors. *Mov. Disord.* 8, 144–150.
- Grondin, R., et al., 1997. Potential therapeutic use of the selective dopamine D1 receptor agonist, A-86929: an acute study in parkinsonian levodopa-primed monkeys. *Neurology* 49, 421–426.
- Hill, M.P., et al., 2004. Levetiracetam potentiates the antidyskinetic action of amantadine in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-lesioned primate model of Parkinson's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310, 386–394.
- Homann, C.N., et al., 2002. Sleep attacks in patients taking dopamine agonists: review. *BMJ* 324, 1483–1487.
- Imbert, C., et al., 2000. Comparison of eight clinical rating scales used for the assessment of MPTP-induced parkinsonism in the Macaque monkey. *J. Neurosci. Methods* 96, 71–76.
- Knie, B., et al., 2011. Excessive daytime sleepiness in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs* 25, 203–212.
- Laloux, C., et al., 2008. Effect of dopaminergic substances on sleep/wakefulness in saline- and MPTP-treated mice. *J. Sleep Res.* 17, 101–110.
- Lima, M.M., et al., 2008. Blockage of dopaminergic D(2) receptors produces decrease of REM but not of slow wave sleep in rats after REM sleep deprivation. *Behav. Brain Res.* 188, 406–411.
- Manconi, M., et al., 2012. Dissociation of periodic leg movements from arousals in restless legs syndrome. *Ann. Neurol.* 71, 834–844.
- Marti, M., et al., 2012. Nociceptin/orphanin FQ receptor agonists attenuate L-DOPA-induced dyskinesias. *J. Neurosci.* 32, 16106–16119.
- Monti, J.M., et al., 1989. Effects of the selective dopamine D-2 receptor agonist, quinpirole on sleep and wakefulness in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 169, 61–66.
- Ondo, W.G., et al., 2001. Daytime sleepiness and other sleep disorders in Parkinson's disease. *Neurology* 57, 1392–1396.
- Ongini, E., et al., 1985. Stimulation of dopamine D-1 receptors by SKF 38393 induces EEG desynchronization and behavioral arousal. *Life Sci.* 37, 2327–2333.
- Pappert, E.J., et al., 1999. Hallucinations, sleep fragmentation, and altered dream phenomena in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 14, 117–121.
- Qu, W.M., et al., 2010. Essential role of dopamine D2 receptor in the maintenance of wakefulness, but not in homeostatic regulation of sleep, in mice. *J. Neurosci.* 30, 4382–4389.
- Rascol, O., et al., 2001. Induction by dopamine D1 receptor agonist ABT-431 of dyskinesia similar to levodopa in patients with Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 58, 249–254.
- Rechtschaffen, A., Kales, A., 1968. A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. US Government Printing Office, Washington DC.
- Tass, P.A., et al., 2012. Coordinated reset has sustained aftereffects in Parkinsonian monkeys. *Ann. Neurol.* 72, 816–820.
- Wisor, J.P., et al., 2001. Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *J. Neurosci.* 21, 1787–1794.

# **DISCUSSION**

## DISCUSSION

### Impact d'une carence en fer sérique sur le système dopaminergique : vers un modèle macaque de la maladie de Willis-Ekbom ?

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact d'une déplétion en fer sérique sur le métabolisme dopaminergique, en vue de modéliser la MWE chez le primate non humain. Cette recherche originale a généré d'importantes observations et a également confirmé de rares résultats rapportés dans la littérature chez le rongeur. Par ailleurs, les remarquables similitudes observées à la fois pour les paramètres du cycle veille-sommeil, pour l'organisation neuroanatomique ainsi que pour le métabolisme du fer entre le macaque et l'Homme, feraient du singe un modèle de choix pour étudier la physiopathologie de la MWE. Aussi, la réalisation d'une telle étude chez le primate non humain, pourrait relever d'une pertinence clinique en vue de comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la MWE afin de développer une prise en charge plus rationnelle.

### M. Variations journalières des biomarqueurs du fer chez le macaque naïf

L'objectif de cette première partie était d'établir pour la première fois les concentrations des biomarqueurs du fer chez le macaque cynomolgus et d'étudier leur potentiel de variation au cours de la journée. Pour cela, nous avons dosé les taux d'hémoglobine ainsi que du fer, de la ferritine et de la transferrine dans le sérum et le LCR chez 18 animaux.

Tout d'abord, les taux d'hémoglobine que nous avons mesurés correspondent à la gamme des valeurs physiologiques indiquées pour le *Macaca fascicularis* (Vogin and Oser, 1971). Il est intéressant de remarquer que ces concentrations sont comparables aux valeurs normales indiquées chez l'humain (environ 15,9g/dL pour l'homme et 13,6g/dL pour la femme) (Wadsworth, 1954, Garn et al., 1975). De plus, nous avons mis en évidence que les

paramètres biologiques liés au fer varient significativement sur une période de 12h dans le sang, le sérum et le LCR, comme indiqué dans les études réalisées chez l'Homme (Hamilton et al., 1950, Hemmler. G, 1951). Ainsi, on retrouve un pic de concentration maximale du fer sérique le matin à 8 heures puis une diminution à partir de 12h, alors que les taux les plus faibles sont observés dans l'après-midi. La différence entre les deux valeurs extrêmes observées au cours de la journée est de 21,1% alors qu'elle est de 28% environ, chez l'homme (Kuhn and Brodan, 1982).

De manière intéressante, nos résultats mettent en évidence un profil inverse pour les taux de ferritine sérique. Les variations journalières des taux de ferritine sérique ne sont pas clairement établies chez l'homme, notamment du fait du peu d'études à ce sujet et de la variabilité interindividuelle observée (20 à 300ng/ml chez l'humain) (Dale et al., 2002). Ainsi, les études reportent aussi bien l'absence (Ridefelt et al., 2010) que la présence (Third et al., 2006) de variations au cours de la journée. La ferritine étant le principal moyen de stockage du fer (Arosio et al., 2009), il est probable qu'aux heures où celle-ci atteint son pic de concentration maximum, les taux de fer soient diminués et inversement.

En vu d'appréhender notre modèle d'étude le plus précisément possible, nous avons dosé les concentrations du fer, de la ferritine et de la transferrine de manière simultanée dans le sérum et dans le LCR et avons constaté que ces trois facteurs sont présents en plus faibles quantités comparé à leurs taux respectifs dans le sérum (environ 30 fois inférieur en moyenne pour le fer, sur 12h). Ces résultats sont cohérents avec les différences retrouvées chez l'Homme entre ces deux compartiments (LeVine et al., 1998).

Nous avons observé que le fer, la ferritine et la transferrine varient également dans le LCR au cours de la journée. Leur profil de variation est relativement similaire à celui du fer sérique, excepté que leur pic de concentration est retrouvé le soir à 20h au lieu de 8h. Bien que l'on retrouve les mêmes valeurs moyennes que chez l'humain pour ces trois paramètres, aucune étude à notre connaissance n'a rendu compte des variations circadiennes du fer et des protéines associées dans le LCR. Néanmoins, nos résultats suggèrent que les concentrations du fer et de ses biomarqueurs présentent un profil de variations circadien dans le LCR. Ainsi, il serait intéressant de confirmer cela par des mesures de ces facteurs sur une durée de 24h. De plus, grâce à la réalisation simultanée des dosages dans le sérum et dans le LCR, nous avons mis en évidence pour la première fois, des relations entre les niveaux observés dans chacun des deux compartiments pour le fer, la ferritine et la transferrine, chez le macaque naïf. Ainsi, lorsque les taux de fer sérique augmentent, les niveaux de fer dans le LCR diminuent. En revanche, les concentrations de ferritine ou de transferrine varient dans le même sens, dans ces deux compartiments.

Finalement, les variations circadiennes mises en évidence dans le sérum ainsi que dans le LCR chez le primate non humain offrent des perspectives intéressantes. En effet, les symptômes décrits dans la MWE apparaissent préférentiellement en soirée et/ou la nuit, c'est-à-dire quand les taux de fer sont les plus bas (Barriere et al., 2005, Ridefelt et al., 2010). Aussi, les variations journalières du fer et de ses biomarqueurs, observées dans notre modèle d'étude, pourraient être utilisées pour investiguer le profil circadien des symptômes du MWE.

## **N. Le PSR induit une déplétion des biomarqueurs du fer dans le sérum**

Le but de cette partie était d'établir un modèle de carence martiale chez le singe en induisant une diminution du fer sérique afin d'étudier par la suite, les conséquences de cette carence sur le métabolisme dopaminergique. Pour cela, nous avons élaboré un protocole consistant à effectuer un nombre croissant de saignées sur trois groupes d'animaux distincts.

Nos résultats montrent que les taux d'hémoglobine, de fer et de ferritine sont diminués dans le sang et le sérum comparé aux taux de bases, chez les animaux ayant subi le PSR. Comme attendu, les taux d'hémoglobine et de fer diminuent en fonction du nombre de saignées. Ces résultats sont en accord avec les études ayant montré que des pertes de sang accidentelles (Mitchell, 2007) ou induites par phlébotomies répétées conduisent à une diminution des taux d'hémoglobine chez l'Homme (Propper and Nathan, 1982) ainsi que chez le singe (Wills, 1935).

De manière surprenante, conjointement au déficit en fer provoqué en périphérie, nous avons constaté une augmentation considérable des taux de fer dans le LCR et ce, dès la deuxième saignée. Ces résultats inédits indiquent que la baisse des taux de fer sérique est concomitante à une augmentation des taux de fer au niveau central, suggérant alors que les taux de fer mesurés en périphérie ne reflètent pas ceux observés au niveau central. En raison du manque de référence pour expliquer ces observations, une hypothèse serait que le cerveau est un organe privilégié pour l'approvisionnement en fer lorsque l'organisme est soumis à des conditions restrictives de carence. Une étude a montré que la transferrine et le transporteur de métaux divalents (DMT1) étaient surexprimés chez les jeunes singes

anémiques, plusieurs mois après la naissance, suggérant un effort du système nerveux central (SNC) pour acquérir le fer à travers la barrière hématoencéphalique (BHE) (Burdo and Connor, 2003, Rao et al., 2013). De même, des travaux ont reporté que le cerveau montrait une plus grande capacité à retenir le fer et s'adapterait mieux que d'autres organes, tel que le foie, aux changements occasionnés par un régime alimentaire carencé en fer chez les rats. Ainsi, les stocks de fer dans le cerveau diminueraient moins drastiquement et moins rapidement lors de l'induction d'une carence martiale (Ben-Shachar et al., 1986, Youdim et al., 1989). D'autres ont avancé l'idée qu'une altération potentielle au niveau de la BHE ou de la barrière sang-LCR pourrait modifier les échanges de fer entre ces deux compartiments comme suggéré chez les patients atteints de la MWE (Mizuno et al., 2005). Ainsi, l'altération du transport du fer entre le SNC et la périphérie pourrait expliquer l'accumulation de fer dans le LCR observée chez nos animaux, ce qui pourrait être précisé par une étude histologique notamment pour l'expression de la transferrine, de son récepteur ou de DMT1.

Par ailleurs, les études s'appliquant à caractériser des potentiels marqueurs pour détecter la MWE ont montré une diminution des taux de ferritine dans le plasma et le LCR de patients atteints de la MWE (Sun et al., 1998, Mizuno et al., 2005, Cho et al., 2013). Or, nos résultats retrouvent une diminution des taux de ferritine sérique chez les animaux ayant subi le PSR et les taux de ferritine du LCR étaient en dessous des valeurs détectables dans le groupe ayant subi le maximum de saignées.

Les modèles de carence en fer (réalisés par carence alimentaire pour la plupart) rapportent une diminution des taux d'hémoglobine et de fer sérique, ainsi qu'une diminution en fer tissulaire. Cependant, aucune de ces études ne renseigne sur l'état des taux fer dans le LCR (Dallman and Spirito, 1977, Chen, 1995, Nelson et al., 1997). Le caractère original de notre étude réside dans l'observation simultanée des taux de fer dans le sérum et le LCR à l'état normal et après PSR. Ceci permet d'ajouter un niveau de compréhension supplémentaire entre les rapports existant entre les taux des biomarqueurs de fer sérique et ceux du LCR.

Finalement, les dosages des taux de fer cérébraux devront être réalisés chez nos animaux, afin d'étudier à quel point la dérégulation de l'homéostasie du fer en périphérie influence son métabolisme au niveau du SNC. Ceci permettrait de savoir si les diminutions des taux de fer tissulaires reportés dans les modèles de déplétion en fer chez le rongeur (Youdim and Green, 1978), sont une altération primaire ou secondaire à l'augmentation du fer dans le LCR.

## O. Le PSR modifie le métabolisme dopaminergique

L'objectif de cette partie était de déterminer l'impact d'une diminution en fer sérique sur le métabolisme des monoamines. Pour ce faire, nous avons dosé les taux tissulaires et extracellulaires des monoamines, de leurs métabolites ainsi que la L-DOPA endogène.

### O. I. Modification du métabolisme dopaminergique striatal

Les résultats obtenus à partir des dosages tissulaires *post-mortem*, nous ont permis d'établir des relations entre l'augmentation des taux de fer observée dans le LCR et les modifications du métabolisme dopaminergique dans le putamen. Tout d'abord, nous avons validé la cohérence des concentrations de DA dans le putamen de nos animaux contrôles, en les comparant à celles précédemment décrites chez le primate non-humain (Piffl et al., 1991).

Nos résultats montrent que les taux de L-DOPA diminuent en fonction de l'augmentation du fer dans le LCR, tandis que le ratio DA/L-DOPA augmente chez les animaux ayant subi le protocole de saignées. Aussi, nos résultats indiquent que le ratio (DOPAC+HVA)/DA diminue en fonction de l'augmentation du fer dans le LCR. Ensemble, ces résultats sont en faveur d'une augmentation de DA tissulaire chez les animaux ayant subi le PSR. Cependant, comme décrit pour des modèles de carence martiale chez le rongeur, nous n'avons pas observé de variation significative directe des concentrations de DA tissulaire (Nelson et al., 1997).

Par ailleurs, nous avons observé une augmentation considérable des taux de DA et de DOPAC dans les échantillons prélevés *in vivo* dans le striatum, chez les animaux ayant subi le maximum de saignées. Ces résultats ont été comparés à des valeurs contrôles reportées dans la littérature pour le singe naïf (Boulet et al., 2008) et sont en accord avec ceux observés sur des modèles de carence martiale chez le rongeur, indiquant une augmentation des concentrations de DA et de DOPAC de plus de 50% (Beard et al., 1994, Chen, 1995, Nelson et al., 1997). Il est intéressant de constater que les taux de DA et de DOPAC ne sont pas modifiés chez les animaux ayant subi 4 ou 6 saignées, bien qu'ils présentent eux aussi des taux anormalement élevés en fer dans le LCR. La différence de concentrations extracellulaires en DA et DOPAC entre les 3 groupes d'animaux suggère qu'un certain temps d'exposition à des niveaux anormalement élevés en fer est nécessaire pour induire une modification dopaminergique. Ainsi, seule une exposition sur le moyen

terme, à un excès de fer (8 saignées réparties sur 6 semaines pour le groupe 3), engendrerait les modifications de concentrations observées dans le putamen.

**L'augmentation considérable des concentrations extracellulaires de DA et de DOPAC observée dans le putamen, met en évidence une dérégulation du métabolisme dopaminergique et pourrait s'expliquer par deux phénomènes.**

**La première hypothèse** suggère une dérégulation du métabolisme, en amont et en aval de la DA donc, soit de sa synthèse, soit de sa dégradation. D'une part, les résultats *post-mortem* indiquent que la L-DOPA endogène diminue avec l'augmentation des taux de fer dans le LCR. Or, le fer est un co-facteur indispensable pour catalyser la production de L-DOPA. Ainsi, on pourrait s'attendre à ce que des quantités élevées en fer entraînent une augmentation de la production de L-DOPA, bien que celle-ci soit rapidement transformée en DA.

Cependant, il a été montré que l'activité de la tyrosine hydroxylase peut être inhibée par une augmentation des concentrations de L-DOPA et/ou de DA (Fitzpatrick, 1999). Des études *in vitro* ont démontré que la L-DOPA est capable de capturer les complexes TH-Fe<sup>3+</sup>, nécessaires à sa production, inhibant ainsi sa propre voie de synthèse (Ramsey and Fitzpatrick, 1998). D'autre part, nos résultats indiquent que le ratio (DOPAC+HVA)/DA diminue avec l'augmentation du fer dans le LCR, suggérant une diminution de la dégradation de la DA, comme montré au préalable dans un modèle de carence martiale chez le rat (Nelson et al., 1997). Ainsi, même si la production de DA est diminuée du fait de la baisse des taux de L-DOPA, les taux tissulaires de DA seraient maintenus en raison d'une altération de son système de dégradation.

Aux vues des taux extracellulaires considérablement élevés pour la DA et le DOPAC, ainsi que la diminution tissulaire du ratio (DOPAC+HVA)/DA, **la seconde hypothèse** irait en faveur d'un emballement de la synthèse de DA dans le groupe d'animaux ayant subi le maximum de saignées. Cette synthèse accrue, serait reflétée par l'augmentation du ratio DA/L-DOPA avec l'augmentation des taux de fer dans le LCR. Cette hypothèse n'exclue pas une altération conjointe du mécanisme de dégradation proposé ci-avant.

