

2011.3184.5

Université de Montréal

**Étude des effets cardiovasculaires et comportementaux  
des tachykinines dans l'aire tegmentale ventrale chez le rat**

Par

**Kathleen Deschamps**

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie

Décembre 2003

© Kathleen Deschamps, 2003



W

4

U58

2004

V.082

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude des effets cardiovasculaires et comportementaux  
des tachykinines dans l'aire tegmentale ventrale chez le rat**

présenté par :

**Kathleen Deschamps**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Moreau  
président-rapporteur

Réjean Couture  
directeur de recherche

Louis-Éric Trudeau  
membre du jury

Mémoire accepté le :

## Résumé

Les tachykinines sont impliquées dans les mécanismes centraux de régulation cardiovasculaire et de l'activité motrice comportementale. Nous émettons l'hypothèse que l'aire tegmentale ventrale (ATV) participe à ces fonctions. Le principal objectif de ce mémoire est de déterminer les effets cardiovasculaires des tachykinines dans l'ATV chez le rat. La stimulation de l'ATV par microinjection de doses croissantes (1 à 1000 pmoles) d'agonistes sélectifs des trois récepteurs des tachykinines induit des effets cardiovasculaires et comportementaux. L'activation des récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> induit des effets presseurs et des tachycardies; cependant, les effets cardiovasculaires induits par l'agoniste NK<sub>3</sub> sont plus marqués à faibles doses. L'activation des récepteurs NK<sub>2</sub> entraîne soit des tachycardies ou des bradycardies sans modification de la pression artérielle. Les comportements induits par l'agoniste NK<sub>3</sub> (reniflement = brassage de la litière < toilette de la tête < grattage de la tête < exploration < secousses corporelles) sont en nombre et en intensité plus forts que ceux induits par les agonistes NK<sub>1</sub> (toilette de la tête = reniflement < secousses corporelles) et NK<sub>2</sub> (grattage de la tête < secousses corporelles).

La caractérisation des récepteurs aux tachykinines à l'aide d'antagonistes sélectifs confirme les différentes données suggérant la présence des trois récepteurs dans l'ATV. Cette étude pharmacologique *in vivo* appuie l'hypothèse que l'ATV, en plus de jouer un rôle important dans le contrôle de l'activité comportementale, est impliquée par le biais des tachykinines dans la régulation autonome de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque chez le rat éveillé et non restreint.

**Mots clés :** Tachykinines; récepteurs NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> des tachykinines; régulation cardiovasculaire; comportements; aire tegmentale ventrale; système dopaminergique mésocorticolimbique

## Summary

Compelling evidence suggests that tachykinins are involved in the central mechanisms of cardiovascular and behavioural regulation. We hypothesize that the ventral tegmental area (VTA) participates to these tachykinin functions. Hence, the main objective of this work is to determine the cardiovascular effects of tachykinins in the rat VTA. The microinjection of increasing doses (1 to 1000 pmols) of selective NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> tachykinin receptor agonists in the VTA induces cardiovascular and behavioural effects. The activation of NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptors produces pressor effects and tachycardia, yet the cardiovascular effects induced by the NK<sub>3</sub> agonist are the most pronounced at low doses. The NK<sub>2</sub> receptor activation produces either tachycardia or bradycardia without significant changes in blood pressure. In contrast with the behaviours induced by the NK<sub>1</sub> (face washing = sniffing < wet dog shake) and NK<sub>2</sub> agonists (head scratching < wet dog shake), those induced by the NK<sub>3</sub> agonist (sniffing = digging < face washing < head scratching < rearing < wet dog shake) are more numerous and of higher intensity.

The use of highly selective tachykinin receptor antagonists to characterize the effects of each agonist confirms the presence of the three receptors in the ventral tegmental area. This pharmacological *in vivo* study provides the first evidence suggesting that the ventral tegmental area partakes via tachykinins in the central autonomic control of arterial blood pressure and heart rate in awaked and unrestrained rats in addition to its well established function in behaviour.

**Keywords:** Tachykinins; tachykinin NK<sub>1</sub>; NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors; cardiovascular regulation; behaviours; ventral tegmental area; mesocorticolimbic dopaminergic system

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xvi
DÉDICACE	xx
REMERCIEMENTS	xxi

**PREMIER CHAPITRE****INTRODUCTION**

Introduction générale	2
1.0 Introduction	5
1.1 Historique et origine des tachykinines	5
1.2 Synthèse et dégradation des tachykinines	8
1.2.1 Synthèse	8
1.2.2 Dégradation	11
1.3 Récepteurs des tachykinines	13
1.3.1 Identification de trois récepteurs pour les tachykinines	13
1.3.2 Biologie moléculaire des récepteurs	14
1.3.3 Agonistes et antagonistes	17
1.3.3.1 Récepteurs NK <sub>1</sub>	17
1.3.3.2 Récepteurs NK <sub>2</sub>	20
1.3.3.3 Récepteurs NK <sub>3</sub>	21