Il a été montré que l'activité du transporteur de la dopamine (DAT) (Nelson et al., 1997, Erikson et al., 2000) et l'expression du récepteur D2 (Ashkenazi et al., 1982, Ben-Shachar et al., 1985) étaient diminuées au niveau du striatum, dans les modèles de carence en fer chez le rat. De même, chez l'humain, la diminution de l'expression du récepteur D2 corrèle avec la sévérité des symptômes de la MWE (Connor et al., 2009). La combinaison de ces deux

phénomènes pourrait expliquer qu'une diminution de la recapture de la DA vers les cellules et/ou qu'une diminution du rétrocontrôle négatif exercé par les récepteurs D2 présynaptiques sur la libération de DA (Paulus and Trenkwalder, 2006) et conduirait à l'augmentation de DA extracellulaire. Ainsi, des analyses histologiques complémentaires devront être réalisées, pour étudier l'expression striatale du DAT et des récepteurs D2 de nos animaux.

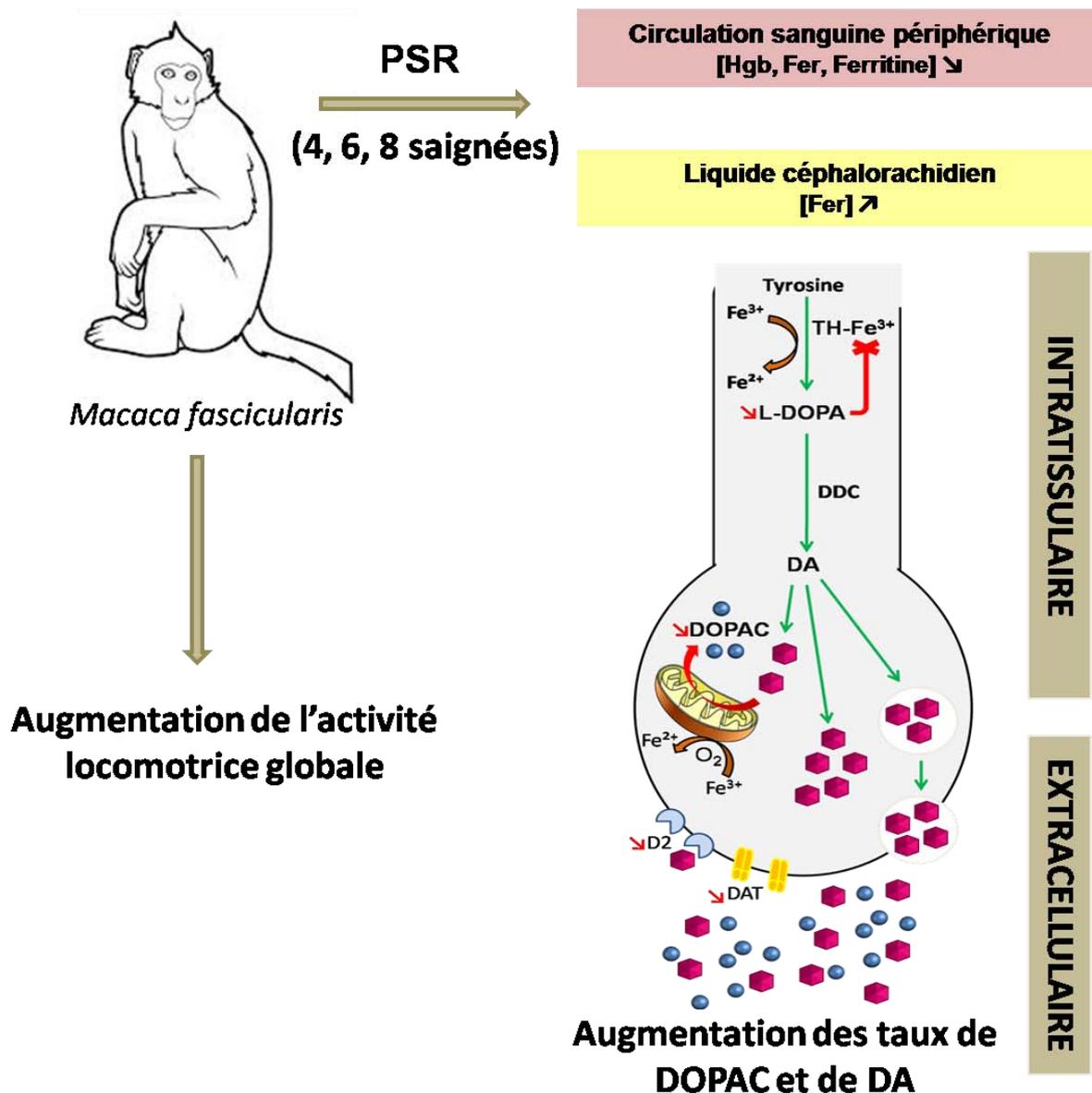
Les deux hypothèses proposées ci-dessus pour expliquer la dérégulation du métabolisme dopaminergique chez nos animaux, vont toutes les deux dans le sens d'une augmentation des concentrations de dopamine dans le striatum (**Figure 35**).

Par ailleurs, nous ne retrouvons pas de relation entre les taux de fer dans le sérum et la modification des concentrations des marqueurs du métabolisme dopaminergique. Néanmoins, nos résultats indiquent que le ratio (DOPAC+HVA)/DA dans le putamen diminue significativement en fonction des saignées, conjointement à la baisse des taux d'hémoglobine, suggérant donc une augmentation de DA et/ou une diminution de sa dégradation. De plus, les taux de L-DOPA du putamen diminuent avec la baisse des taux d'hémoglobine, alors qu'à l'inverse le ratio DA/L-DOPA augmente, suggérant là encore une augmentation de la production de DA. Ces données permettent d'établir une continuité pertinente entre les ratios de synthèse et de dégradation de la DA, les taux d'hémoglobine en périphérie et ceux du fer décrits ci-dessus au niveau central.

Le rôle de la DA striatale dans les fonctions motrices a été largement décrit (Ehringer and Hornykiewicz, 1960, Dahlstroem and Fuxe, 1964) et une augmentation de l'activité dopaminergique au niveau synaptique a récemment été suggérée chez les patients atteints de la MWE (Earley et al., 2013). A terme, une surcharge suffisamment importante de dopamine dans le milieu extracellulaire, pourrait être responsable des modifications comportementales observées chez les animaux ayant subi le maximum de saignées. En effet, bien que non significatives, les activités diurne et nocturne sont respectivement augmentées de 400% et de 150% comparées aux niveaux d'activité de base, chez le groupe ayant subi le maximum de saignées. Ces résultats suggèrent qu'une altération constitutive du comportement locomoteur est concomitante à une augmentation des taux de dopamine extracellulaire. De plus, nos résultats ont permis d'établir une relation significative entre l'augmentation de dopamine tissulaire et l'activité locomotrice nocturne. Ceci est renforcé par la relation entre la diminution du ratio (DOPAC+HVA)/DA qui diminue avec l'augmentation de l'activité nocturne. De la même manière, les taux de L-DOPA diminuent conjointement à l'augmentation de l'activité nocturne. Finalement, nos résultats sont en faveur d'une augmentation globale de la synthèse et/ou d'une diminution de la dégradation tissulaire de

DA dans le putamen, ce qui expliquerait l'augmentation extracellulaire de DA et de DOPAC dans le putamen et par conséquent l'activation des structures motrices.

Ensemble, nos résultats mettent en évidence de nombreuses similitudes entre notre modèle expérimental et les principales altérations dopaminergiques striatales décrites chez le rongeur carencé en fer sérique, ainsi que dans la MWE.



**Figure 35** : Modélisation des mécanismes possibles induits par le PSR au niveau du striatum et impact sur le comportement locomoteur.

D2=récepteur dopaminergique de type D2 ; DAT=transporteur de la dopamine ; DDC=dopadécarboxylase ; Dopamine ; DOPAC= acide 3,4-dihydroxyphénylacetique ; Fe=fer ; Hgb= hémoglobine ; L-DOPA=3,4-dihydroxyphénylalanine ; O<sub>2</sub>=dioxygène ; PSR=protocole de saignées répétées ; TH=tyrosine hydroxylase.

## O. II. Modification du métabolisme dopaminergique extrastriatal

Nos résultats indiquent qu'outre le striatum, d'autres régions du SNC présentent une altération du métabolisme dopaminergique. En effet, nous avons observé des modifications significativement liées à l'augmentation des taux de fer du LCR au niveau du cortex préfrontal, ainsi que des cornes dorsale et ventrale de la moelle épinière. Nos résultats montrent une augmentation des taux de DA, confirmée par la diminution du ratio (DOPAC+HVA)/DA, en fonction de l'augmentation des taux de fer du LCR dans le cortex préfrontal de tous les groupes d'animaux ayant subi le PSR. Cette observation suggère qu'une altération du mécanisme de dégradation et/ou qu'une augmentation de la synthèse de DA au niveau du cortex préfrontal, conduirait à des taux anormalement élevés de DA et ce, dès la deuxième saignée.

Le cortex préfrontal est impliqué dans les processus cognitifs (Cools, 2011). Certains patients atteints de la MWE présentent des troubles cognitifs, qui ont au départ été associés aux problèmes de sommeil inhérents à la maladie, mais finalement attribués à un dysfonctionnement préfrontal (Pearson et al., 2006, Gamaldo et al., 2008). Ainsi, la modification du métabolisme dopaminergique observée dans le cortex préfrontal de nos animaux, pourrait participer à l'émergence des problèmes cognitifs décrits dans la MWE. Des tests comportementaux nous permettraient d'approfondir cette hypothèse. De plus, il a été montré que certains patients sont capables de contrôler leurs symptômes en s'engageant dans une activité mentale telle que les jeux vidéos ou les mots croisés (Silber et al., 2004). De même, une approche psycho-éducative de la MWE, sans traitement pharmacologiques, combinant plusieurs critères de thérapie cognitive incluant une thérapie pour les trouble du sommeil et la gestion des symptômes de la MWE, a reporté une amélioration significatives de la qualité de vie des patients jusqu'à 3 mois après l'arrêt de la thérapie (Hornyak et al., 2008, Pigeon and Yurcheshen, 2009). L'ensemble de ces observations souligne l'importance des aspects cognitifs dans les symptômes de la MWE.

Les résultats obtenus sur la moelle épinière sont intéressants puisque les dosages de la corne dorsale et de la corne ventrale présentent des résultats distincts et à la fois complémentaires. En effet, les mesures effectuées dans la corne dorsale de la moelle épinière mettent en évidence une diminution du ratio (DOPAC+HVA)/DA en fonction de l'augmentation des taux de fer du LCR, alors que celles effectuées dans la corne ventrale montrent une diminution des concentrations de L-DOPA. Ces deux observations suggèrent, une altération du mécanisme de dégradation dans la corne dorsale d'une part et une modification de la synthèse de dopamine dans la corne ventrale d'autre part.

Il a été décrit que la dopamine médullaire augmente pendant la réalisation du mouvement (Gerin and Privat, 1998). De plus, des travaux précédemment réalisés dans notre laboratoire ont mis en évidence que la zone diencephalique A11 serait la principale source de L-DOPA dans la moelle épinière du primate non humain (Barraud et al., 2010). Une hypothèse propose que la dopamine soit localement synthétisée au niveau de la moelle épinière. A ce niveau, la dopamine régulerait l'intégration sensorimotrice *via* les récepteurs de type D2/D3, c'est pourquoi l'altération de cette voie a été impliquée dans la physiopathologie de la MWE (Clemens et al., 2006, Barraud et al., 2010). De plus, une étude mesurant la réponse du réflexe fléchisseur de la moelle épinière, processus impliquant les mécanismes dopaminergiques, a montré une hyperexcitabilité médullaire chez les patients atteints de la MWE (Bara-Jimenez et al., 2000). Ainsi, l'altération du mécanisme de dégradation de la DA et la diminution de L-DOPA observées chez nos animaux corroboreraient l'exagération de l'excitabilité médullaire dans la physiopathologie de la MWE et offriraient une voie d'exploration de l'émergence des symptômes sensorimoteurs de la MWE.

Finalement, les modifications des ratios (DOPAC+HVA)/DA, DA/L-DOPA, ainsi que la diminution des taux de L-DOPA, et l'augmentation des taux de DA sont systématiquement significativement liées à la diminution des concentrations d'hémoglobine. Il apparaît ainsi que la diminution des taux d'hémoglobine reflète inversement toutes les relations établies entre les taux de fer dans la LCR et les changements monoaminergiques.

**Cette observation permet, d'établir une continuité pertinente entre les modifications des ratios de synthèse et de dégradation de la DA, les taux d'hémoglobine en périphérie et ceux du fer dans le LCR, suggérant que les taux d'hémoglobine, plutôt que ceux du fer et de la ferritine sériques, pourraient être avantageusement utilisés en routine médicale comme un indicateur des changements au niveau du SNC.**

### O. III. Le PSR modifie le métabolisme sérotoninergique

Des cas de MWE induits ou aggravés par des antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine suggèrent que la fonction sérotoninergique pourrait être impliquée dans la physiopathologie de la MWE (Page et al., 2008, Rottach et al., 2008, Hoque and Chesson, 2010).

En plus de l'altération provoquée sur le système dopaminergique, la déplétion en fer sérique induite lors des saignées, a également modifié le système sérotoninergique. En effet, nos

résultats indiquent que les taux extracellulaires de l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) sont significativement augmentés dans le putamen des animaux ayant subi le maximum de saignées. Cette observation est cohérente avec les résultats de la littérature, décrivant une augmentation des taux extracellulaires de 30% pour le 5-HIAA dans le striatum de rat carencé en fer (Chen, 1995). Bien qu'elle ne soit pas significative, nous avons également observé une augmentation de 151,4% des taux extracellulaires de 5-HT dans le putamen chez ces mêmes animaux.

Comme décrit plus haut pour les taux de DA et de DOPAC, là encore, ce sont les animaux qui ont subi le maximum de saignées qui présentent les taux extracellulaires de 5-HT et de 5-HIAA les plus élevés. Néanmoins, il est intéressant de constater que le profil d'augmentation des taux extracellulaires de sérotonine et de 5-HIAA est progressif, contrairement aux variations brutales observées pour la DA et le DOPAC. Les concentrations de 5-HIAA, notamment, présentent une augmentation de +23,7% des taux de base après 6 saignées, significativement différente des valeurs obtenues après 4 saignées, puis une hausse de +99,9% des taux de base après 8 saignées. Cette observation suggère que le métabolisme sérotoninergique serait plus sensible à une modification de l'homéostasie du fer, et répondrait plus rapidement (par un mécanisme d'adaptation) que le système dopaminergique à des niveaux de fer croissant et anormalement élevés dans le LCR.

Par ailleurs, les dosages tissulaires ont mis en évidence qu'une relation significative entre la modification des concentrations de 5-HT et l'augmentation des taux de fer dans le LCR s'étendait à différentes régions du SNC. En effet, l'augmentation des taux de fer dans le LCR est concomitante à une diminution des concentrations de 5-HT dans le noyau caudé, le putamen, la substance noire, ainsi que dans la corne ventrale de la moelle épinière. Ces résultats sont en accord avec les études montrant une diminution des taux de 5-HT dans le cerveau des rats carencés en fer (Green and Youdim, 1977). De manière intéressante, seule la corne dorsale de la moelle épinière présente une variation inverse, avec des concentrations de sérotonine qui augmentent en fonction de l'augmentation des taux de fer dans le LCR.

La substance noire est la structure du cerveau qui reçoit le plus d'afférences sérotoninergiques provenant du noyau du raphé. En projetant sur la SN réticulée, les terminaisons sérotoninergiques modulent l'activité dopaminergique striatale (Parent et al., 2011). Une étude pharmacologique a montré que les agonistes sérotoninergiques diminuent la synthèse de DA dans le striatum (Spampinato et al., 1985). De plus, les fibres sérotoninergiques projettent également sur le noyau caudé et peuvent affecter le

métabolisme et la libération de dopamine localement (Navailles and De Deurwaerdere, 2011). Ainsi, la diminution des taux de sérotonine observée dans le noyau caudé et le putamen, pourrait expliquer l'augmentation de la dopamine chez les animaux ayant subi le maximum de saignées.

En outre, les concentrations de 5-HIAA dans le putamen augmentent, alors que ceux de 5-HT diminuent avec la hausse des taux de fer dans le LCR, suggérant une augmentation de la dégradation de la sérotonine dans cette structure. Il a été décrit que la sérotonine pouvait moduler l'activité des neurones dopaminergiques projetant dans le striatum (Mathur and Lovinger, 2012). En effet, elle jouerait un rôle dans la sélection de l'action ainsi que dans le contrôle du mouvement (Parent et al., 2011). Ainsi, les altérations du métabolisme sérotoninergique observées dans le striatum de nos animaux, pourraient expliquer en partie les symptômes sensorimoteurs de la MWE.

De plus, les concentrations de 5-HIAA et de 5-HT diminuent avec l'augmentation du fer dans le LCR dans la corne ventrale de la moelle épinière, suggérant un défaut de synthèse à ce niveau. Les voies sérotoninergiques descendantes dans la corne ventrale de la moelle épinière ont été impliquées dans le contrôle de la locomotion, en modulant notamment l'activité des motoneurones (Forrest et al., 1996, Gerin and Privat, 1998).