1.3.4	Sous-types de récepteurs	25
1.3.5	Voies de signalisation intracellulaires	29
1.3.6	Désensibilisation des récepteurs	31
1.4	Actions des tachykinines en périphérie	32
1.4.1	Système cardiovasculaire	32
1.4.2	Voies respiratoires	33
1.4.3	Tractus gastro-intestinal	34
1.5	Actions des tachykinines dans la moelle épinière	34
1.6	Actions centrales des tachykinines	36
1.6.1	Modulation de la prise d'eau et de l'appétit au sel	36
1.6.2	Mémoire et apprentissage	37
1.6.3	Comportements stéréotypés	38
1.6.4	Régulation cardiovasculaire	39
2.0	L'aire tegmentale ventrale	42
2.1	Localisation dans le système nerveux central	42
2.2	Principaux récepteurs et neurotransmetteurs	42
2.3	Efférences et afférences neuronales	46
2.3.1	Principales efférences	46
2.3.2	Principales afférences	47
2.4	Rôles fonctionnels de l'aire tegmentale ventrale	50
2.4.1	Régulation de l'activité locomotrice	50
2.4.2	Sevrage et dépendance aux drogues	52
2.4.3	Implication dans le stress	52
2.4.4	Régulation cardiovasculaire	53
3.0	Objectifs généraux du mémoire	57

## DEUXIÈME CHAPITRE

### ARTICLE : THE VENTRAL TEGMENTAL AREA AS A PUTATIVE TARGET FOR TACHYKININS IN CARDIOVASCULAR REGULATION

1.0 Summary	59
2.0 Introduction	61
3.0 Methods	64
3.1 Animal source and care	64
3.2 Animal preparation	64
3.3 Measurement of cardiovascular parameters	66
3.4 Measurement of behavioural parameters	66
3.5 Histology	67
3.6 Experimental protocols	
3.6.1 Dose-response curves to VTA microinjection of selective tachykinin agonist	67
3.6.2 Effects of VTA microinjection of selective tachykinin antagonists	68
3.7 Drugs and solutions	69
3.8 Statistical analysis of data	70
4.0 Results	71
4.1 Cardiovascular effects of the NK <sub>1</sub> agonist, [Sar <sup>9</sup> , Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]SP	71
4.2 Cardiovascular effects of the NK <sub>2</sub> agonist, [β-Ala <sup>8</sup> ]NKA (4-10)	71
4.3 Cardiovascular effects of the NK <sub>3</sub> agonist, Senktide	72
4.4 Behavioural responses to tachykinin agonists	73
4.5 Effects of LY 303870 on cardiovascular responses induced by [Sar <sup>9</sup> , Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]SP and Senktide	73
4.6 Effects of SR 48968 on cardiovascular responses induced by [β-Ala <sup>8</sup> ]NKA (4-10) and [Sar <sup>9</sup> , Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]SP	74

4.7 Effects of SB 235375 on cardiovascular responses induced by senktide and [ $\beta$ -Ala <sup>8</sup> ]NKA (4-10)	75
4.8 Effects of tachykinin antagonists on tachykinin agonists- induced behavioural activity	75
5.0 Discussion	77
6.0 Conclusion	81
Acknowledgements	82
7.0 References	83
8.0 Tables and figures	95

**TROISIÈME CHAPITRE****DISCUSSION GÉNÉRALE**

1.0 Pertinence du modèle utilisé	115
2.0 Effets cardiovasculaires et comportementaux induits par l'agoniste NK <sub>1</sub> , [Sar <sup>9</sup> , Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]SP dans l'ATV	116
3.0 Effets cardiovasculaires et comportementaux induits par l'agoniste NK <sub>2</sub> , [β-Ala <sup>8</sup> ]NKA (4-10) dans l'ATV	119
4.0 Effets cardiovasculaires et comportementaux induits par l'agoniste NK <sub>3</sub> , senktide dans l'ATV	124
4.1 Hypothèse du mécanisme central de l'agoniste NK <sub>3</sub> , senktide	126
5.0 Maladies neurodégénératives	130
6.0 Limitations de l'étude et perspectives d'avenir	134
<b>CONCLUSION</b>	<b>136</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>137</b>

**LISTE DES TABLEAUX****PREMIER CHAPITRE : INTRODUCTION**

	<b>Page</b>
<b>Tableau I</b>	<b>7</b>
Tachykinines endogènes chez les mammifères	
<b>Tableau II</b>	<b>18</b>
Agonistes des récepteurs NK <sub>1</sub> des tachykinines	
<b>Tableau III</b>	<b>19</b>
Affinité et sélectivité des antagonistes des récepteurs NK <sub>1</sub> des tachykinines	
<b>Tableau IV</b>	<b>22</b>
Affinité et sélectivité des antagonistes des récepteurs NK <sub>2</sub> des tachykinines	
<b>Tableau V</b>	<b>24</b>
Affinité et sélectivité des antagonistes des récepteurs NK <sub>3</sub> des tachykinines	

**DEUXIÈME CHAPITRE : ARTICLE : THE VENTRAL TEGMENTAL AREA AS A  
PUTATIVE TARGET FOR TACHYKININS IN CARDIOVASCULAR REGULATION**

	<b>Page</b>
<b>Table I</b>	<b>95</b>
Selectivity of the inhibitory effects of tachykinin antagonists	
<b>Table II</b>	<b>96</b>
Influence of antagonist vehicles or enantiomer on the cardiovascular responses to agonists	

**LISTE DES FIGURES****PREMIER CHAPITRE : INTRODUCTION**

	<b>Page</b>
<b>Figure 1</b> ARNm $\alpha$ -PPT, $\beta$ -PPT et $\gamma$ -PPT encodant la substance P, la neurokinine A, le neuropeptide K et le neuropeptide $\gamma$	<b>9</b>
<b>Figure 2</b> Peptidases impliquées dans la dégradation de la substance P	<b>12</b>
<b>Figure 3</b> Représentation schématique du récepteur NK <sub>1</sub> des tachykinines chez le rat et l'homme	<b>15</b>
<b>Figure 4</b> Illustration des deux conformères actifs du récepteur NK <sub>1</sub> des tachykinines	<b>26</b>
<b>Figure 5</b> Localisation de l'aire tegmentale ventrale dans le système nerveux central	<b>43</b>
<b>Figure 6</b> Représentation schématique et nature des principales projections de l'aire tegmentale ventrale riches en dopamine (A), moyennement riches en dopamine (B), pauvres en dopamine (C)	<b>48</b>

**DEUXIÈME CHAPITRE : ARTICLE : THE VENTRAL TEGMENTAL AREA AS A  
PUTATIVE TARGET FOR TACHYKININS IN CARDIOVASCULAR REGULATION**

	<b>Page</b>
<b>Figure 1</b>	<b>98</b>
Identification of a microinjection site in the VTA following post-mortem histological examination of microinjected Evan's blue.	
<b>Figure 2</b>	<b>100</b>
Maximal changes and time-course effects on mean arterial pressure ( $\Delta$ MAP) and heart rate ( $\Delta$ HR) following five increasing doses of [Sar <sup>9</sup> , Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ] SP in the VTA.	
<b>Figure 3</b>	<b>102</b>
Original traces showing blood pressure (BP) and heart rate (HR) changes induced by VTA microinjection of (A) vehicle (aCSF), (B) [Sar <sup>9</sup> , Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ] SP (10 pmol), (C) [ $\beta$ -Ala <sup>8</sup> ] NKA (4-10) (25 pmol) and (D) senktide (25 pmol) in freely moving rats.	
<b>Figure 4</b>	<b>104</b>
Maximal changes and time-course effects on mean arterial pressure ( $\Delta$ MAP) and heart rate ( $\Delta$ HR) following five increasing doses of [ $\beta$ -Ala <sup>8</sup> ] NKA (4-10) in the VTA.	
<b>Figure 5</b>	<b>106</b>
Maximal changes and time-course effects on mean arterial pressure ( $\Delta$ MAP) and heart rate ( $\Delta$ HR) following five increasing doses of senktide in the VTA.	

	<b>Page</b>
<b>Figure 6</b>	<b>108</b>
Bar graphs showing changes in behavioural activity induced by VTA microinjection of [Sar <sup>9</sup> , Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ] SP, [β-Ala <sup>8</sup> ] NKA (4-10) and senktide at 1, 10 and 25 pmol during the first 30 min post-injection period in conscious rats.	
<b>Figure 7</b>	<b>110</b>
Time course effects on changes in mean arterial pressure (Δ MAP) and heart rate (Δ HR) responses induced by [Sar <sup>9</sup> , Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ] SP (10 pmol), [β-Ala <sup>8</sup> ] NKA (4-10) (25 pmol), senktide (25 pmol) injected in the VTA before or after their respective antagonist.	
<b>Figure 8</b>	<b>112</b>
Bar graphs showing changes in behavioural activity induced by (a) [Sar <sup>9</sup> , Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ] SP (10 pmol) and [β-Ala <sup>8</sup> ] NKA (4-10) (25 pmol) following the injection of their respective antagonist: LY 303870 (5 nmol) and SR 48968 (250 pmol) (b) senktide (25 pmol) following the injection of SB 235375 (25 nmol) during the first 30 min post-injection period in conscious rats.	

**TROISIÈME CHAPITRE : DISCUSSION GÉNÉRALE**

	<b>Page</b>
<b>Figure 7</b>	<b>120</b>
Hypothèse sur la localisation des récepteurs NK1 dans les voies neuronales activées par l'injection de [Sar <sup>9</sup> ,Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]SP dans l'aire tegmentale ventrale	
<b>Figure 8</b>	<b>123</b>
Hypothèse sur la localisation des récepteurs NK2 dans la voie neuronale activée lors de la bradycardie induite par l'injection de [β-Ala <sup>8</sup> ]NKA (4-10) dans l'aire tegmentale ventrale	
<b>Figure 9</b>	<b>128</b>
Hypothèse sur les voies neuronales activées lors des effets cardiovasculaires induits par l'injection de senktide dans l'aire tegmentale ventrale	
<b>Figure 10</b>	<b>131</b>
Effets cardiovasculaires maximaux induits par l'injection d'un antagoniste NK <sub>3</sub> (SB 222200, 500 pmoles) et l'énantiomère inactif (SB 222201, 500 pmoles) dans l'ATV chez le rat SHR	

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>AA</b>	Acide arachidonique
<b>AC</b>	Noyau central de l'amygdale
<b>ACC</b>	Nucleus accumbens
<b>aCSF</b>	Artificial cerebrospinal fluid
<b>Ach</b>	Acétylcholine
<b>AD</b>	Anterodorsal thalamus
<b>AM</b>	Amygdale/amygdala
<b>AMPc</b>	Adénosine-monophosphate cyclique
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance
<b>APit</b>	Anterior lobe of pituitary
<b>ATV/VTA</b>	Aire tegmentale ventrale/ventral tegmental area
<b>BP</b>	Blood pressure
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CB</b>	Cerebellum
<b>CD</b>	Cathepsin D
<b>CG</b>	Central gray
<b>CHO</b>	Chinese hamster ovary
<b>CING</b>	Cingulate cortex
<b>CPE/PRF</b>	Cortex préfrontal/prefrontal cortex
<b>DA</b>	Dopamine
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>DMSO</b>	Diméthylsulphoxide
<b>DOCA-sel</b>	Déoxycorticostérone acétate-sel
<b>DPIV</b>	Dipeptidyl aminopeptidase
<b>DR</b>	Dorsal raphe
<b>DT/VT</b>	Dorsal/ventral tegmental nucleus of Gudden