En revanche, les concentrations de 5-HIAA et de 5-HT augmentent dans la corne dorsale de la moelle épinière, suggérant cette fois une activation de la synthèse de sérotonine. Il a été décrit que les neurones sérotoninergiques de la corne dorsale de la moelle épinière étaient impliqués dans le contrôle de la nociception (Millan, 2002, Yoshimura and Furue, 2006, Benarroch, 2008). Le fait que la sérotonine médullaire soit impliquée dans le contrôle du mouvement et de la nociception, et que son métabolisme soit altéré par les modifications des taux de fer, il est dès lors cohérent qu'elle joue un rôle tout aussi important que la dopamine dans la manifestation des symptômes de la MWE.

En effet, la littérature reporte que les antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) seraient associés à l'expression de la MWE soit en déclenchant des symptômes chez les sujets sains, soit en aggravant ceux préexistants chez les patients atteints de la MWE (Rottach et al., 2008). En revanche, une étude a reporté une amélioration des symptômes moteurs chez 70% des patients traités avec des ISRS (Dimmitt and Riley, 2000). Ainsi, l'hétérogénéité des résultats et le manque de travaux visant à expliquer ces mécanismes ne permettent pas de conclure sur le rôle de la sérotonine dans la MWE. Néanmoins il est possible que dans le cadre d'un traitement par les ISRS, ceux-ci aggravent les symptômes de la MWE non pas en contrôlant la sécrétion de la DA mais indirectement, en augmentant la neurotransmission sérotoninergique. En effet, la sérotonine produite dans

le raphé dorsal joue un rôle critique dans la modulation des neurones sensorimoteurs de la moelle épinière (Gebhart, 2004, Hentall and Burns, 2009). Or il a été montré que l'expression du transporteur de la sérotonine (SERT) diminue avec l'augmentation de symptômes de la MWE. En outre, les modèles de carence en fer rongeur ont rapporté une diminution de l'expression du SERT et de 5-HT, Ainsi, les taux d'expression du SERT pourraient influencer la sévérité de la MWE, pas uniquement en modulant la régulation dopaminergique au niveau du striatum *via* le raphé rostral mais de manière alternative, en modulant directement l'activité des neurones moteurs et/ou sensoriels de la moelle épinière (Jhoo et al., 2010).

Enfin, l'ensemble des résultats montrent que notre protocole de déplétion est efficace pour provoquer une diminution des niveaux sériques de fer et des protéines associées au bout de 2 à 4 saignées, ainsi que pour modifier significativement les métabolismes monoaminergiques à moyen terme. Bien que des expériences complémentaires doivent être réalisées, ce travail original offre des premiers résultats prometteurs.

**En effet, notre modèle expérimental présente les principales altérations neurochimiques et comportementales décrites dans la MWE et pourrait ainsi être utile à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la MWE.**

## **P. Perspectives**

Nos résultats concernant les variations journalières des taux de fer et de protéines associées chez le macaque naïf, pourraient être complétés sur un plus grand nombre d'animaux, par des dosages des taux de fer, de L-DOPA, de DA et de ses métabolites à heures variables dans le LCR, chez les animaux naïfs ainsi qu'au cours du PSR. Ceci permettrait de savoir si l'on retrouve i) les variations journalières de ces paramètres chez les animaux ayant subi le PSR, ii) les modifications comportementales diurnes et nocturnes. Ensemble, cela permettrait d'étudier l'hypothèse imputant les périodes de manifestation des symptômes aux variations circadiennes du fer et de la DA chez les patients atteints de la MWE (Earley et al., 2006a, Baier and Trenkwalder, 2007).

De plus, il serait intéressant de tester l'impact du PSR sur le long terme, afin d'étudier à quel point la déplétion en fer modifie le métabolisme dopaminergique et si une supplémentation en fer pourrait rétablir l'homéostasie du métabolisme dopaminergique, ainsi que le comportement locomoteur.

Alors que les traitements par agonistes des récepteurs D2/D3 administrés aux patients atteints de la MWE réduisent les symptômes moteurs, ils ne semblent pas avoir d'effet sur les perturbations du sommeil nocturne et peuvent dans certains cas engendrer une hypersomnie (Kumru et al., 2008, Silber, 2013). Aussi, notre modèle expérimental validerait sa cohérence clinique en testant l'impact des agonistes dopaminergiques D2/D3, à la fois sur l'activité locomotrice ainsi que sur les paramètres du sommeil.

## **Impact des agonistes dopaminergiques sur le cycle veille-sommeil dans un modèle macaque de la maladie de Parkinson.**

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact des agonistes dopaminergiques sur le cycle veille-sommeil, dans un modèle expérimental de la maladie de Parkinson. Nous avons tiré profit du modèle macaque intoxiqué au MPTP, dont la symptomatologie est proche de celle des patients parkinsoniens, aussi bien sur le plan moteur que non moteur, pour tester notre hypothèse (Bezard et al., 2001, Barraud et al., 2009, Tass et al., 2012). Les travaux précédemment réalisés dans notre laboratoire ont permis de développer et de valider l'utilisation de ce modèle pour l'étude des troubles du sommeil dans la MP (Barraud et al., 2009). Ainsi, cette partie du projet de recherche s'inscrit dans la continuité des travaux initiés ultérieurement et apporte des résultats pharmacologiques originaux, avec un potentiel clinique prometteur.

### **Q. Altération des paramètres veille-sommeil chez le macaque intoxiqué au MPTP**

Tout d'abord, cette étude nous a permis de confirmer l'altération des cycles veille-sommeil chez le macaque intoxiqué au MPTP contribuant ainsi à asseoir la validité de ce modèle pour l'étude des modifications des cycles veille-sommeil dans les syndromes parkinsoniens (Barraud et al., 2009). Nos résultats retrouvent une suppression du sommeil paradoxal (SP) dès la première injection de MPTP, ainsi que l'apparition rapide de somnolence diurne excessive (SDE) et ce, avant la dégradation des capacités motrices, comme précédemment rapporté (Barraud et al., 2009).

De même, plusieurs mois après l'adaptation aux symptômes moteurs, les enregistrements électroencéphalographiques ont montré que la SDE persistait et que le SP, bien qu'amélioré, restait significativement quantitativement diminué chez les animaux présentant un état parkinsonien chronique. Cela nous a permis par la suite, de tester l'impact d'agonistes dopaminergiques sélectifs des récepteurs de types D1 (SKF38393) et D2 (quinpirole) chez ces animaux.

## **R. Effet des agonistes des récepteurs dopaminergiques**

### **R. I. Inefficacité du quinpirole dans l'amélioration des troubles veille-sommeil**

Les récepteurs des agonistes de type D2 jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'éveil et du SP. Cependant, les études menées chez le rongeur sain (Lima et al., 2008, Qu et al., 2010) et narcoleptique (Burgess et al., 2010) rapportent des résultats hétérogènes quant à l'action des agonistes des récepteurs de type D2. En effet, l'administration aiguë d'agonistes des récepteurs de type D2 présente un effet biphasique puisque de faibles doses de quinpirole diminuent l'éveil et augmentent le SP alors que des résultats opposés sont reportés pour des doses élevées (Monti et al., 1989). Les études sur les troubles du sommeil relatifs à un syndrome parkinsonien ont montré une augmentation de l'éveil (Wisor et al., 2001) ainsi que l'induction du SP (Dzirasa et al., 2006) chez des souris déficientes pour le transporteur de la DA. Des résultats contradictoires ont cependant été observés chez des souris intoxiquées au MPTP (Laloux et al., 2008a).

Les agonistes des récepteurs D2/D3 permettent l'amélioration des symptômes moteurs de la MP (Parkinson-Study-Group, 2000, 2009). Cependant, des études ont montré leur implication dans l'aggravation des troubles du sommeil chez les patients parkinsoniens (Homann et al., 2002). En effet, les patients traités avec des agonistes D2/D3 présentent des attaques de sommeil incontrôlées et irrésistibles en journée (Frucht et al., 1999). De plus, il semblerait que ce type de traitement ne montre pas d'amélioration efficace chez les patients présentant des troubles du comportement du SP (Kumru et al., 2008). De manière cohérente, nos résultats ont montré que l'administration de quinpirole ne permet pas de diminuer la somnolence diurne, ni de restaurer le SP (non associé aux troubles du comportement du SP) chez nos animaux.

### **R. II. Effet bénéfiques du SKF38393 sur les troubles veille-sommeil**

En revanche, le traitement au SKF38393 sur cinq jours consécutifs, a considérablement amélioré ces deux paramètres. En effet, la diminution de la SDE par le traitement au SKF38393 observé chez nos animaux, est cohérente avec les études menées chez les rats sains et narcoleptiques, montrant que les agonistes des récepteurs D1 ont la capacité de promouvoir l'éveil (Ongini et al., 1985, Burgess et al., 2010). Tandis que les études menées chez le rongeur naïf ont décrit que les injections systémiques d'agonistes D1

réduisent la proportion de SP (Trampus et al., 1993, Monti and Monti, 2007), nos résultats ont mis en évidence pour la première fois une restauration significative du SP chez les animaux présentant un état parkinsonien chronique.

L'ensemble de ces observations confèrent aux agonistes des récepteurs D1 un potentiel à restaurer l'architecture du sommeil chez les singes intoxiqués au MPTP.

Les agonistes D1 permettent une amélioration des symptômes moteurs supérieure à celle des agonistes des récepteurs D2/D3 et comparable à celle de la L-DOPA. Cependant, une étude clinique a reporté que comme la L-DOPA, cette catégorie de traitement possède un effet pro-dyskinétique (Rascol et al., 2001). En effet, les travaux au sein du laboratoire ont permis de mettre en évidence le rôle clef des récepteurs D1, dans l'apparition des dyskinésies (Aubert et al., 2005, Berthet et al., 2009).

**Ainsi, des études complémentaires seraient nécessaires pour évaluer les doses auxquelles un traitement par ce type d'agoniste permettrait de bénéficier d'une amélioration optimale des troubles de veille-sommeil chez les animaux présentant un syndrome parkinsonien chronique, sans entraîner de dyskinésie sur le long terme.**

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que la lésion du système dopaminergique par le MPTP altérerait les voies de régulation du sommeil paradoxal mettant en jeu les récepteurs D1. En effet, il a été montré que les récepteurs D1 sont présents au niveau de l'hypothalamus latéral et que leur action diminue l'activité des neurones à hormone concentrant la mélanine (MCH), neuropeptide indispensable notamment, dans l'induction et le maintien de l'état de sommeil (Conductier et al., 2011, Luppi et al., 2013). De plus, il a été décrit que la MCH joue un rôle clef dans l'homéostasie du sommeil paradoxal (Peyron et al., 2009). Des comptages stéréologiques réalisés sur nos animaux intoxiqués au MPTP n'ont pas révélé la perte des neurones à MCH, au niveau antérieur et postérieur de l'hypothalamus latéral (observations non publiées), alors que les neurones dopaminergiques de la substance noire sont fortement diminués chez ces mêmes animaux (Barraud et al., 2009). Ainsi, une hypothèse serait que l'amélioration de la somnolence diurne et la restauration du SP observée pendant le traitement au SKF38393 soit due à son action sur les neurones à MCH.

Finally, our results demonstrate a dichotomy of the effect of agonists of dopamine receptors of type D1 and D2 on the parameters of wakefulness and sleep in animals with chronic parkinsonian syndrome. In fact, the D2 receptor agonist does not show improvement in sleep disorders, while the D1 receptor agonist effectively restores these parameters, thus opening new perspectives in the search for treatments aimed at improving the management of sleep-wake disorders in MP.

## **S. Perspectives**

A study conducted in rodents recently validated that MCH neurons in the lateral hypothalamus can be specifically stimulated by the technique of optogenetics (Konadhode et al., 2013). Thus, it would be interesting to test whether the stimulation of MCH neurons, using optogenetics, provokes the appearance of paradoxical sleep in animals intoxicated with MPTP.

Moreover, orexin is a neuropeptide also produced in the lateral hypothalamus, involved among others in the cessation of SP, the induction and the maintenance of wakefulness, notably through its action on MCH neurons (Gao, 2009, Luppi et al., 2013). Moreover, it has recently been described that intranasal injections of orexin A reduce the episodes of sleep onset in people with narcolepsy (Baier et al., 2011). Thus, it would be interesting to test the wakefulness potential of orexin by a selective optogenetic stimulation of orexin cells, in animals with excessive daytime sleepiness induced by MPTP intoxication (Adamantidis et al., 2007). These two experiences conducted in parallel, would allow to identify which of these two factors would be sensitive to the modifications generated by MPTP intoxication.

## **T. Perspectives translationnelles**

Par ailleurs, nos résultats montrent une augmentation de l'activité locomotrice, en particulier nocturne, chez les animaux ayant subi le maximum de saignées, contrairement aux animaux intoxiqués au MPTP dont l'activité locomotrice est réduite en raison de la dénervation dopaminergique (Bezard et al., 2001). Ainsi, il semblerait que les modifications comportementales varient suivant les taux de dopamine dans chacun des deux modèles d'étude. Ensemble, les observations sont cohérentes avec les symptômes retrouvés soit dans la MWE, soit dans la MP (Ehringer and Hornykiewicz, 1960, Barriere et al., 2005).

L'hypothalamus est une structure clef dans la régulation des cycles veille-sommeil qui s'effectue notamment par les cellules à orexine et à MCH, respectivement impliquées dans l'induction et le maintien soit de la veille soit du sommeil (Conductier et al., 2011). Une étude récente a montré que la dopamine diminue globalement l'activité des neurones MCH *via* les récepteurs de types D1 et D2, mais aussi en se fixant sur les récepteurs noradrénergiques (Conductier et al., 2011). Ainsi, il serait intéressant de comparer l'expression des récepteurs de type D1 et D2 dans l'hypothalamus latéral des singes ayant subi le protocole de saignées, à ceux des singes intoxiqués au MPTP. De même, des dosages des concentrations de MCH et d'orexine dans l'hypothalamus latéral permettraient de comparer les taux de ces neuropeptides entre les animaux ayant subi le protocole de saignées et ceux intoxiqués au MPTP. La diminution de l'activité des neurones impliqués dans l'induction et le maintien du sommeil pourrait être une piste pour expliquer les difficultés d'endormissement et le phénomène d'insomnie observés chez les patients atteints de la MWE (Ekblom, 1945, Allen et al., 2005).

Par ailleurs, les marquages pour le fer et ses biomarqueurs sont diminués dans la substance noire et le putamen issus de patients atteints de la MWE (Burdo and Connor, 2003). A l'inverse, des analyses anatomopathologiques ont rapporté la présence de dépôts de fer dans la substance noire, le striatum et les cellules contenant de la neuromélanine, issus de patients parkinsoniens (Faucheux et al., 2002, Faucheux et al., 2003). Ainsi, des analyses histologiques comparées de la SNc et du striatum devront être réalisées afin de comparer le profil de marquage du fer et les niveaux d'expression de ses biomarqueurs, chez les animaux ayant subi le protocole de saignées, à ceux des animaux intoxiqués au MPTP. Cela nous permettrait de savoir si l'on retrouve pour chaque modèle d'étude

respectif, la topographie des modifications des niveaux de fer décrite chez les patients atteints de ces deux maladies.

Finalement, il a été reporté que la prévalence de la MWE varie de 3% à 14% dans la population des patients parkinsonniens (Kumar et al., 2002, Loo and Tan, 2008). Ainsi, il serait intéressant de réaliser une étude transversale visant à évaluer l'apparition des symptômes parkinsonniens chez les animaux ayant subi le protocole de saignées. Pour cela, il serait possible de tester l'influence d'une intoxication au MPTP à faible dose sur un groupe d'animaux ayant subi un nombre suffisant de saignées pour présenter les caractéristiques d'une carence martiale et de comparer l'apparition des symptômes parkinsonniens à ceux d'un groupe d'animaux traités au MPTP uniquement. Conjointement à l'évaluation de l'apparition des symptômes moteurs et non moteurs caractérisant l'établissement d'un syndrome parkinsonien, il serait intéressant d'effectuer des dosages *in vivo* des monoamines par microdialyse. Cela permettrait de savoir si les animaux ayant subi le protocole de saignées sont plus sensibles à l'intoxication au MPTP et renseignerait sur les mécanismes qui seraient prioritairement dérégulés dans le cadre de ces deux maladies. Il s'agirait alors d'une opportunité de savoir si la MWE pourrait être un facteur de risque ou une conséquence de la maladie de Parkinson.

# **CONCLUSION GENERALE**

## **Conclusion générale**

Finalement, à travers ce projet de thèse nous avons pu évaluer l'implication de la dopamine dans deux pathologies présentant des altérations du repos.