<b>EC</b>	Entorhinal cortex
<b>ECA</b>	Enzyme de conversion de l'angiotensine
<b>ECCT</b>	Enzyme clivant l'extrémité C-terminale
<b>EDSP</b>	Enzyme de dégradation de la substance P
<b>FC</b>	Fréquence cardiaque
<b>GABA</b>	Acide gamma-aminobutyrique
<b>HB</b>	Noyau de l'habénula
<b>HEK</b>	Human embryonic kidney
<b>HP</b>	Hypothalamus postérieur
<b>HPC</b>	Hippocampus
<b>HR</b>	Heart rate
<b>5-HT</b>	5-Hydroxytryptamine (sérotonine)
<b>i.c.v.</b>	Intracérébroventriculaire
<b>IML</b>	Colonne intermédiolatérale
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol triphosphate
<b>i.v.</b>	Intraveineux
<b>K<sup>+</sup></b>	Potassium
<b>LC</b>	Locus coeruleus
<b>LH</b>	Lateral hypothalamic area
<b>LHAB</b>	Lateral habenula
<b>MAP</b>	Mean arterial blood pressure
<b>MD</b>	Mediodorsal thalamus
<b>MH</b>	Medial hypothalamus
<b>MR</b>	Median raphe
<b>MS</b>	Microinjection site
<b>min</b>	Minute
<b>MRVL</b>	Médulla rostro-ventro-latérale

<b>NA</b>	Noradrénaline
<b>NAC</b>	Noyau accumbens
<b>NBST/BNST</b>	Noyau basal de la strie terminale/basal nucleus of stria terminalis
<b>NEP</b>	Endopeptidase neutre
<b>NGF</b>	Nerve growth factor
<b>NK</b>	Neurokinine
<b>NKA</b>	Neurokinine A
<b>NKB</b>	Neurokinine B
<b>NMDA</b>	N-méthyl-D-aspartate
<b>NP<math>\gamma</math></b>	Neuropeptide $\gamma$
<b>NPK</b>	Neuropeptide K
<b>NT</b>	Neurotensine
<b>NFS</b>	Noyau du faisceau solitaire
<b>Occ</b>	Occipital cortex
<b>6-OHDA</b>	6-Hydroxydopamine
<b>ON</b>	Olfactory nuclei
<b>PA</b>	Pression artérielle
<b>PBP</b>	Parabranchial pigmented nucleus
<b>PiP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>PN</b>	Paranigral nucleus
<b>PPCE</b>	Propyl endopeptidase
<b>PPT</b>	Préprotachykinine
<b>R</b>	Red nucleus
<b>Re</b>	Nucleus reunions
<b>Rg</b>	Retrospeñial granular cortex

<b>RPC</b>	Red nucleus parvicellular part
<b>REM</b>	Rapid eye movement
<b>s.c.</b>	Subcutaneous
<b>SHR</b>	Rat spontanément hypertendu
<b>SI</b>	Substantia innominata
<b>SL/LS</b>	Septum latéral/lateral septum
<b>Sml</b>	First somatosensory cortex
<b>SN</b>	Substance noire
<b>SNCP</b>	Substantia nigra compacta, part dorsal
<b>SNR</b>	Substantia nigra reticular part
<b>SO</b>	Supraoptic nucleus
<b>SP</b>	Substance P
<b>STR</b>	Neostriatum
<b>TD</b>	Diagonal band of Broca
<b>TO</b>	Tuberculum olfactorium
<b>TRP</b>	Transient receptor potential
<b>WKY</b>	Wistar Kyoto

Ce n'est pas dans la connaissance qu'est le bonheur,  
mais dans l'acquisition de la connaissance.

Edgar Allan Poe

À Alexandre

## REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de recherche, Dr Réjean Couture, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Durant ces deux dernières années j'ai eu l'occasion à maintes reprises d'apprécier ses connaissances scientifiques, son enthousiasme et son dynamisme en recherche. Je le remercie pour sa grande disponibilité et ses conseils judicieux. J'ai reçu une formation scientifique exceptionnelle et pour cela je tiens à lui dire merci.

Au cours de ces deux années, j'ai rencontré des personnes extraordinaires avec lesquelles j'ai échangé autant sur le plan scientifique que personnel. Je voudrais tout d'abord remercier pour ses conseils et sa grande patience, Andrée Lessard qui m'a apprise toutes les techniques chirurgicales et les protocoles expérimentaux. Je remercie aussi mes collègues de laboratoire Calin Lungu, Brice Ongali, Mihaï Petcu, Jenny Pena Dias, Rose-Marie Vianna, Maria Martha Campos, Donata Rodi et Jonathan Brouillette pour leur soutien et leur compagnie grandement appréciés. Un merci particulier à Marlène Laurin et Frank Cloutier pour tous leurs encouragements, les bons moments passés ensemble et leur amitié précieuse.

Je tiens à remercier du fond du cœur mon conjoint Alexandre Poirier, ma mère Gaétane Poulin et mon père Dave Doucet qui ont toujours été là pour moi. C'est grâce à vos encouragements et parce que vous avez cru en moi que j'ai persévéré et passé à travers les moments difficiles. Je tiens aussi à remercier Claudette, Florio, France et Simon qui m'ont encouragée tout au long de ma maîtrise.

Un grand merci aussi aux secrétaires du département de physiologie de l'Université de Montréal ainsi qu'à Claude Gauthier, Robert Cartier, Pierrette Fournel et aux animaliers pour leurs nombreux services et l'aide technique apportée.