La neurophysiologie et les mécanismes biochimiques de la MWE ont été peu étudiés à ce jour, notamment du fait de la nature subjective de cette maladie, rendant difficile la modélisation de ces symptômes (Ghorayeb and Bezard, 2012). Ainsi, les paramètres caractéristiques de la MWE principalement mesurés sont les mouvements périodiques du sommeil et les seuls modèles actuels sont réalisés chez le rongeur. Parmi eux on trouve des approches pharmacologiques (Teicher et al., 1995) et génétiques (Clemens and Hochman, 2004, Clemens et al., 2005). D'autres modèles, basés sur les hypothèses impliquant un dysfonctionnement du métabolisme dopaminergique au niveau de la voie diencephalospinale A11, proposent une approche lésionnelle de cette voie, seule ou combinée à une carence en fer (Ondo et al., 2000, Qu et al., 2007, Zhao et al., 2007, Lopes et al., 2012). Bien que ces modèles montrent une bonne validité prédictive, telle que la réponse aux traitements, ils ne dérivent pas de causes connues chez l'humain.

Ainsi, l'originalité de notre étude consiste en un protocole expérimental basé sur une étiologie proposée dans le développement de la MWE, (Sun et al., 1998, Mizuno et al., 2005, Allen and Earley, 2007). De plus, l'induction d'une carence en fer nous a permis de mettre en évidence une dérégulation des systèmes monoaminergiques dans des structures clés impliquées dans la motricité et la somesthésie, ainsi que du comportement locomoteur. L'ensemble de nos résultats renforce l'idée d'un lien causale entre ces paramètres dans la symptomatologie de la MWE.

Le deuxième aspect de ce projet a bénéficié de la grande similitude entre la symptomatologie du modèle primate non humain de la MP, avec celle de la maladie humaine. Ainsi, l'expertise confirmée de notre laboratoire dans l'utilisation de ce modèle, nous a permis d'approfondir l'étude de la dérégulation des cycles veille-sommeil et de mettre en évidence le potentiel bénéfique d'un agoniste dopaminergique de type D1 sur la dérégulation des paramètres du repos.

**En conclusion, la validation de notre modèle d'étude par la réalisation des expériences complémentaires proposées pourrait conduire à un modèle de primate non humain de la MWE. Au même titre que le modèle primate de la MP, un tel outil serait d'un intérêt majeur à la fois pour explorer de manière plus approfondie les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la MWE mais également pour explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans une maladie qui en manque, et de manière importante, pour rationaliser le traitement actuellement empirique de cette maladie.**

# **BIBLIOGRAPHIE**

## RÉFÉRENCES

- Abbott RD, Ross GW, White LR, Tanner CM, Masaki KH, Nelson JS, Curb JD, Petrovitch H (2005) Excessive daytime sleepiness and subsequent development of Parkinson disease. *Neurology* 65:1442-1446.
- Aboud S, Haile DJ (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 275:19906-19912.
- Abetz L, Allen R, Follet A, Washburn T, Earley C, Kirsch J, Knight H (2004) Evaluating the quality of life of patients with restless legs syndrome. *Clin Ther* 26:925-935.
- Accili D, Fishburn CS, Drago J, Steiner H, Lachowicz JE, Park BH, Gauda EB, Lee EJ, Cool MH, Sibley DR, Gerfen CR, Westphal H, Fuchs S (1996) A targeted mutation of the D3 dopamine receptor gene is associated with hyperactivity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1945-1949.
- Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450:420-424.
- Aime S, Bergamasco B, Biglino D, Digilio G, Fasano M, Giamello E, Lopiano L (1997) EPR investigations of the iron domain in neuromelanin. *Biochim Biophys Acta* 1361:49-58.
- Akpinar S (1982) Treatment of restless legs syndrome with levodopa plus benserazide. *Arch Neurol* 39:739.
- Ali NJ, Davies RJ, Fleetham JA, Stradling JR (1991) Periodic movements of the legs during sleep associated with rises in systemic blood pressure. *Sleep* 14:163-165.
- Allen RP (2002) Race, iron status and restless legs syndrome. *Sleep medicine* 3:467-468.
- Allen RP, Earley CJ (1996) Augmentation of the restless legs syndrome with carbidopa/levodopa. *Sleep* 19:205-213.
- Allen RP, Earley CJ (2000) Defining the phenotype of the restless legs syndrome (RLS) using age-of-symptom-onset. *Sleep medicine* 1:11-19.
- Allen RP, Earley CJ (2007) The role of iron in restless legs syndrome. *Mov Disord* 22 Suppl 18:S440-448.
- Allen RP, Kushida CA, Atkinson MJ (2003a) Factor analysis of the International Restless Legs Syndrome Study Group's scale for restless legs severity. *Sleep medicine* 4:133-135.
- Allen RP, Picchiatti D, Hening WA, Trenkwalder C, Walters AS, Montplaisir J (2003b) Restless legs syndrome: diagnostic criteria, special considerations, and epidemiology. A report from the restless legs syndrome diagnosis and epidemiology workshop at the National Institutes of Health. *Sleep medicine* 4:101-119.
- Allen RP, Walters AS, Montplaisir J, Hening W, Myers A, Bell TJ, Ferini-Strambi L (2005) Restless legs syndrome prevalence and impact: REST general population study. *Arch Intern Med* 165:1286-1292.
- Almirall H, Pigarev I, de la Calzada MD, Pigareva M, Herrero MT, Sagales T (1999) Nocturnal sleep structure and temperature slope in MPTP treated monkeys. *J Neural Transm* 106:1125-1134.
- Ancoli-Israel S, Kripke DF, Klauber MR, Mason WJ, Fell R, Kaplan O (1991) Periodic limb movements in sleep in community-dwelling elderly. *Sleep* 14:496-500.
- Anden NE, Magnusson T, Rosengren E (1964) On the presence of dihydroxyphenylalanine decarboxylase in nerves. *Experientia* 20:328-329.
- Andreu N, Chale JJ, Senard JM, Thalamas C, Montastruc JL, Rascol O (1999) L-Dopa-induced sedation: a double-blind cross-over controlled study versus triazolam and placebo in healthy volunteers. *Clinical neuropharmacology* 22:15-23.

- Andrews NC (1999) Disorders of iron metabolism. *The New England journal of medicine* 341:1986-1995.
- Antonini A, Landi A, Mariani C, DeNotaris R, Pezzoli G (2004) Deep brain stimulation and its effect on sleep in Parkinson's disease. *Sleep medicine* 5:211-214.
- Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P (2009) Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta* 1790:589-599.
- Aruoma OI, Halliwell B, Laughton MJ, Quinlan GJ, Gutteridge JM (1989) The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. *Biochem J* 258:617-620.
- Aserinsky E, Kleitman N (1953) Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118:273-274.
- Ashkenazi R, Ben-Shachar D, Youdim MB (1982) Nutritional iron and dopamine binding sites in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 17 Suppl 1:43-47.
- Askenasy JJ (2003) Sleep disturbances in Parkinsonism. *J Neural Transm* 110:125-150.
- Askenasy JJ, Yahr MD (1985) Reversal of sleep disturbance in Parkinson's disease by antiparkinsonian therapy: a preliminary study. *Neurology* 35:527-532.
- Aston-Jones G, Bloom FE (1981) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1:876-886.
- Atamna H, Killilea DW, Killilea AN, Ames BN (2002a) Heme deficiency may be a factor in the mitochondrial and neuronal decay of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14807-14812.
- Atamna H, Walter PB, Ames BN (2002b) The role of heme and iron-sulfur clusters in mitochondrial biogenesis, maintenance, and decay with age. *Arch Biochem Biophys* 397:345-353.
- Aubert I, Guigoni C, Hakansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N, Bioulac BH, Gross CE, Fisone G, Bloch B, Bezard E (2005) Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Annals of neurology* 57:17-26.
- Baier PC, Hallschmid M, Seeck-Hirschner M, Weinhold SL, Burkert S, Diessner N, Goder R, Aldenhoff JB, Hinze-Selch D (2011) Effects of intranasal hypocretin-1 (orexin A) on sleep in narcolepsy with cataplexy. *Sleep medicine* 12:941-946.
- Baier PC, Trenkwalder C (2007) Circadian variation in restless legs syndrome. *Sleep medicine* 8:645-650.
- Baier PC, Winkelmann J, Hohne A, Lancel M, Trenkwalder C (2002) Assessment of spontaneously occurring periodic limb movements in sleep in the rat. *J Neurol Sci* 198:71-77.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16:1-13.
- Balzamo E, Santucci V, Seri B, Vuillon-Cacciuttolo G, Bert J (1977) Nonhuman primates: laboratory animals of choice for neurophysiologic studies of sleep. *Lab Anim Sci* 27:879-886.
- Bara-Jimenez W, Aksu M, Graham B, Sato S, Hallett M (2000) Periodic limb movements in sleep: state-dependent excitability of the spinal flexor reflex. *Neurology* 54:1609-1616.
- Bargiello TA, Young MW (1984) Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2142-2146.
- Barraud Q, Lambrecq V, Forni C, McGuire S, Hill M, Bioulac B, Balzamo E, Bezard E, Tison F, Ghorayeb I (2009) Sleep disorders in Parkinson's disease: the contribution of the MPTP non-human primate model. *Exp Neurol* 219:574-582.
- Barraud Q, Obeid I, Aubert I, Barriere G, Contamin H, McGuire S, Ravenscroft P, Porras G, Tison F, Bezard E, Ghorayeb I (2010) Neuroanatomical study of the A11 diencephalospinal pathway in the non-human primate. *PLoS one* 5:e13306.
- Barriere G, Cazalets JR, Bioulac B, Tison F, Ghorayeb I (2005) The restless legs syndrome. *Prog Neurobiol* 77:139-165.

- Barton JC, Wooten VD, Acton RT (2001) Hemochromatosis and iron therapy of Restless Legs Syndrome. *Sleep medicine* 2:249-251.
- Beard J (2003) Iron deficiency alters brain development and functioning. *J Nutr* 133:1468S-1472S.
- Beard JL, Chen Q, Connor J, Jones BC (1994) Altered monamine metabolism in caudate-putamen of iron-deficient rats. *Pharmacol Biochem Behav* 48:621-624.
- Beard JL, Connor JR (2003) Iron status and neural functioning. *Annu Rev Nutr* 23:41-58.
- Beinert H (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Biol Inorg Chem* 5:2-15.
- Ben-Shachar D, Ashkenazi R, Youdim MB (1986) Long-term consequence of early iron-deficiency on dopaminergic neurotransmission in rats. *Int J Dev Neurosci* 4:81-88.
- Ben-Shachar D, Finberg JP, Youdim MB (1985) Effect of iron chelators on dopamine D2 receptors. *J Neurochem* 45:999-1005.
- Ben-Shachar D, Youdim MB (1991) Intranigral iron injection induces behavioral and biochemical "parkinsonism" in rats. *J Neurochem* 57:2133-2135.
- Benarroch EE (2008) Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. *Neurology* 71:217-221.
- Benazzouz A, Gross C, Feger J, Boraud T, Bioulac B (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci* 5:382-389.
- Benecke R, Strumper P, Weiss H (1993) Electron transfer complexes I and IV of platelets are abnormal in Parkinson's disease but normal in Parkinson-plus syndromes. *Brain* 116 (Pt 6):1451-1463.
- Berg D, Roggendorf W, Schroder U, Klein R, Tatschner T, Benz P, Tucha O, Preier M, Lange KW, Reiners K, Gerlach M, Becker G (2002) Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury. *Arch Neurol* 59:999-1005.
- Berger H (1929) Über das Elektronkephalogramm. *Arch Psychiat Nervenkrank* 87:527-570.
- Berger K, Luedemann J, Trenkwalder C, John U, Kessler C (2004) Sex and the risk of restless legs syndrome in the general population. *Arch Intern Med* 164:196-202.
- Bergman H, Raz A, Feingold A, Nini A, Nelken I, Hansel D, Ben-Pazi H, Reches A (1998) Physiology of MPTP tremor. *Mov Disord* 13 Suppl 3:29-34.
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249:1436-1438.
- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 72:507-520.
- Berthet A, Porras G, Doudnikoff E, Stark H, Cador M, Bezard E, Bloch B (2009) Pharmacological analysis demonstrates dramatic alteration of D1 dopamine receptor neuronal distribution in the rat analog of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* 29:4829-4835.
- Berton O, Guigoni C, Li Q, Bioulac BH, Aubert I, Gross CE, Dileone RJ, Nestler EJ, Bezard E (2009) Striatal overexpression of DeltaJunD resets L-DOPA-induced dyskinesia in a primate model of Parkinson disease. *Biol Psychiatry* 66:554-561.
- Bezard E, Dovero S, Prunier C, Ravenscroft P, Chalon S, Guilloteau D, Crossman AR, Bioulac B, Brotchie JM, Gross CE (2001) Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21:6853-6861.
- Bezard E, Gerlach I, Moratalla R, Gross CE, Jork R (2006) 5-HT1A receptor agonist-mediated protection from MPTP toxicity in mouse and macaque models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 23:77-86.
- Birkmayer W, Hornykiewicz O (1961) [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. *Wien Klin Wochenschr* 73:787-788.
- Blaschko H (1939) The specific action of L-dopa decarboxylase. *J Physiol* 96:50-51.

- Bloem BR (1992) Postural instability in Parkinson's disease. *Clinical neurology and neurosurgery* 94 Suppl:S41-45.
- Boissard R, Fort P, Gervasoni D, Barbagli B, Luppi PH (2003) Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *Eur J Neurosci* 18:1627-1639.
- Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi PH (2002) The rat pontomedullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci* 16:1959-1973.
- Bonuccelli U, Lucetti C, Del Dotto P, Ceravolo R, Gambaccini G, Bernardini S, Rossi G, Piaggese A (2003) Orthostatic hypotension in de novo Parkinson disease. *Arch Neurol* 60:1400-1404.
- Boraud T, Bezard E, Bioulac B, Gross CE (2001) Dopamine agonist-induced dyskinesias are correlated to both firing pattern and frequency alterations of pallidal neurones in the MPTP-treated monkey. *Brain* 124:546-557.
- Borel MJ, Smith SM, Derr J, Beard JL (1991) Day-to-day variation in iron-status indices in healthy men and women. *Am J Clin Nutr* 54:729-735.
- Boulet S, Mounayar S, Poupard A, Bertrand A, Jan C, Pessiglione M, Hirsch EC, Feuerstein C, Francois C, Feger J, Savasta M, Tremblay L (2008) Behavioral recovery in MPTP-treated monkeys: neurochemical mechanisms studied by intrastriatal microdialysis. *J Neurosci* 28:9575-9584.
- Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rub U (2002) Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *Journal of neurology* 249 Suppl 3:III/1-5.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197-211.
- Bradbury MW (1997) Transport of iron in the blood-brain-cerebrospinal fluid system. *J Neurochem* 69:443-454.
- Brightman MW, Klatzo I, Olsson Y, Reese TS (1970) The blood-brain barrier to proteins under normal and pathological conditions. *J Neurol Sci* 10:215-239.
- Brittenham GM (2011) Iron-chelating therapy for transfusional iron overload. *The New England journal of medicine* 364:146-156.
- Brodsky MA, Godbold J, Roth T, Olanow CW (2003) Sleepiness in Parkinson's disease: a controlled study. *Mov Disord* 18:668-672.
- Brown RG, Marsden CD (1990) Cognitive function in Parkinson's disease: from description to theory. *Trends Neurosci* 13:21-29.
- Burdo JR, Connor JR (2003) Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview. *Biometals* 16:63-75.
- Burgess CR, Tse G, Gillis L, Peever JH (2010) Dopaminergic regulation of sleep and cataplexy in a murine model of narcolepsy. *Sleep* 33:1295-1304.
- Burn J, Chinnery PF (2006) Neuroferritinopathy. *Semin Pediatr Neurol* 13:176-181.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1983) A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:4546-4550.
- Burris TP (2008) Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERBalpha and REV-ERBbeta are ligand-regulated components of the mammalian clock. *Mol Endocrinol* 22:1509-1520.
- Calzetti S, Negrotti A, Bonavina G, Angelini M, Marchesi E (2009) Absence of co-morbidity of Parkinson disease and restless legs syndrome: a case-control study in patients attending a movement disorders clinic. *Neurol Sci* 30:119-122.
- Camaschella C (2009) BMP6 orchestrates iron metabolism. *Nat Genet* 41:386-388.