# **PREMIER CHAPITRE**

## **INTRODUCTION**

## Introduction générale

Les tachykinines sont des neuropeptides retrouvés dans tout le règne animal. Chez les mammifères, cette famille comprend la substance P (SP), la neurokinine A (NKA), la neurokinine B (NKB), le neuropeptide K (NPK) et le neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ). Distribuées à la fois dans le système nerveux central et périphérique, les tachykinines exercent un large spectre d'effets biologiques via l'activation de trois types de récepteurs couplés aux protéines G nommés NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub>. La large distribution de ces neuropeptides dans le système nerveux central leur confère un rôle dans plusieurs fonctions essentielles telles que l'apprentissage, la mémoire et les processus émotionnels incluant les comportements stéréotypés, l'anxiété, le stress et la douleur. Aussi, les tachykinines sont connues pour exercer un contrôle central sur plusieurs fonctions du système nerveux autonome (Severini et al., 2002).

Plusieurs études suggèrent un rôle pour les tachykinines dans les mécanismes centraux de régulation cardiovasculaire. En effet, l'administration d'agonistes des récepteurs des tachykinines dans les ventricules cérébraux (i.c.v.) induit des augmentations de pression artérielle et de fréquence cardiaque accompagnées de comportements stéréotypés (Takano et al., 1990; Picard et al., 1994). Ces effets cardiovasculaires sont tributaires de l'activation du système nerveux sympathique et de la relâche accrue de vasopressine par la neurohypophyse (Unger et al., 1981; Polidori et al., 1989; Takano et al., 1990). Cependant, les différents circuits neuronaux impliqués dans les effets cardiovasculaires et comportementaux des tachykinines sont encore très peu connus. Certaines études suggèrent que le système dopaminergique est impliqué. En effet, on a rapporté que l'injection d'agonistes des récepteurs des tachykinines dans la substance noire, un centre

dopaminergique important, stimule la fonction cardiaque chez le rat éveillé et non restreint (Lessard et Couture, 2001). De plus, les effets cardiovasculaires observés suite à l'injection i.c.v. d'un agoniste NK<sub>3</sub> chez le rat éveillé sont bloqués par l'administration périphérique d'un antagoniste D<sub>2</sub> de la dopamine (Cellier et Couture, 1997).

Un autre centre dopaminergique important est l'aire tegmentale ventrale (ATV) située au niveau du mésencéphale et composée majoritairement de neurones dopaminergiques formant l'aire A10. De par ses projections dans le système limbique et le cortex cérébral, l'ATV est plutôt reconnue pour son rôle dans la régulation de l'activité comportementale en réponse au stress et elle serait impliquée dans la dépendance et le sevrage aux drogues. L'ATV est aussi impliquée dans le processus de renforcement d'un comportement (Le Moal et Simon, 1991). Cependant, de plus en plus de faits expérimentaux suggèrent un rôle dans le contrôle cardiovasculaire. Par exemple, une stimulation électrique ou chimique (avec un analogue de la SP) de l'ATV produit une augmentation de la pression artérielle (Cornish et van den Buuse, 1994). Des différences dans la densité des récepteurs dopaminergiques ont aussi été montrées dans les régions innervées par l'ATV chez les rats hypertendus (Le Fur et al., 1981; Kirouac et Ganguly, 1993).

Bien que des données suggèrent la présence des récepteurs des tachykinines dans l'ATV, peu d'information existe quant à l'effet de leur activation sur le système cardiovasculaire. Ce mémoire vise donc en premier lieu à caractériser les effets cardiovasculaires et comportementaux des tachykinines dans l'ATV à l'aide d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> chez le rat Wistar normotendu. Ceci nous permet d'évaluer, d'une part, la participation relative de chacun des récepteurs des tachykinines

dans les effets cardiovasculaires et comportementaux et, d'autre part, d'évaluer l'implication globale de l'ATV dans les effets centraux (i.c.v.) des tachykinines. Aussi, suite aux résultats obtenus avec cette approche pharmacologique, des hypothèses pourront être émises quant au rôle physiologique possible des tachykinines dans l'ATV.

Pour atteindre cet objectif, nous avons choisi le modèle du rat éveillé et non restreint qui offre plusieurs avantages. En plus de permettre de mesurer les comportements induits par les agonistes, ce modèle permet d'exclure les effets confondants de l'anesthésie et du stress induit par l'immobilisation. Notre approche expérimentale consiste à administrer les agonistes et les antagonistes des tachykinines via une canule préalablement implantée dans l'ATV. L'enregistrement de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque en continu est réalisé grâce à un cathéter inséré dans l'aorte via l'artère fémorale, lequel est extériorisé à la nuque et relié à un capteur de pression.

## 1.0 Introduction

### 1.1 Historique et origine des tachykinines

En 1931, von Euler et Gaddum découvrirent dans un extrait tissulaire de cerveau et d'intestin de cheval, un agent hypotenseur qui induisait également une contraction résistante à l'atropine sur l'intestin. Ils appelèrent cet agent, substance P, faisant ainsi référence à la poudre obtenue suite aux procédures d'extraction. Par la suite, il y a eu plusieurs tentatives de purification de la substance P, mais ce n'est qu'au début des années 70 que l'équipe de Chang procéda à sa caractérisation chimique complète suite à son isolation à partir d'un extrait d'hypothalamus bovin (Chang et Leeman, 1970). Le séquençage a permis de découvrir que la substance P est un peptide de 11 acides aminés : H-Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Lys<sup>3</sup>-Pro<sup>4</sup>-Gln<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-Gly<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>-Met<sup>11</sup>-NH<sub>2</sub> (Chang et al., 1971). Suite à cette découverte, on a pu constater que la substance P est chez les mammifères ce que l'élédoisine, la physalaémine et la kassinine, découvertes par Erspamer et son équipe (pour une revue voir Erspamer, 1981) sont chez les non-mammifères, soit des peptides ayant la capacité d'induire une contraction rapide et transitoire des muscles lisses. Ces peptides partagent à leur extrémité C-terminale la séquence d'acides aminés Phe-Xaa-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>. Ces caractéristiques communes ont permis de regrouper ces peptides sous l'appellation de tachykinines qui signifie au sens littéraire « action rapide » sur le muscle lisse.