- Carlsson A (1959) The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* 11:490-493.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180:1200.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B (1958) On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127:471.
- Carlsson A, Svennerholm L, Winblad B (1980) Seasonal and circadian monoamine variations in human brains examined post mortem. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 280:75-85.
- Cash R, Dennis T, L'Heureux R, Raisman R, Javoy-Agid F, Scatton B (1987) Parkinson's disease and dementia: norepinephrine and dopamine in locus ceruleus. *Neurology* 37:42-46.
- Castaneda TR, de Prado BM, Prieto D, Mora F (2004) Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. *J Pineal Res* 36:177-185.
- Castellani RJ, Siedlak SL, Perry G, Smith MA (2000) Sequestration of iron by Lewy bodies in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 100:111-114.
- Chaumette T, Lebouvier T, Aubert P, Lardeux B, Qin C, Li Q, Accary D, Bezard E, Bruley des Varannes S, Derkinderen P, Neunlist M (2009) Neurochemical plasticity in the enteric nervous system of a primate animal model of experimental Parkinsonism. *Neurogastroenterol Motil* 21:215-222.
- Chen QB, Jones BC. (1995) Abnormal rat brain monoamine metabolism in iron deficiency anemia. *J Nutr Biochem* 6:486-493.
- Chen W, Paradkar PN, Li L, Pierce EL, Langer NB, Takahashi-Makise N, Hyde BB, Shirihai OS, Ward DM, Kaplan J, Paw BH (2009) Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16263-16268.
- Chinnery PF, Curtis AR, Fey C, Coulthard A, Crompton D, Curtis A, Lombes A, Burn J (2003) Neuroferritinopathy in a French family with late onset dominant dystonia. *J Med Genet* 40:e69.
- Cho YW, Allen RP, Earley CJ (2013) Lower molecular weight intravenous iron dextran for restless legs syndrome. *Sleep medicine* 14:274-277.
- Chotinaiwattarakul W, Dayalu P, Chervin RD, Albin RL (2011) Risk of sleep-disordered breathing in Parkinson's disease. *Sleep & breathing = Schlaf & Atmung* 15:471-478.
- Chou TC, Bjorkum AA, Gaus SE, Lu J, Scammell TE, Saper CB (2002) Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *J Neurosci* 22:977-990.
- Chua AC, Graham RM, Trinder D, Olynyk JK (2007) The regulation of cellular iron metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci* 44:413-459.
- Cianchetti C, Masala C, Mangoni A, Gessa GL (1980) Suppression of REM and delta sleep by apomorphine in man: a dopamine mimetic effect. *Psychopharmacology (Berl)* 67:61-65.
- Clavadetscher SC, Gugger M, Bassetti CL (2004) Restless legs syndrome: clinical experience with long-term treatment. *Sleep medicine* 5:495-500.
- Clemens S, Hochman S (2004) Conversion of the modulatory actions of dopamine on spinal reflexes from depression to facilitation in D3 receptor knock-out mice. *J Neurosci* 24:11337-11345.
- Clemens S, Rye D, Hochman S (2006) Restless legs syndrome: revisiting the dopamine hypothesis from the spinal cord perspective. *Neurology* 67:125-130.
- Clemens S, Sawchuk MA, Hochman S (2005) Reversal of the circadian expression of tyrosine-hydroxylase but not nitric oxide synthase levels in the spinal cord of dopamine D3 receptor knockout mice. *Neuroscience* 133:353-357.
- Cohen LA, Gutierrez L, Weiss A, Leichtmann-Bardoogo Y, Zhang DL, Crooks DR, Sougrat R, Morgenstern A, Galy B, Hentze MW, Lazaro FJ, Rouault TA, Meyron-Holtz EG (2010) Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. *Blood* 116:1574-1584.

- Coldwell MC, Boyfield I, Brown T, Hagan JJ, Middlemiss DN (1999) Comparison of the functional potencies of ropinirole and other dopamine receptor agonists at human D2(long), D3 and D4.4 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol* 127:1696-1702.
- Comella CL (2007) Sleep disorders in Parkinson's disease: an overview. *Mov Disord* 22 Suppl 17:S367-373.
- Conductier G, Nahon JL, Guyon A (2011) Dopamine depresses melanin concentrating hormone neuronal activity through multiple effects on alpha2-noradrenergic, D1 and D2-like dopaminergic receptors. *Neuroscience* 178:89-100.
- Connor JR, Boyer PJ, Menzies SL, Dellinger B, Allen RP, Ondo WG, Earley CJ (2003) Neuropathological examination suggests impaired brain iron acquisition in restless legs syndrome. *Neurology* 61:304-309.
- Connor JR, Menzies SL, St Martin SM, Mufson EJ (1990) Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res* 27:595-611.
- Connor JR, Wang XS, Allen RP, Beard JL, Wiesinger JA, Felt BT, Earley CJ (2009) Altered dopaminergic profile in the putamen and substantia nigra in restless leg syndrome. *Brain* 132:2403-2412.
- Connor JR, Wang XS, Patton SM, Menzies SL, Troncoso JC, Earley CJ, Allen RP (2004) Decreased transferrin receptor expression by neuromelanin cells in restless legs syndrome. *Neurology* 62:1563-1567.
- Cools R (2011) Dopaminergic control of the striatum for high-level cognition. *Curr Opin Neurobiol* 21:402-407.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *The New England journal of medicine* 280:337-345.
- Cruchet R (1917) Quarante cas d'encephalomyélites subaigües. *Bull Mém Soc Med Hop Paris* 614-661.
- Cuenca N, Herrero MT, Angulo A, de Juan E, Martinez-Navarrete GC, Lopez S, Barcia C, Martin-Nieto J (2005) Morphological impairments in retinal neurons of the scotopic visual pathway in a monkey model of Parkinson's disease. *J Comp Neurol* 493:261-273.
- Dahan L, Astier B, Vautrelle N, Urbain N, Kocsis B, Chouvet G (2007) Prominent burst firing of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area during paradoxical sleep. *Neuropsychopharmacology* 32:1232-1241.
- Dahlstroem A, Fuxe K (1964) Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl SUPPL* 232:231-255.
- Dale JC, Burritt MF, Zinsmeister AR (2002) Diurnal variation of serum iron, iron-binding capacity, transferrin saturation, and ferritin levels. *Am J Clin Pathol* 117:802-808.
- Dallman PR, Spirito RA (1977) Brain iron in the rat: extremely slow turnover in normal rats may explain long-lasting effects of early iron deficiency. *J Nutr* 107:1075-1081.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999) The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 122 ( Pt 8):1437-1448.
- Dauer W, Przedborski S (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran JM, Alperovitch A, Rocca WA (1997) Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62:10-15.
- Dean T, Jr., Allen RP, O'Donnell CP, Earley CJ (2006) The effects of dietary iron deprivation on murine circadian sleep architecture. *Sleep medicine* 7:634-640.
- Decamp E, Schneider JS (2004) Attention and executive function deficits in chronic low-dose MPTP-treated non-human primates. *Eur J Neurosci* 20:1371-1378.

- Delwaide PJ, Sabbatino M, Delwaide C (1986) Some pathophysiological aspects of the parkinsonian rigidity. *Journal of neural transmission Supplementum* 22:129-139.
- Dement W, Kleitman N (1957a) Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 9:673-690.
- Dement W, Kleitman N (1957b) The relation of eye movements during sleep to dream activity: an objective method for the study of dreaming. *J Exp Psychol* 53:339-346.
- Dexter DT, Wells FR, Lees AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, Marsden CD (1989) Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52:1830-1836.
- Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, van de Vorstenbosch C (2001) A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 21:15-23.
- Dimmitt SB, Riley GJ (2000) Selective serotonin receptor uptake inhibitors can reduce restless legs symptoms. *Arch Intern Med* 160:712.
- Double KL, Ben-Shachar D, Youdim MB, Zecca L, Riederer P, Gerlach M (2002) Influence of neuromelanin on oxidative pathways within the human substantia nigra. *Neurotoxicol Teratol* 24:621-628.
- Double KL, Gerlach M, Schunemann V, Trautwein AX, Zecca L, Gallorini M, Youdim MB, Riederer P, Ben-Shachar D (2003) Iron-binding characteristics of neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochem Pharmacol* 66:489-494.
- Double KL, Gerlach M, Youdim MB, Riederer P (2000) Impaired iron homeostasis in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission Supplementum* 37-58.
- Doudet D, Gross C, Lebrun-Grandie P, Bioulac B (1985) MPTP primate model of Parkinson's disease: a mechanographic and electromyographic study. *Brain Res* 335:194-199.
- Dzirasa K, Ribeiro S, Costa R, Santos LM, Lin SC, Grosmark A, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG, Nicolelis MA (2006) Dopaminergic control of sleep-wake states. *J Neurosci* 26:10577-10589.
- Earley CJ, Connor JR, Beard JL, Clardy SL, Allen RP (2005) Ferritin levels in the cerebrospinal fluid and restless legs syndrome: effects of different clinical phenotypes. *Sleep* 28:1069-1075.
- Earley CJ, Connor JR, Beard JL, Malecki EA, Epstein DK, Allen RP (2000) Abnormalities in CSF concentrations of ferritin and transferrin in restless legs syndrome. *Neurology* 54:1698-1700.
- Earley CJ, Heckler D, Allen RP (2004) The treatment of restless legs syndrome with intravenous iron dextran. *Sleep medicine* 5:231-235.
- Earley CJ, Hyland K, Allen RP (2001) CSF dopamine, serotonin, and bipterin metabolites in patients with restless legs syndrome. *Mov Disord* 16:144-149.
- Earley CJ, Hyland K, Allen RP (2006a) Circadian changes in CSF dopaminergic measures in restless legs syndrome. *Sleep medicine* 7:263-268.
- Earley CJ, Kuwabara H, Wong DF, Gamaldo C, Salas R, Brasic J, Ravert HT, Dannals RF, Allen RP (2011) The dopamine transporter is decreased in the striatum of subjects with restless legs syndrome. *Sleep* 34:341-347.
- Earley CJ, Kuwabara H, Wong DF, Gamaldo C, Salas RE, Brasic JR, Ravert HT, Dannals RF, Allen RP (2013) Increased synaptic dopamine in the putamen in restless legs syndrome. *Sleep* 36:51-57.
- Earley CJ, P BB, Horska A, Allen RP (2006b) MRI-determined regional brain iron concentrations in early- and late-onset restless legs syndrome. *Sleep medicine* 7:458-461.
- Edley SM, Graybiel AM (1983) The afferent and efferent connections of the feline nucleus tegmenti pedunculopontinus, pars compacta. *J Comp Neurol* 217:187-215.
- Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr* 38:1236-1239.

- Eisensehr I, Wetter TC, Linke R, Noachtar S, von Lindener H, Gildehaus FJ, Trenkwalder C, Tatsch K (2001) Normal IPT and IBZM SPECT in drug-naive and levodopa-treated idiopathic restless legs syndrome. *Neurology* 57:1307-1309.
- Ekbom KA (1945) Restless legs: a clinical study. *Acta Med Scand* 158:1-123.
- Emborg ME, Moirano J, Schafernak KT, Moirano M, Evans M, Konecny T, Roitberg B, Ambarish P, Mangubat E, Ma Y, Eidelberg D, Holden J, Kordower JH, Leestma JE (2006) Basal ganglia lesions after MPTP administration in rhesus monkeys. *Neurobiol Dis* 23:281-289.
- Erikson KM, Jones BC, Beard JL (2000) Iron deficiency alters dopamine transporter functioning in rat striatum. *J Nutr* 130:2831-2837.
- Erikson KM, Jones BC, Hess EJ, Zhang Q, Beard JL (2001) Iron deficiency decreases dopamine D1 and D2 receptors in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 69:409-418.
- Erikson KM, Shihabi ZK, Aschner JL, Aschner M (2002) Manganese accumulates in iron-deficient rat brain regions in a heterogeneous fashion and is associated with neurochemical alterations. *Biol Trace Elem Res* 87:143-156.
- Espinar-Sierra J, Vela-Bueno A, Luque-Otero M (1997) Periodic leg movements in sleep in essential hypertension. *Psychiatry Clin Neurosci* 51:103-107.
- Esteves AM, de Mello MT, Lancellotti CL, Natal CL, Tufik S (2004) Occurrence of limb movement during sleep in rats with spinal cord injury. *Brain Res* 1017:32-38.
- Everitt BJ, Robbins TW (1997) Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* 48:649-684.
- Factor SA, McAlarney T, Sanchez-Ramos JR, Weiner WJ (1990) Sleep disorders and sleep effect in Parkinson's disease. *Mov Disord* 5:280-285.
- Faucheux BA, Martin ME, Beaumont C, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC (2003) Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem* 86:1142-1148.
- Faucheux BA, Martin ME, Beaumont C, Hunot S, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC (2002) Lack of up-regulation of ferritin is associated with sustained iron regulatory protein-1 binding activity in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem* 83:320-330.
- Ferreira C, Bucchini D, Martin ME, Levi S, Arosio P, Grandchamp B, Beaumont C (2000) Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *J Biol Chem* 275:3021-3024.
- Ferreira JJ, Galitzky M, Thalamas C, Tiberge M, Montastruc JL, Sampaio C, Rascol O (2002) Effect of ropinirole on sleep onset: a randomized, placebo-controlled study in healthy volunteers. *Neurology* 58:460-462.
- Fetissov SO, Meguid MM, Sato T, Zhang LH (2002) Expression of dopaminergic receptors in the hypothalamus of lean and obese Zucker rats and food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R905-910.
- Fitzpatrick PF (1989) The metal requirement of rat tyrosine hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 161:211-215.
- Fitzpatrick PF (1999) Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* 68:355-381.
- Ford B (2010) Pain in Parkinson's disease. *Mov Disord* 25 Suppl 1:S98-103.
- Fornal C, Auerbach S, Jacobs BL (1985) Activity of serotonin-containing neurons in nucleus raphe magnus in freely moving cats. *Exp Neurol* 88:590-608.
- Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW (1993) Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol* 60:600-608.
- Forno LS, Langston JW, DeLanney LE, Irwin I, Ricaurte GA (1986) Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Annals of neurology* 20:449-455.
- Forrest V, Ince P, Leitch M, Marshall EF, Shaw PJ (1996) Serotonergic neurotransmission in the spinal cord and motor cortex of patients with motor neuron disease and controls:

- quantitative autoradiography for 5-HT<sub>1a</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors. *J Neurol Sci* 139 Suppl:83-90.
- Forth W, Rummel W (1973) Iron absorption. *Physiol Rev* 53:724-792.
- Frucht S, Rogers JD, Greene PE, Gordon MF, Fahn S (1999) Falling asleep at the wheel: motor vehicle mishaps in persons taking pramipexole and ropinirole. *Neurology* 52:1908-1910.
- Fuqua BK, Vulpe CD, Anderson GJ (2012) Intestinal iron absorption. *J Trace Elem Med Biol* 26:115-119.
- Galy B, Ferring-Appel D, Sauer SW, Kaden S, Lyoumi S, Puy H, Kolker S, Grone HJ, Hentze MW (2010) Iron regulatory proteins secure mitochondrial iron sufficiency and function. *Cell Metab* 12:194-201.
- Gamaldo CE, Benbrook AR, Allen RP, Oguntimein O, Earley CJ (2008) A further evaluation of the cognitive deficits associated with restless legs syndrome (RLS). *Sleep medicine* 9:500-505.
- Gao XB (2009) Electrophysiological effects of MCH on neurons in the hypothalamus. *Peptides* 30:2025-2030.
- Garcia-Borreguero D, Larrosa O, de la Llave Y, Verger K, Masramon X, Hernandez G (2002) Treatment of restless legs syndrome with gabapentin: a double-blind, cross-over study. *Neurology* 59:1573-1579.
- Garcia-Garcia F, Ponce S, Brown R, Cussen V, Krueger JM (2005) Sleep disturbances in the rotenone animal model of Parkinson disease. *Brain Res* 1042:160-168.
- Garn SM, Smith NJ, Clark DC (1975) Lifelong differences in hemoglobin levels between Blacks and Whites. *J Natl Med Assoc* 67:91-96.
- Gaus SE, Strecker RE, Tate BA, Parker RA, Saper CB (2002) Ventrolateral preoptic nucleus contains sleep-active, galaninergic neurons in multiple mammalian species. *Neuroscience* 115:285-294.
- Gebhart GF (2004) Descending modulation of pain. *Neurosci Biobehav Rev* 27:729-737.
- Gerashchenko D, Blanco-Centurion C, Greco MA, Shiromani PJ (2003) Effects of lateral hypothalamic lesion with the neurotoxin hypocretin-2-saporin on sleep in Long-Evans rats. *Neuroscience* 116:223-235.
- Gerin C, Privat A (1998) Direct evidence for the link between monoaminergic descending pathways and motor activity: II. A study with microdialysis probes implanted in the ventral horn of the spinal cord. *Brain Res* 794:169-173.
- Ghorayeb I, Bezard E (2012) Toward an animal model of restless legs syndrome? *Mov Disord* 27:337-338.
- Ghorayeb I, Fernagut PO, Aubert I, Bezard E, Poewe W, Wenning GK, Tison F (2000) Toward a primate model of L-dopa-unresponsive parkinsonism mimicking striatonigral degeneration. *Mov Disord* 15:531-536.
- Ghorayeb I, Loundou A, Auquier P, Dauvilliers Y, Bioulac B, Tison F (2007) A nationwide survey of excessive daytime sleepiness in Parkinson's disease in France. *Mov Disord* 22:1567-1572.
- Goessling LS, Mascotti DP, Thach RE (1998) Involvement of heme in the degradation of iron-regulatory protein 2. *J Biol Chem* 273:12555-12557.
- Goetz CG, Poewe W, Rascol O, Sampaio C (2005) Evidence-based medical review update: pharmacological and surgical treatments of Parkinson's disease: 2001 to 2004. *Mov Disord* 20:523-539.
- Golts N, Snyder H, Frasier M, Theisler C, Choi P, Wolozin B (2002) Magnesium inhibits spontaneous and iron-induced aggregation of alpha-synuclein. *J Biol Chem* 277:16116-16123.
- Gomez-Esteban JC, Zarranz JJ, Tijero B, Velasco F, Barcena J, Rouco I, Lezcano E, Lachen MC, Jauregui A, Ugarte A (2007) Restless legs syndrome in Parkinson's disease. *Mov Disord* 22:1912-1916.

- Gorell JM, Ordidge RJ, Brown GG, Deniau JC, Buderer NM, Helpers JA (1995) Increased iron-related MRI contrast in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurology* 45:1138-1143.
- Green AR, Youdim MB (1977) The effect of iron deficiency on brain monoamine metabolism and the behavioural responses to increased brain 5-hydroxytryptamine and dopamine synthesis [proceedings]. *Br J Pharmacol* 59:470P-471P.
- Guehl D, Pessiglione M, Francois C, Yelnik J, Hirsch EC, Feger J, Tremblay L (2003) Tremor-related activity of neurons in the 'motor' thalamus: changes in firing rate and pattern in the MPTP vervet model of parkinsonism. *Eur J Neurosci* 17:2388-2400.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388:482-488.
- Gutteridge JM, Halliwell B (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 899:136-147.
- Haba-Rubio J, Staner L, Petiau C, Erb G, Schunck T, Macher JP (2005) Restless legs syndrome and low brain iron levels in patients with haemochromatosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:1009-1010.
- Hadziahmetovic M, Dentchev T, Song Y, Haddad N, He X, Hahn P, Pratico D, Wen R, Harris ZL, Lambris JD, Beard J, Dunaief JL (2008) Ceruloplasmin/hephaestin knockout mice model morphologic and molecular features of AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:2728-2736.
- Halliday GM, Blumbergs PC, Cotton RG, Blessing WW, Geffen LB (1990) Loss of brainstem serotonin- and substance P-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain Res* 510:104-107.
- Hamilton LD, Gubler CJ, Cartwright GE, Wintrobe MM (1950) Diurnal variation in the plasma iron level of man. *Proc Soc Exp Biol Med* 75:65-68.
- Happe S, Pirker W, Klosch G, Sauter C, Zeitlhofer J (2003) Periodic leg movements in patients with Parkinson's disease are associated with reduced striatal dopamine transporter binding. *Journal of neurology* 250:83-86.
- Hardin PE, Hall JC, Rosbash M (1992) Circadian oscillations in period gene mRNA levels are transcriptionally regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11711-11715.
- Hartmann M, Pfister R, Pfadenhauer K (1999) Restless legs syndrome associated with spinal cord lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:688-689.
- Hassler R (1938) Zur Pathologie der Paralysis agitans und des postenzephalitischen Parkinsonismus. *J Psychol Neurol* 48:387-476.
- Hawkes CH (2008) The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: does it exist and if so how long is it? *Mov Disord* 23:1799-1807.
- Heilmeyer L (1937) *Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit*. (Fischer, ed) Jena.
- Hemmler G (1951) *Métabolisme du fer*. In: *Physiologie, pathologique, traitement*(Masson, P., ed).
- Hening W, Allen R, Earley C, Kushida C, Picchietti D, Silber M (1999a) The treatment of restless legs syndrome and periodic limb movement disorder. *An American Academy of Sleep Medicine Review*. *Sleep* 22:970-999.
- Hening WA, Walters AS, Wagner M, Rosen R, Chen V, Kim S, Shah M, Thai O (1999b) Circadian rhythm of motor restlessness and sensory symptoms in the idiopathic restless legs syndrome. *Sleep* 22:901-912.
- Hentall ID, Burns SB (2009) Restorative effects of stimulating medullary raphe after spinal cord injury. *J Rehabil Res Dev* 46:109-122.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C (2010) Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142:24-38.
- Herrero JF, Coates TW, Higgins M, Livingston A, Waterman AE, Headley PM (1993) A technique for recording from spinal neurones in awake sheep. *J Neurosci Methods* 46:225-232.

- Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334:345-348.
- Hogl B, Garcia-Borreguero D, Kohnen R, Ferini-Strambi L, Hadjigeorgiou G, Hornyak M, de Weerd A, Happe S, Stiasny-Kolster K, Gschliesser V, Egatz R, Frauscher B, Benes H, Trenkwalder C, Hening WA, Allen RP (2010) Progressive development of augmentation during long-term treatment with levodopa in restless legs syndrome: results of a prospective multi-center study. *Journal of neurology* 257:230-237.
- Homann CN, Wenzel K, Suppan K, Ivanic G, Kriechbaum N, Crevenna R, Ott E (2002) Sleep attacks in patients taking dopamine agonists: review. *BMJ* 324:1483-1487.
- Hoque R, Chesson AL, Jr. (2010) Pharmacologically induced/exacerbated restless legs syndrome, periodic limb movements of sleep, and REM behavior disorder/REM sleep without atonia: literature review, qualitative scoring, and comparative analysis. *J Clin Sleep Med* 6:79-83.
- Hornyak M, Grossmann C, Kohnen R, Schlatterer M, Richter H, Voderholzer U, Riemann D, Berger M (2008) Cognitive behavioural group therapy to improve patients' strategies for coping with restless legs syndrome: a proof-of-concept trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:823-825.
- Höyer K (1944) Physiologic variations in the iron content of human blood serum-II. Further studies on the intra diem variations. *Acta Med Scand* 69:577-585.
- Imbert C, Bezard E, Guitraud S, Boraud T, Gross CE (2000) Comparison of eight clinical rating scales used for the assessment of MPTP-induced parkinsonism in the Macaque monkey. *J Neurosci Methods* 96:71-76.
- Javoy-Agid F, Agid Y (1980) Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson disease? *Neurology* 30:1326-1330.
- Jellinger K, Paulus W, Grundke-Iqbal I, Riederer P, Youdim MB (1990) Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 2:327-340.
- Jellinger KA (1991) Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* 14:153-197.
- Jhoo JH, Yoon IY, Kim YK, Chung S, Kim JM, Lee SB, Kim TH, Moon SH, Kim SE, Kim KW (2010) Availability of brain serotonin transporters in patients with restless legs syndrome. *Neurology* 74:513-518.
- Jiang H, Luan Z, Wang J, Xie J (2006) Neuroprotective effects of iron chelator Desferal on dopaminergic neurons in the substantia nigra of rats with iron-overload. *Neurochem Int* 49:605-609.
- Jiang H, Song N, Wang J, Ren LY, Xie JX (2007) Peripheral iron dextran induced degeneration of dopaminergic neurons in rat substantia nigra. *Neurochem Int* 51:32-36.
- Jouvet M (1962) [Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep]. *Arch Ital Biol* 100:125-206.
- Jouvet M (1965) Paradoxical Sleep--a Study of Its Nature and Mechanisms. *Prog Brain Res* 18:20-62.
- Kales A, Ansel RD, Markham CH, Scharf MB, Tan TL (1971) Sleep in patients with Parkinson's disease and normal subjects prior to and following levodopa administration. *Clin Pharmacol Ther* 12:397-406.
- Kaur D, Peng J, Chinta SJ, Rajagopalan S, Di Monte DA, Cherny RA, Andersen JK (2007) Increased murine neonatal iron intake results in Parkinson-like neurodegeneration with age. *Neurobiol Aging* 28:907-913.
- Kaur D, Yantiri F, Rajagopalan S, Kumar J, Mo JQ, Boonplueang R, Viswanath V, Jacobs R, Yang L, Beal MF, DiMonte D, Volitaskis I, Ellerby L, Cherny RA, Bush AI, Andersen JK (2003) Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron* 37:899-909.
- Kaushik P, Gorin F, Vali S (2007) Dynamics of tyrosine hydroxylase mediated regulation of dopamine synthesis. *J Comput Neurosci* 22:147-160.

- Kawano Y, Kawasaki T, Kawazoe N, Abe I, Uezono K, Ueno M, Fukiyama K, Omae T (1990) Circadian variations of urinary dopamine, norepinephrine, epinephrine and sodium in normotensive and hypertensive subjects. *Nephron* 55:277-282.
- Kemna EH, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW (2007) Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin Chem* 53:620-628.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608.
- Konadhode RR, Pelluru D, Blanco-Centurion C, Zayachkivsky A, Liu M, Uhde T, Glen WB, Jr., van den Pol AN, Mulholland PJ, Shiromani PJ (2013) Optogenetic stimulation of MCH neurons increases sleep. *J Neurosci* 33:10257-10263.
- Kono S (2012) Aceruloplasminemia. *Curr Drug Targets* 13:1190-1199.
- Kraus T, Schuld A, Pollmacher T (1999) Periodic leg movements in sleep and restless legs syndrome probably caused by olanzapine. *J Clin Psychopharmacol* 19:478-479.
- Kreiss DS, Mastropietro CW, Rawji SS, Walters JR (1997) The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 17:6807-6819.
- Kripke DF, Reite ML, Pegrum GV, Stephens LM, Lewis OF (1968) Clinical and laboratory notes. Nocturnal sleep in rhesus monkeys. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 24:582-586.
- Kuhn E, Brodan V (1982) Changes in the circadian rhythm of serum iron induced by a 5-day sleep deprivation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 49:215-222.
- Kumar S, Bhatia M, Behari M (2002) Sleep disorders in Parkinson's disease. *Mov Disord* 17:775-781.
- Kumru H, Iranzo A, Carrasco E, Valldeoriola F, Marti MJ, Santamaria J, Tolosa E (2008) Lack of effects of pramipexole on REM sleep behavior disorder in Parkinson disease. *Sleep* 31:1418-1421.
- Kushida CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A (1989) Sleep deprivation in the rat: IV. Paradoxical sleep deprivation. *Sleep* 12:22-30.
- Laloux C, Derambure P, Houdayer E, Jacquesson JM, Bordet R, Destee A, Monaca C (2008a) Effect of dopaminergic substances on sleep/wakefulness in saline- and MPTP-treated mice. *J Sleep Res* 17:101-110.
- Laloux C, Derambure P, Kreisler A, Houdayer E, Brueziere S, Bordet R, Destee A, Monaca C (2008b) MPTP-treated mice: long-lasting loss of nigral TH-ir neurons but not paradoxical sleep alterations. *Exp Brain Res* 186:635-642.
- Lambe T, Simpson RJ, Dawson S, Bouriez-Jones T, Crockford TL, Lephherd M, Latunde-Dada GO, Robinson H, Raja KB, Campagna DR, Villarreal G, Jr., Ellory JC, Goodnow CC, Fleming MD, McKie AT, Cornall RJ (2009) Identification of a Steap3 endosomal targeting motif essential for normal iron metabolism. *Blood* 113:1805-1808.
- Lang AE, Johnson K (1987) Akathisia in idiopathic Parkinson's disease. *Neurology* 37:477-481.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219:979-980.
- Langston JW, Forno LS, Rebert CS, Irwin I (1984) Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res* 292:390-394.
- Larsen JP (2003) Sleep disorders in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 91:329-334.
- Lee MG, Hassani OK, Jones BE (2005) Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 25:6716-6720.
- Lees AJ, Blackburn NA, Campbell VL (1988) The nighttime problems of Parkinson's disease. *Clinical neuropharmacology* 11:512-519.

- Leibowitz SF, Brown LL (1980) Histochemical and pharmacological analysis of catecholaminergic projections to the perifornical hypothalamus in relation to feeding inhibition. *Brain Res* 201:315-345.
- Lena I, Parrot S, Deschaux O, Muffat-Joly S, Sauvinet V, Renaud B, Suaud-Chagny MF, Gottesmann C (2005) Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep--wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats. *J Neurosci Res* 81:891-899.
- Lesser RP, Fahn S, Snider SR, Cote LJ, Isgreen WP, Barrett RE (1979) Analysis of the clinical problems in parkinsonism and the complications of long-term levodopa therapy. *Neurology* 29:1253-1260.
- LeVine SM, Wulser MJ, Lynch SG (1998) Iron quantification in cerebrospinal fluid. *Anal Biochem* 265:74-78.
- Levy R, Dubois B (2006) Apathy and the functional anatomy of the prefrontal cortex-basal ganglia circuits. *Cereb Cortex* 16:916-928.
- Lima MM, Andersen ML, Reksidler AB, Silva A, Zager A, Zanata SM, Vital MA, Tufik S (2008) Blockage of dopaminergic D(2) receptors produces decrease of REM but not of slow wave sleep in rats after REM sleep deprivation. *Behavioural brain research* 188:406-411.
- Lima MM, Andersen ML, Reksidler AB, Vital MA, Tufik S (2007) The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. *PloS one* 2:e513.
- Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL (1998) Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *The New England journal of medicine* 339:1105-1111.
- Lipford MC, Silber MH (2012) Long-term use of pramipexole in the management of restless legs syndrome. *Sleep medicine* 13:1280-1285.
- Loeffler DA, Connor JR, Juneau PL, Snyder BS, Kanaley L, DeMaggio AJ, Nguyen H, Brickman CM, LeWitt PA (1995) Transferrin and iron in normal, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease brain regions. *J Neurochem* 65:710-724.
- Loo HV, Tan EK (2008) Case-control study of restless legs syndrome and quality of sleep in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 266:145-149.
- Lopes C, Esteves AM, Frussa-Filho R, Tufik S, de Mello MT (2012) Evaluation of periodic limb movements in a putative animal model of restless leg syndrome. *Mov Disord* 27:413-420.
- Lopiano L, Chiesa M, Digilio G, Giraudo S, Bergamasco B, Torre E, Fasano M (2000) Q-band EPR investigations of neuromelanin in control and Parkinson's disease patients. *Biochim Biophys Acta* 1500:306-312.
- Lu J, Greco MA, Shiromani P, Saper CB (2000) Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci* 20:3830-3842.
- Luppi PH, Clement O, Fort P (2013) Paradoxical (REM) sleep genesis by the brainstem is under hypothalamic control. *Curr Opin Neurobiol*.
- Luppi PH, Gervasoni D, Boissard R, Verret L, Goutagny R, Peyron C, Salvert D, Leger L, Barbagli B, Fort P (2004) Brainstem structures responsible for paradoxical sleep onset and maintenance. *Arch Ital Biol* 142:397-411.
- Maloney KJ, Mainville L, Jones BE (2002) c-Fos expression in dopaminergic and GABAergic neurons of the ventral mesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *Eur J Neurosci* 15:774-778.
- Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA (1984) Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* 311:464-467.
- Martin RF, Bowden DM (1996) A stereotaxic template atlas of the macaque brain for digital imaging and quantitative neuroanatomy. *Neuroimage* 4:119-150.
- Martinez-Martin P, Schapira AH, Stocchi F, Sethi K, Odin P, MacPhee G, Brown RG, Naidu Y, Clayton L, Abe K, Tsuboi Y, MacMahon D, Barone P, Rabey M, Bonuccelli U, Forbes A, Breen K, Tluk S, Olanow CW, Thomas S, Rye D, Hand A, Williams AJ,

- Ondo W, Chaudhuri KR (2007) Prevalence of nonmotor symptoms in Parkinson's disease in an international setting; study using nonmotor symptoms questionnaire in 545 patients. *Mov Disord* 22:1623-1629.
- Mathias CJ, Polinsky RJ (1999) Separating the primary autonomic failure syndromes, multiple system atrophy, and pure autonomic failure from Parkinson's disease. *Adv Neurol* 80:353-361.
- Mathur BN, Lovinger DM (2012) Serotonergic action on dorsal striatal function. *Parkinsonism Relat Disord* 18 Suppl 1:S129-131.
- McCarthy RC, Kosman DJ (2013) Ferroportin and exocytosomal ferroxidase activity are required for brain microvascular endothelial cell iron efflux. *J Biol Chem* 288:17932-17940.
- McCormick DA (1989) Cholinergic and noradrenergic modulation of thalamocortical processing. *Trends Neurosci* 12:215-221.
- McCoubrey WK, Jr., Huang TJ, Maines MD (1997) Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J Biol Chem* 272:12568-12574.
- McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F, Simpson RJ (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291:1755-1759.
- McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 5:299-309.
- Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Iwai K, LaVaute T, Brazzolotto X, Berger UV, Land W, Ollivierre-Wilson H, Grinberg A, Love P, Rouault TA (2004) Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J* 23:386-395.
- Michaud M, Dumont M, Selmaoui B, Paquet J, Fantini ML, Montplaisir J (2004) Circadian rhythm of restless legs syndrome: relationship with biological markers. *Annals of neurology* 55:372-380.
- Michaud M, Lavigne G, Desautels A, Poirier G, Montplaisir J (2002a) Effects of immobility on sensory and motor symptoms of restless legs syndrome. *Mov Disord* 17:112-115.
- Michaud M, Soucy JP, Chabli A, Lavigne G, Montplaisir J (2002b) SPECT imaging of striatal pre- and postsynaptic dopaminergic status in restless legs syndrome with periodic leg movements in sleep. *Journal of neurology* 249:164-170.
- Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM (2005) Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron* 46:787-798.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.
- Miller JD, Farber J, Gatz P, Roffwarg H, German DC (1983) Activity of mesencephalic dopamine and non-dopamine neurons across stages of sleep and walking in the rat. *Brain Res* 273:133-141.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Mitchell IJ, Sambrook MA, Crossman AR (1985) Subcortical changes in the regional uptake of [3H]-2-deoxyglucose in the brain of the monkey during experimental choreiform dyskinesia elicited by injection of a gamma-aminobutyric acid antagonist into the subthalamic nucleus. *Brain* 108 ( Pt 2):405-422.
- Mitchell RS, Kumar, V., Abbas. A. K., Fausto, N. (2007) *Robbins Basic Pathology*. Philadelphia: Saunders/Elsevier.
- Miyasaki JM (2010) Evidence-based initiation of dopaminergic therapy in Parkinson's disease. *Journal of neurology* 257:S309-313.
- Mizuno S, Mihara T, Miyaoka T, Inagaki T, Horiguchi J (2005) CSF iron, ferritin and transferrin levels in restless legs syndrome. *J Sleep Res* 14:43-47.