Plus d'une décennie s'est écoulée avant que l'existence de la neurokinine A (NKA) et de la neurokinine B (NKB), deux autres tachykinines présentes chez les mammifères, soit rapportée. Cependant, puisqu'elles ont été découvertes par plusieurs équipes indépendantes, leurs appellations d'origine étaient différentes. En effet, en 1983 Nawa et son équipe ont

identifié le peptide additionnel contenu dans l'ARNm du précurseur de la SP comme étant la substance K. Aussi, la substance K fut isolée à partir de moelles épinières bovines (Maggio et al, 1985). En parallèle, la neuromédine K et la neuromédine L ont été isolées à partir de moelles épinières de porcs (Kangawa et al., 1983; Minamino et al., 1984) de même que la neurokinine  $\alpha$  et la neurokinine  $\beta$  par l'équipe de Kimura (Kimura et al., 1984). Toutes ces tachykinines avaient une séquence d'acides aminés et une activité biologique très semblables à celles de la SP et de la kassinine. Finalement, ce n'est qu'en 1986, lors d'un symposium international tenu à Montréal sur les tachykinines qu'on s'accorda sur la nomenclature à utiliser pour identifier ces deux nouvelles tachykinines (Henry et al., 1987). La substance K, la neurokinine  $\alpha$  et la neuromédine L étaient dorénavant appelées neurokinine A, tandis que la neurokinine  $\beta$  et la neuromédine K étaient appelées neurokinine B.

Finalement, vers la fin des années 80, deux autres tachykinines ont été découvertes chez les mammifères soit le neuropeptide K et le neuropeptide  $\gamma$  isolés respectivement du cerveau de porc (Tatemoto et al., 1985) et de l'intestin de lapin (Kage et al., 1988). Ces deux dernières tachykinines proviennent du même gène (préprotachykinine A) qui encode la SP et la NKA. Elles sont identifiées comme étant les formes allongées (à l'extrémité N-terminale) de la NKA (Tableau I, p. 7).

**Tableau I:** Tachykinines endogènes chez les mammifères

Tachykinines	Séquences d'acides aminés	Références
Substance P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Chang et Leeman, 1970
Neurokinine A	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Nawa et al., 1984
Neurokinine B	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Kangawa et al., 1983
Neuropeptide K	Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Lys-Ala-Leu-Tyr-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Tatemoto et al., 1985
Neuropeptide $\gamma$	Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-Ile-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Kage et al., 1988

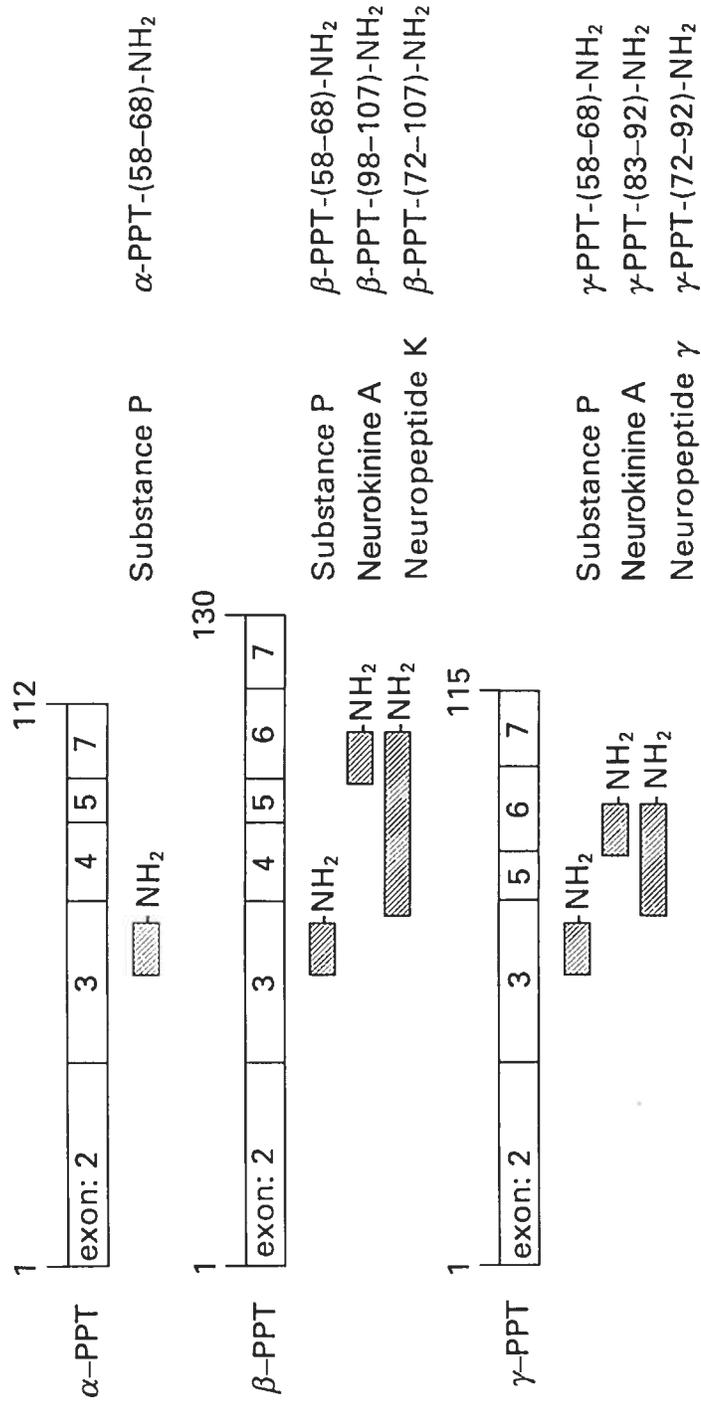
## 1.2 Synthèse et dégradation des tachykinines