- Monaca C, Laloux C, Jacquesson JM, Gele P, Marechal X, Bordet R, Destee A, Derambure P (2004) Vigilance states in a parkinsonian model, the MPTP mouse. *Eur J Neurosci* 20:2474-2478.
- Montagu KA (1957) Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature* 180:244-245.
- Montastruc JL, Rascol O, Rascol A (1989) A randomised controlled study of bromocriptine versus levodopa in previously untreated Parkinsonian patients: a 3 year follow-up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52:773-775.
- Monti JM, Jantos H, Fernandez M (1989) Effects of the selective dopamine D-2 receptor agonist, quinpirole on sleep and wakefulness in the rat. *Eur J Pharmacol* 169:61-66.
- Monti JM, Monti D (2007) The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking. *Sleep medicine reviews* 11:113-133.
- Montplaisir J, Boucher S, Poirier G, Lavigne G, Lapierre O, Lesperance P (1997) Clinical, polysomnographic, and genetic characteristics of restless legs syndrome: a study of 133 patients diagnosed with new standard criteria. *Mov Disord* 12:61-65.
- Montplaisir J, Godbout R, Poirier G, Bedard MA (1986) Restless legs syndrome and periodic movements in sleep: physiopathology and treatment with L-dopa. *Clinical neuropharmacology* 9:456-463.
- Montplaisir J, Lorrain D, Godbout R (1991) Restless legs syndrome and periodic leg movements in sleep: the primary role of dopaminergic mechanism. *Eur Neurol* 31:41-43.
- Moore RY, Bloom FE (1978) Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annu Rev Neurosci* 1:129-169.
- Moos T (2002) Brain iron homeostasis. *Dan Med Bull* 49:279-301.
- Moratalla R, Quinn B, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Graybiel AM (1992) Differential vulnerability of primate caudate-putamen and striosome-matrix dopamine systems to the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3859-3863.
- Morse AC, Beard JL, Jones BC (1999) A genetic developmental model of iron deficiency: biological aspects. *Proc Soc Exp Biol Med* 220:147-152.
- Navailles S, De Deurwaerdere P (2011) Presynaptic control of serotonin on striatal dopamine function. *Psychopharmacology (Berl)* 213:213-242.
- Nelson C, Erikson K, Pinero DJ, Beard JL (1997) In vivo dopamine metabolism is altered in iron-deficient anemic rats. *J Nutr* 127:2282-2288.
- Nemeth E, Ganz T (2006) Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr* 26:323-342.
- Nomura T, Inoue Y, Miyake M, Yasui K, Nakashima K (2006) Prevalence and clinical characteristics of restless legs syndrome in Japanese patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 21:380-384.
- O'Keeffe ST, Gavin K, Lavan JN (1994) Iron status and restless legs syndrome in the elderly. *Age Ageing* 23:200-203.
- Oakley AE, Collingwood JF, Dobson J, Love G, Perrott HR, Edwardson JA, Elstner M, Morris CM (2007) Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. *Neurology* 68:1820-1825.
- Ogawa K, Sun J, Taketani S, Nakajima O, Nishitani C, Sassa S, Hayashi N, Yamamoto M, Shibahara S, Fujita H, Igarashi K (2001) Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J* 20:2835-2843.
- Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD (2006) The Steap proteins are metallo-reductases. *Blood* 108:1388-1394.
- Oiwa Y, Eberling JL, Nagy D, Pivrotto P, Emborg ME, Bankiewicz KS (2003) Overlesioned hemiparkinsonian non human primate model: correlation between clinical, neurochemical and histochemical changes. *Front Biosci* 8:a155-166.

- Olanow CW, Schapira AH, Roth T (2000) Waking up to sleep episodes in Parkinson's disease. *Mov Disord* 15:212-215.
- Ondo W, Jankovic J (1996) Restless legs syndrome: clinicoetiologic correlates. *Neurology* 47:1435-1441.
- Ondo WG, He Y, Rajasekaran S, Le WD (2000) Clinical correlates of 6-hydroxydopamine injections into A11 dopaminergic neurons in rats: a possible model for restless legs syndrome. *Mov Disord* 15:154-158.
- Ongini E, Caporali MG, Massotti M (1985) Stimulation of dopamine D-1 receptors by SKF 38393 induces EEG desynchronization and behavioral arousal. *Life Sci* 37:2327-2333.
- Packard MG, White NM (1991) Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by posttraining intracerebral injection of dopamine agonists. *Behav Neurosci* 105:295-306.
- Page RL, 2nd, Ruscin JM, Bainbridge JL, Brieke AA (2008) Restless legs syndrome induced by escitalopram: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy* 28:271-280.
- Parada M, Hernandez L, Schwartz D, Hoebel BG (1988) Hypothalamic infusion of amphetamine increases serotonin, dopamine and norepinephrine. *Physiol Behav* 44:607-610.
- Parent M, Wallman MJ, Gagnon D, Parent A (2011) Serotonin innervation of basal ganglia in monkeys and humans. *J Chem Neuroanat* 41:256-265.
- Parkinson-Study-Group (2000) A randomized controlled trial comparing pramipexole with levodopa in early Parkinson's disease: design and methods of the CALM-PD Study. *Clinical neuropharmacology* 23:34-44.
- Parkinson-Study-Group (2009) Long-term effect of initiating pramipexole vs levodopa in early Parkinson's disease. *Arch Neurol* 66:563-570.
- Parkinson J (1817) *An essay on the Shaking Palsy*. London: Neely and Jones.
- Paulus W, Schomburg ED (2006) Dopamine and the spinal cord in restless legs syndrome: does spinal cord physiology reveal a basis for augmentation? *Sleep medicine reviews* 10:185-196.
- Paulus W, Trenkwalder C (2006) Less is more: pathophysiology of dopaminergic-therapy-related augmentation in restless legs syndrome. *Lancet Neurol* 5:878-886.
- Pearson VE, Allen RP, Dean T, Gamaldo CE, Lesage SR, Earley CJ (2006) Cognitive deficits associated with restless legs syndrome (RLS). *Sleep medicine* 7:25-30.
- Perlow MJ, Gordon EK, Ebert ME, Hoffman HJ, Chase TN (1977) The circadian variation in dopamine metabolism in the subhuman primate. *J Neurochem* 28:1381-1383.
- Peters TJ, Raja KB, Simpson RJ, Snape S (1988) Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Ann N Y Acad Sci* 526:141-147.
- Peyron C, Sapin E, Leger L, Luppi PH, Fort P (2009) Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation. *Peptides* 30:2052-2059.
- Pifl C, Schingnitz G, Hornykiewicz O (1991) Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on the regional distribution of brain monoamines in the rhesus monkey. *Neuroscience* 44:591-605.
- Pigeon WR, Yurcheshen M (2009) Behavioral Sleep Medicine Interventions for Restless Legs Syndrome and Periodic Limb Movement Disorder. *Sleep Med Clin* 4:487-494.
- Pittock SJ, Parrett T, Adler CH, Parisi JE, Dickson DW, Ahlskog JE (2004) Neuropathology of primary restless leg syndrome: absence of specific tau- and alpha-synuclein pathology. *Mov Disord* 19:695-699.
- Pollak P, Benabid AL, Gross C, Gao DM, Laurent A, Benazzouz A, Hoffmann D, Gentil M, Perret J (1993) [Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease]. *Revue neurologique* 149:175-176.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI,

- Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047.
- Propper R, Nathan D (1982) Clinical removal of iron. *Annu Rev Med* 33:509-519.
- Purisai MG, McCormack AL, Langston WJ, Johnston LC, Di Monte DA (2005) Alpha-synuclein expression in the substantia nigra of MPTP-lesioned non-human primates. *Neurobiol Dis* 20:898-906.
- Py B, Barras F (2010) Building Fe-S proteins: bacterial strategies. *Nat Rev Microbiol* 8:436-446.
- Qu S, Le W, Zhang X, Xie W, Zhang A, Ondo WG (2007) Locomotion is increased in a11-lesioned mice with iron deprivation: a possible animal model for restless legs syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:383-388.
- Qu WM, Xu XH, Yan MM, Wang YQ, Urade Y, Huang ZL (2010) Essential role of dopamine D2 receptor in the maintenance of wakefulness, but not in homeostatic regulation of sleep, in mice. *J Neurosci* 30:4382-4389.
- Quinn NP (1997) Parkinson's disease: clinical features. *Bailliere's clinical neurology* 6:1-13.
- Raffin SB, Woo CH, Roost KT, Price DC, Schmid R (1974) Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. *J Clin Invest* 54:1344-1352.
- Raghuram S, Stayrook KR, Huang P, Rogers PM, Nosie AK, McClure DB, Burris LL, Khorasanizadeh S, Burris TP, Rastinejad F (2007) Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERBalpha and REV-ERBbeta. *Nat Struct Mol Biol* 14:1207-1213.
- Ramsey AJ, Fitzpatrick PF (1998) Effects of phosphorylation of serine 40 of tyrosine hydroxylase on binding of catecholamines: evidence for a novel regulatory mechanism. *Biochemistry* 37:8980-8986.
- Ramsey AJ, Hillas PJ, Fitzpatrick PF (1996) Characterization of the active site iron in tyrosine hydroxylase. Redox states of the iron. *J Biol Chem* 271:24395-24400.
- Rao R, Ennis K, Oz G, Lubach GR, Georgieff MK, Coe CL (2013) Metabolomic analysis of cerebrospinal fluid indicates iron deficiency compromises cerebral energy metabolism in the infant monkey. *Neurochem Res* 38:573-580.
- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. *The New England journal of medicine* 342:1484-1491.
- Rascol O, Lozano A, Stern M, Poewe W (2011) Milestones in Parkinson's disease therapeutics. *Mov Disord* 26:1072-1082.
- Rascol O, Nutt JG, Blin O, Goetz CG, Trugman JM, Soubrouillard C, Carter JH, Currie LJ, Fabre N, Thalamas C, Giardina WW, Wright S (2001) Induction by dopamine D1 receptor agonist ABT-431 of dyskinesia similar to levodopa in patients with Parkinson disease. *Arch Neurol* 58:249-254.
- Rascol O, Payoux P, Ory F, Ferreira JJ, Brefel-Courbon C, Montastruc JL (2003) Limitations of current Parkinson's disease therapy. *Annals of neurology* 53 Suppl 3:S3-12; discussion S12-15.
- Rechtschaffen A. KA (1968) A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. Washington DC: US Government Printing Office.
- Rhodes SL, Ritz B (2008) Genetics of iron regulation and the possible role of iron in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 32:183-195.
- Ridefelt P, Larsson A, Rehman JU, Axelsson J (2010) Influences of sleep and the circadian rhythm on iron-status indices. *Clinical biochemistry* 43:1323-1328.
- Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K, Youdim MB (1989) Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem* 52:515-520.

- Riederer P, Wuketich S (1976) Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural Transm* 38:277-301.
- Rottach KG, Schaner BM, Kirch MH, Zivotofsky AZ, Teufel LM, Gallwitz T, Messer T (2008) Restless legs syndrome as side effect of second generation antidepressants. *J Psychiatr Res* 43:70-75.
- Rouault TA (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol* 2:406-414.
- Rouault TA (2013) Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 14:551-564.
- Rouault TA, Cooperman S (2006) Brain iron metabolism. *Semin Pediatr Neurol* 13:142-148.
- Rye DB (2004) The two faces of Eve: dopamine's modulation of wakefulness and sleep. *Neurology* 63:S2-7.
- Rye DB, Saper CB, Lee HJ, Wainer BH (1987) Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum. *J Comp Neurol* 259:483-528.
- Ryvlin P, Broussolle E, Piollet H, Viallet F, Khalfallah Y, Chazot G (1995) Magnetic resonance imaging evidence of decreased putamenal iron content in idiopathic Parkinson's disease. *Arch Neurol* 52:583-588.
- Sakai K, Crochet S, Onoe H (2001) Pontine structures and mechanisms involved in the generation of paradoxical (REM) sleep. *Arch Ital Biol* 139:93-107.
- Sakai K, Sastre JP, Salvat D, Touret M, Tohyama M, Jouvet M (1979) Tegmentoreticular projections with special reference to the muscular atonia during paradoxical sleep in the cat: an HRP study. *Brain Res* 176:233-254.
- Salvatore MF, Fisher B, Surgener SP, Gerhardt GA, Rouault T (2005) Neurochemical investigations of dopamine neuronal systems in iron-regulatory protein 2 (IRP-2) knockout mice. *Brain Res Mol Brain Res* 139:341-347.
- Saper CB, Scammell TE, Lu J (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437:1257-1263.
- Sastre JP, Sakai K, Jouvet M (1981) Are the gigantocellular tegmental field neurons responsible for paradoxical sleep? *Brain Res* 229:147-161.
- Scales WE, Vander AJ, Brown MB, Kluger MJ (1988) Human circadian rhythms in temperature, trace metals, and blood variables. *J Appl Physiol* 65:1840-1846.
- Scatton B, Rouquier L, Javoy-Agid F, Agid Y (1982) Dopamine deficiency in the cerebral cortex in Parkinson disease. *Neurology* 32:1039-1040.
- Schade R, Vick K, Ott T, Sohr R, Pfister C, Bellach J, Golor G, Lemmer B (1995) Circadian rhythms of dopamine and cholecystokinin in nucleus accumbens and striatum of rats--influence on dopaminergic stimulation. *Chronobiol Int* 12:87-99.
- Schapira AH (1994) Evidence for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease--a critical appraisal. *Mov Disord* 9:125-138.
- Schenck CH, Bundlie SR, Mahowald MW (1996) Delayed emergence of a parkinsonian disorder in 38% of 29 older men initially diagnosed with idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder. *Neurology* 46:388-393.
- Scherman D, Desnos C, Darchen F, Pollak P, Javoy-Agid F, Agid Y (1989) Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Annals of neurology* 26:551-557.
- Schultz W (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 7:191-197.
- Schumann K, Haen E (1988) Influence of food intake on the 24-hr variations of plasma iron concentration in the rabbit. *Chronobiol Int* 5:59-64.
- Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Ulm G, Schneider E (1996) Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. *Neurology* 46:1275-1284.
- Semchuk KM, Love EJ, Lee RG (1992) Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology* 42:1328-1335.

- Sharf B, Moskowitz C, Lupton MD, Klawans HL (1978) Dream phenomena induced by chronic levodopa therapy. *J Neural Transm* 43:143-151.
- Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, Saper CB (1998) Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci* 18:4705-4721.
- Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271:216-219.
- Shima T, Sarna T, Swartz HM, Stroppolo A, Gerbasi R, Zecca L (1997) Binding of iron to neuromelanin of human substantia nigra and synthetic melanin: an electron paramagnetic resonance spectroscopy study. *Free Radic Biol Med* 23:110-119.
- Siah CW, Trinder D, Olynyk JK (2005) Iron overload. *Clin Chim Acta* 358:24-36.
- Siegel J (2004) Brain mechanisms that control sleep and waking. *Naturwissenschaften* 91:355-365.
- Silber MH (2013) Sleep-related movement disorders. *Continuum (Minneapolis)* 19:170-184.
- Silber MH, Ancoli-Israel S, Bonnet MH, Chokroverty S, Grigg-Damberger MM, Hirshkowitz M, Kapen S, Keenan SA, Kryger MH, Penzel T, Pressman MR, Iber C (2007) The visual scoring of sleep in adults. *J Clin Sleep Med* 3:121-131.
- Silber MH, Ehrenberg BL, Allen RP, Buchfuhrer MJ, Earley CJ, Hening WA, Rye DB (2004) An algorithm for the management of restless legs syndrome. *Mayo Clin Proc* 79:916-922.
- Sirinathsinghji DJ, Kupsch A, Mayer E, Zivin M, Pufal D, Oertel WH (1992) Cellular localization of tyrosine hydroxylase mRNA and cholecystokinin mRNA-containing cells in the ventral mesencephalon of the common marmoset: effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res Mol Brain Res* 12:267-274.
- Snyder AM, Connor JR (2009) Iron, the substantia nigra and related neurological disorders. *Biochim Biophys Acta* 1790:606-614.
- Snyder AM, Wang X, Patton SM, Arosio P, Levi S, Earley CJ, Allen RP, Connor JR (2009) Mitochondrial ferritin in the substantia nigra in restless legs syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:1193-1199.
- Sowers JR, Vlachakis N (1984) Circadian variation in plasma dopamine levels in man. *J Endocrinol Invest* 7:341-345.
- Spampinato U, Esposito E, Samanin R (1985) Serotonin agonists reduce dopamine synthesis in the striatum only when the impulse flow of nigro-striatal neurons is intact. *J Neurochem* 45:980-982.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6469-6473.
- Stanley-Jones D (1956) The anatomy of rigidity and tremor. *The Journal of nervous and mental disease* 124:163-166.
- Statland BE, Winkel P, Bokelund H (1973) Factors contributing to intra-individual variation of serum constituents. 1. Within-day variation of serum constituents in healthy subjects. *Clin Chem* 19:1374-1379.
- Steininger TL, Alam MN, Gong H, Szymusiak R, McGinty D (1999) Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamus of the albino rat. *Brain Res* 840:138-147.
- Stern M, Roffwarg H, Duvoisin R (1968) The parkinsonian tremor in sleep. *The Journal of nervous and mental disease* 147:202-210.
- Stiasny-Kolster K, Moller JC, Zschocke J, Bandmann O, Cassel W, Oertel WH, Hoffmann GF (2004) Normal dopaminergic and serotonergic metabolites in cerebrospinal fluid and blood of restless legs syndrome patients. *Mov Disord* 19:192-196.
- Strecker RE, Morairty S, Thakkar MM, Porkka-Heiskanen T, Basheer R, Dauphin LJ, Rainnie DG, Portas CM, Greene RW, McCarley RW (2000) Adenosinergic modulation of