### 1.2.1 Synthèse

Deux gènes chez les mammifères sont à l'origine de toutes les tachykinines connues jusqu'à maintenant. Le gène préprotachykinine A (PPT A) encode la SP, la NKA et ses deux formes allongées, NPK et NP $\gamma$  (Carter et Krause, 1990), tandis que le gène préprotachykinine B (PPT B) encode la NKB uniquement (Bonner et al., 1987). Par épissage alternatif, le gène PPT A qui contient 7 exons donne lieu à trois ARNm distincts soit  $\alpha$  PPT-A,  $\beta$  PPT-A et  $\gamma$  PPT-A (Figure 1, p.9). La SP qui est encodée dans l'exon 3 est traduite par chacun des ARNm, tandis que la NKA qui est encodée dans l'exon 6 n'est traduite qu'à partir des ARNm  $\beta$  PPT-A et  $\gamma$  PPT-A. Même si les ARNm  $\beta$  PPT-A et  $\gamma$  PPT-A produisent tous les deux la SP et la NKA, ils se distinguent entre eux par la traduction des deux formes allongées de la NKA. En effet, le NPK dérive des exons 3 et 6 de la  $\beta$  PPT-A, tandis que le NP $\gamma$  provient plutôt des exons 3, 5 et 6 de la  $\gamma$  PPT-A (Helke et al., 1990). La synthèse de la NKB est beaucoup moins complexe. En effet, le gène PPT-B est transcrit en deux ARNm encodant la NKB uniquement.

Les neurokinines sont libérées de leur précurseur par l'action de protéases appelées convertases qui agissent au niveau de doublets de résidus cationiques. Par la suite, il y a amidation de l'extrémité COOH-terminale qui est essentiel à l'activité biologique (Harrison et Geppetti, 2001). On pense que ces mécanismes post-traductionnels ont lieu dans l'appareil de Golgi et dans les vésicules synaptiques du neurone (Krause et al., 1989).

**Figure 1 :** ARNm  $\alpha$ -PPT,  $\beta$ -PPT et  $\gamma$ -PPT encodant la substance P, la neurokinine A, le neuropeptide K et le neuropeptide  $\gamma$



Adapté de Krause et al., 1989

La synthèse des neurokinines se déroule dans des ribosomes et elle est confinée aux corps cellulaires des neurones. Les neurokinines sont par la suite emmagasinées dans de larges vésicules et acheminées par transport axonal à la terminaison nerveuse où une stimulation adéquate provoque leur relâche.

Plusieurs étapes sont nécessaires à la synthèse des tachykinines et par conséquent la régulation de leur expression peut se faire à différents niveaux. Un endroit possible de régulation est au niveau de la transcription. Dans la région du promoteur, il est bien connu que des facteurs de transcription peuvent lier des séquences particulières de nucléotides, activer la polymérase II et ainsi stimuler la transcription de différents gènes. Des études ont permis d'identifier des séquences particulières de nucléotides dans la région du promoteur du gène PPT-A qui confèrent une sensibilité particulière à l'AMPc, à l'estrogène et au « nerve growth factor » (NGF) (Helke et al., 1990; Carter et Krause, 1990). D'autres études ont d'ailleurs suggéré la régulation du gène PPT-A par l'estrogène dans l'hypothalamus (Brown et al., 1990) et par le NGF dans des neurones sensoriels (Lindsay et Harmar 1989). La quantité d'ARNm encodant les tachykinines peut aussi varier selon les stimuli. Dans le striatum, par exemple, l'administration d'agonistes et d'antagonistes dopaminergiques altère la quantité d'ARNm PPT (Bannon et al., 1986; Haverstick et al., 1989a, b). Aussi, un stimulus douloureux tel que l'injection de formaline dans la patte arrière chez le rat augmente l'expression de l'ARNm PPT-A dans les ganglions de la racine dorsale (Noguchi et al., 1988).