- basal forebrain and preoptic/anterior hypothalamic neuronal activity in the control of behavioral state. *Behavioural brain research* 115:183-204.
- Sulzer D, Bogulavsky J, Larsen KE, Behr G, Karatekin E, Kleinman MH, Turro N, Krantz D, Edwards RH, Greene LA, Zecca L (2000) Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11869-11874.
- Sun ER, Chen CA, Ho G, Earley CJ, Allen RP (1998) Iron and the restless legs syndrome. *Sleep* 21:371-377.
- Sweet RD, McDowell FH (1975) Five years' treatment of Parkinson's disease with levodopa. Therapeutic results and survival of 100 patients. *Ann Intern Med* 83:456-463.
- Tandberg E, Larsen JP, Karlsen K (1998) A community-based study of sleep disorders in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 13:895-899.
- Tandberg E, Larsen JP, Karlsen K (1999) Excessive daytime sleepiness and sleep benefit in Parkinson's disease: a community-based study. *Mov Disord* 14:922-927.
- Tang XD, Xu R, Reynolds MF, Garcia ML, Heinemann SH, Hoshi T (2003) Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature* 425:531-535.
- Tass PA, Qin L, Hauptmann C, Dovero S, Bezard E, Boraud T, Meissner WG (2012) Coordinated reset has sustained aftereffects in Parkinsonian monkeys. *Annals of neurology* 72:816-820.
- Teicher MH, Klein DA, Andersen SL, Wallace P (1995) Development of an animal model of fluoxetine akathisia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19:1305-1319.
- Third JL, Ryan MD, Sothorn RB, Dawson S, McCormick JB, Hoffman HS, Gathing A, Jankowski RA, Kania KS, Kanabrocki EL (2006) Circadian distribution of iron and ferritin in serum of healthy and type 2 diabetic males. *Clin Ter* 157:35-40.
- Thobois S, Lhomme E, Klingner H, Ardouin C, Schmitt E, Bichon A, Kistner A, Castrioto A, Xie J, Fraix V, Pelissier P, Chabardes S, Mertens P, Quesada JL, Bosson JL, Pollak P, Broussolle E, Krack P (2013) Parkinsonian apathy responds to dopaminergic stimulation of D2/D3 receptors with pramipexole. *Brain* 136:1568-1577.
- Thompson K, Menzies S, Muckenthaler M, Torti FM, Wood T, Torti SV, Hentze MW, Beard J, Connor J (2003) Mouse brains deficient in H-ferritin have normal iron concentration but a protein profile of iron deficiency and increased evidence of oxidative stress. *J Neurosci Res* 71:46-63.
- Tian H, McKnight SL, Russell DW (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11:72-82.
- Tison F, Crochard A, Leger D, Bouee S, Lainey E, El Hasnaoui A (2005) Epidemiology of restless legs syndrome in French adults: a nationwide survey: the INSTANT Study. *Neurology* 65:239-246.
- Trampus M, Ferri N, Adami M, Ongini E (1993) The dopamine D1 receptor agonists, A68930 and SKF 38393, induce arousal and suppress REM sleep in the rat. *Eur J Pharmacol* 235:83-87.
- Trenkwalder C, Garcia-Borreguero D, Montagna P, Lainey E, de Weerd AW, Tidswell P, Saletu-Zyhlarz G, Telstad W, Ferini-Strambi L (2004) Ropinirole in the treatment of restless legs syndrome: results from the TREAT RLS 1 study, a 12 week, randomised, placebo controlled study in 10 European countries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:92-97.
- Trenkwalder C, Hening WA, Walters AS, Campbell SS, Rahman K, Chokroverty S (1999a) Circadian rhythm of periodic limb movements and sensory symptoms of restless legs syndrome. *Mov Disord* 14:102-110.
- Trenkwalder C, Walters AS, Hening WA, Chokroverty S, Antonini A, Dhawan V, Eidelberg D (1999b) Positron emission tomographic studies in restless legs syndrome. *Mov Disord* 14:141-145.
- Tribl GG, Waldhauser F, Sycha T, Auff E, Zeitlhofer J (2003) Urinary 6-hydroxy-melatonin-sulfate excretion and circadian rhythm in patients with restless legs syndrome. *J Pineal Res* 35:295-296.

- Troster AI (2008) Neuropsychological characteristics of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia: differentiation, early detection, and implications for "mild cognitive impairment" and biomarkers. *Neuropsychol Rev* 18:103-119.
- Trulsson ME, Preussler DW (1984) Dopamine-containing ventral tegmental area neurons in freely moving cats: activity during the sleep-waking cycle and effects of stress. *Exp Neurol* 83:367-377.
- Turjanski N, Lees AJ, Brooks DJ (1999) Striatal dopaminergic function in restless legs syndrome: 18F-dopa and 11C-raclopride PET studies. *Neurology* 52:932-937.
- Uhl GR, Hedreen JC, Price DL (1985) Parkinson's disease: loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions. *Neurology* 35:1215-1218.
- Uitti RJ, Calne DB (1993) Pathogenesis of idiopathic parkinsonism. *Eur Neurol* 33 Suppl 1:6-23.
- Unger EL, Wiesinger JA, Hao L, Beard JL (2008) Dopamine D2 receptor expression is altered by changes in cellular iron levels in PC12 cells and rat brain tissue. *J Nutr* 138:2487-2494.
- van Hilten B, Hoff JI, Middelkoop HA, van der Velde EA, Kerkhof GA, Wauquier A, Kamphuisen HA, Roos RA (1994) Sleep disruption in Parkinson's disease. Assessment by continuous activity monitoring. *Arch Neurol* 51:922-928.
- van Hilten JJ, Kabel JF, Middelkoop HA, Kramer CG, Kerkhof GA, Roos RA (1993) Assessment of response fluctuations in Parkinson's disease by ambulatory wrist activity monitoring. *Acta neurologica Scandinavica* 87:171-177.
- Vanni-Mercier G, Sakai K, Jouvet M (1984) [Specific neurons for wakefulness in the posterior hypothalamus in the cat]. *C R Acad Sci III* 298:195-200.
- Varastet M, Riche D, Maziere M, Hantraye P (1994) Chronic MPTP treatment reproduces in baboons the differential vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons observed in Parkinson's disease. *Neuroscience* 63:47-56.
- Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvvert D, Leger L, Boissard R, Salin P, Peyron C, Luppi PH (2003) A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neurosci* 4:19.
- Vila M, Levy R, Herrero MT, Faucheux B, Obeso JA, Agid Y, Hirsch EC (1996) Metabolic activity of the basal ganglia in parkinsonian syndromes in human and non-human primates: a cytochrome oxidase histochemistry study. *Neuroscience* 71:903-912.
- Vingerhoets FJ, Villemure JG, Temperli P, Pollo C, Pralong E, Ghika J (2002) Subthalamic DBS replaces levodopa in Parkinson's disease: two-year follow-up. *Neurology* 58:396-401.
- Vogin EE, Oser F (1971) Comparative blood values in several species of nonhuman primates. *Lab Anim Sci* 21:937-941.
- Von Economo C (1917) Encephalitis lethargica. *Wiener Klin Wochenschr* 30:581-585.
- Von Economo C (1926) Die Pathologie des Schlafes. In: *Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie*, pp 591-610.
- Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, Anderson GJ (1999) Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 21:195-199.
- Wadsworth GR (1954) Haemoglobin levels of normal men and women living in a tropical climate. *Br Med J* 2:910-911.
- Walters AS, Winkelmann J, Trenkwalder C, Fry JM, Kataria V, Wagner M, Sharma R, Hening W, Li L (2001) Long-term follow-up on restless legs syndrome patients treated with opioids. *Mov Disord* 16:1105-1109.
- Weatherall DB, J. Blakemore, C. of Ludlow, R. Walport, M. (2006) Report of Sir David Weatherall's working group: The use of non-human primates in research.
- Weber M, Lauterburg T, Tobler I, Burgunder JM (2004) Circadian patterns of neurotransmitter related gene expression in motor regions of the rat brain. *Neurosci Lett* 358:17-20.

- Wilkes MM, Babaknia A, Hoff JD, Quigley ME, Kraus PF, Yen SS (1981) Circadian rhythm in circulating concentration of dihydroxyphenylacetic acid in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 52:608-611.
- Wills L, Stewart, A. (1935) Experimental anaemia in monkeys, with special reference to macrocytic nutritional anaemia. *Br J Exp Pathol* 16:444-453.
- Wilson SA (1925) The Croonian lectures on some disorders of motility and muscle tone, with special reference to the corpus striatum. *Lancet* 209:53-62.
- Winkelmann J, Wetter TC, Stiasny K, Oertel WH, Trenkwalder C (1998) Treatment of restless leg syndrome with pergolide--an open clinical trial. *Mov Disord* 13:566-569.
- Wise RA (1978) Catecholamine theories of reward: a critical review. *Brain Res* 152:215-247.
- Wisor JP, Nishino S, Sora I, Uhl GH, Mignot E, Edgar DM (2001) Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *J Neurosci* 21:1787-1794.
- Wu LJ, Leenders AG, Cooperman S, Meyron-Holtz E, Smith S, Land W, Tsai RY, Berger UV, Sheng ZH, Rouault TA (2004) Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. *Brain Res* 1001:108-117.
- Xu M, Koeltzow TE, Santiago GT, Moratalla R, Cooper DC, Hu XT, White NM, Graybiel AM, White FJ, Tonegawa S (1997) Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors. *Neuron* 19:837-848.
- Yamanaka A, Muraki Y, Ichiki K, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T (2006) Orexin neurons are directly and indirectly regulated by catecholamines in a complex manner. *J Neurophysiol* 96:284-298.
- Yehuda S, Youdim MBH., Zamir, N. (1987) Iron deficiency induces increased brain met-enkephalin and dynorphin B and pain threshold in response to opiate peptides. *Br J Pharmacol* 87:44-48.
- Yoshimura M, Furue H (2006) Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *J Pharmacol Sci* 101:107-117.
- Youdim MB (1990) Neuropharmacological and neurobiochemical aspects of iron deficiency. In: *Brain, Behavior and Iron in the Infant Diet*(Dobbing, J., ed) London, UK: Springer-Verlag.
- Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P (1994) The enigma of neuromelanin in Parkinson's disease substantia nigra. *Journal of neural transmission Supplementum* 43:113-122.
- Youdim MB, Ben-Shachar D, Yehuda S (1989) Putative biological mechanisms of the effect of iron deficiency on brain biochemistry and behavior. *Am J Clin Nutr* 50:607-615; discussion 615-607.
- Youdim MB, Green AR (1978) Iron deficiency and neurotransmitter synthesis and function. *Proc Nutr Soc* 37:173-179.
- Youdim MB, Yehuda S (1985) Iron deficiency induces reversal of dopamine dependent circadian cycles: differential response to d-amphetamine and TRH. *Peptides* 6:851-855.
- Zakin MM, Baron B, Guillou F (2002) Regulation of the tissue-specific expression of transferrin gene. *Dev Neurosci* 24:222-226.
- Zareba M, Bober A, Korytowski W, Zecca L, Sarna T (1995) The effect of a synthetic neuromelanin on yield of free hydroxyl radicals generated in model systems. *Biochim Biophys Acta* 1271:343-348.
- Zecca L, Gallorini M, Schunemann V, Trautwein AX, Gerlach M, Riederer P, Vezzoni P, Tampellini D (2001) Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes. *J Neurochem* 76:1766-1773.
- Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR (2004) Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 5:863-873.

- Zhao H, Zhu W, Pan T, Xie W, Zhang A, Ondo WG, Le W (2007) Spinal cord dopamine receptor expression and function in mice with 6-OHDA lesion of the A11 nucleus and dietary iron deprivation. *J Neurosci Res* 85:1065-1076.
- Zhu Y, Hon T, Ye W, Zhang L (2002) Heme deficiency interferes with the Ras-mitogen-activated protein kinase signaling pathway and expression of a subset of neuronal genes. *Cell Growth Differ* 13:431-439.
- Zwart A (1993) Spectrophotometry of hemoglobin: various perspectives. *Clin Chem* 39:1570-1572.

## Résumé

A travers ce projet de recherche nous avons exploré différents aspects d'une dérégulation du système dopaminergique sur les troubles du repos, en prenant pour exemple deux maladies neurologiques : la maladie de Willis-Ekbom (MWE) et la maladie de Parkinson (MP).

La MWE est une maladie neurologique sensorimotrice caractérisée par des douleurs dans les membres inférieurs, s'accompagnant d'un besoin irrésistible de bouger et ce, suivant un profil circadien. Ainsi, le premier volet de ces travaux s'est appliqué à reproduire chez le macaque, les principales altérations du métabolisme du fer et de celui de la dopamine reportées dans la MWE. Tout d'abord, nous avons établi les bases physiologiques des variations circadiennes des concentrations du fer et de ses biomarqueurs au niveau central et périphérique. Puis, nous avons développé un protocole simple, uniquement basé sur des prélèvements sanguins répétés, permettant d'induire efficacement une déplétion en fer sérique et de ses protéines associées. Finalement, ce protocole nous a permis d'explorer les liens entre l'altération de l'homéostasie du fer au niveau du système nerveux central, les perturbations neurochimiques dans différentes structures cérébrales ainsi que les modifications locomotrices qui en résultent.

Le second volet de cette thèse a testé l'impact des agonistes des récepteurs dopaminergiques de type D1 (SKF38393) et D2 (quinpirole), sur les troubles du sommeil dans un modèle macaque de la MP, à l'aide d'enregistrements polysomnographiques. Pour cela, nous avons évalué les effets de ces agents pharmacologiques sur l'émergence de la somnolence diurne et sur l'altération du sommeil paradoxal, induits par une intoxication au MPTP. Nos résultats mettent en évidence que le quinpirole est inefficace pour restaurer les niveaux de base de ces deux paramètres. En revanche, le SKF38393 permet une diminution notable de la somnolence diurne ainsi qu'une restauration du sommeil paradoxal.

Finalement, les perturbations monoaminergiques liées à la déplétion en fer ouvrent de multiples perspectives de recherche sur la physiopathologie de la MWE. De même, l'amélioration des troubles veille-sommeil par l'agoniste des récepteurs D1, offre de nouvelles pistes thérapeutiques quant à la prise en charge des troubles du repos dans la MP. L'ensemble de nos résultats apporte un niveau de compréhension supplémentaire quant au rôle de la dopamine dans les altérations du repos.

**Mots clefs** : Maladie de Willis-Ekbom ; Maladie de Parkinson ; Primate non-humain ; Fer ; Dopamine ; Sérotonine ; Troubles du Sommeil ; Somnolence Diurne Excessive ; Sommeil Paradoxal ; MPTP ; Récepteurs Dopaminergiques.

## Abstract

During this thesis project we explored several aspects of the impact of a dopaminergic system dysregulation on the rest alterations, through two neurological diseases: the Willis-Ekbom's disease (WED) and Parkinson's diseases (PD). The WED is a neurological sensorimotor disorder mainly characterized by pain in lower limbs. It preferentially appears in the evening and transiently and partially is alleviated by motor activity.

Thus, the first part of this work aimed at reproducing the main dysfunctions of the iron and dopaminergic metabolisms observed in WED, in the macaque monkey. We first established the circadian variations of iron-indicator concentrations in serum and cerebrospinal fluid. Then we developed a rapid protocol based on repeated blood withdrawals, allowing to efficiently induce serum iron depletion. Finally, this protocol enabled us to investigate the relationship between iron metabolism dysfunctions, neurochemical alterations and the subsequent locomotor behavioural changes.

In the second part, of this research project we examined the impact of selective D1 (SKF38393) and D2 (quinpirole) receptor agonists on the sleep impairments in a macaque model of PD using the polysomnographic recording technique. Thus we investigated the effects of these two pharmacological compounds on the daytime sleepiness and on the paradoxical sleep induced by MPTP intoxication. Our results demonstrated the inefficacy of quinpirole to restore these two altered sleep parameters. By contrast, SKF38393 significantly decreased daytime napping and substantially restored paradoxical sleep.

Finally, the monoaminergic dysregulations, induced by iron depletion, may offer multiple perspectives to unravel the WED pathophysiology. In the same line, the beneficial effects exhibited by the D1 receptor agonist bring new therapeutic avenues to treat sleep-wake disorders in PD. Together, the global results bring new insights in the underlying mechanisms of sleep impairment involving dopamine.

**Key words** : Willis-Ekbom's disease; Parkinson's disease; Non-Human Primate; Iron; Dopamine; Serotonin; Sleep disorders; Excessive Daytime Sleepiness; Paradoxical Sleep; MPTP; Dopaminergic Receptors.