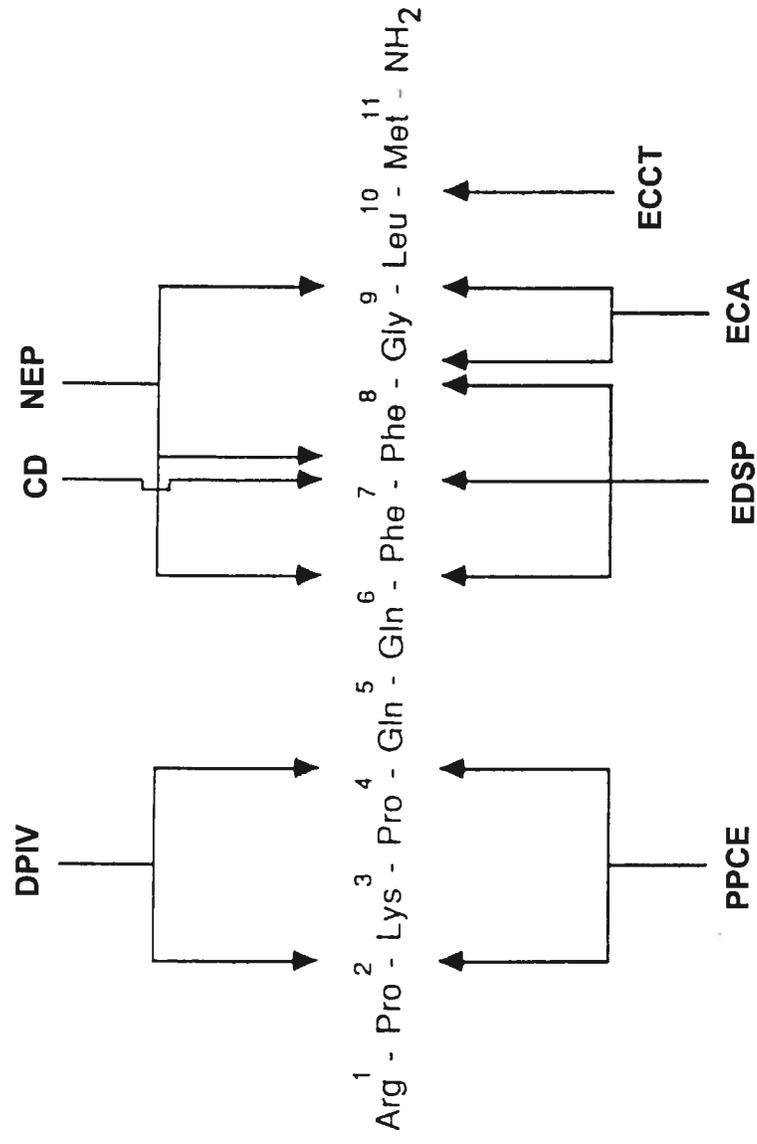
Selon l'espèce animale, l'épissage alternatif du transcrit primaire du gène PPT-A est régulé différemment. Par exemple, dans le striatum du rat, la proportion des ARNm est  $\gamma$ -PPT >  $\beta$ -PPT >>  $\alpha$ -PPT et ce ratio (80 : 20 : < 1) est

semblable à travers tous les tissus étudiés (Carter et Krause, 1990). Par contre, chez le bovin, il semble y avoir une régulation plus fine, spécifique à chaque tissu (Nawa et al., 1984). En effet, dans le système nerveux central, l'ARNm  $\alpha$ -PPT est plus abondant que l'ARNm  $\beta$ -PPT tandis que l'opposé est observé dans l'intestin et la thyroïde. Les mécanismes exacts permettant cette spécificité dans la régulation de l'expression des tachykinines demeurent encore peu connus.

### 1.2.2 Dégradation

Les tachykinines sont susceptibles à la dégradation enzymatique et donc la durée de leurs effets biologiques dépend directement de leur métabolisme dans les différents tissus. Les peptidases impliquées dans la dégradation de la substance P sont : l'endopeptidase neutre (NEP), la dipeptidyl aminopeptidase (DPIV), la cathepsin D (CD), la propyl endopeptidase (PPCE), l'enzyme de dégradation de la substance P (EDSP), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et l'enzyme clivant l'extrémité C-terminale (ECCT) (Mussap et al., 1993) (Figure 2, p.12). Ensemble ces peptidases peuvent hydrolyser sept des dix liens peptidiques de la SP. Cependant, dans des conditions *in vivo*, ce sont la NEP et la ECA qui sont les plus susceptibles d'intervenir puisqu'elles sont liées à la membrane cellulaire et donc mieux situées pour agir sur les neurokinines qui sont des peptides hydrophiles (Regoli et al., 1994).

Figure 2 : Peptidases impliquées dans la dégradation de la substance P



Les peptidases EDSP, NEP et ECA sont impliquées dans la dégradation de la SP dans le système nerveux central chez le rat. Ces enzymes hydrolysent le lien Phe<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>, ce qui produit le métabolite SP (1-7) qui est actif dans le système nerveux central (Stewart et al., 1982). En périphérie, chez le rat et l'humain, l'ECA est impliquée dans la dégradation de la SP dans le plasma (Couture et Regoli, 1981; Wang et al., 1991). Dans plusieurs muscles lisses, l'hydrolyse de la SP dépend aussi de la NEP et l'ECA (Rouissi et al., 1990).

Le métabolisme de la NKA et de la NKB est moins bien documenté, néanmoins, certaines études rapportent que ces neurokinines sont hydrolysées au niveau du lien Gly<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup> par la NEP dans la moelle épinière chez la souris et dans les voies respiratoires chez le cochon d'Inde (Shore et Drazen, 1989; Sakurada et al., 1990). Aussi, dans l'iléon du cochon d'Inde, la NKA est dégradée conjointement par la NEP et la DPIV puisque l'inhibition complète de son métabolisme est réalisée seulement en présence de phosphoramidon (inhibiteur de la NEP) et de bestatin (inhibiteur des aminopeptidases) (Nau et al., 1986). Jusqu'à maintenant, le métabolisme du NPK et du NPγ demeure très peu connu.

### **1.3 Récepteurs des tachykinines**

#### **1.3.1 Identification de trois récepteurs pour les tachykinines**

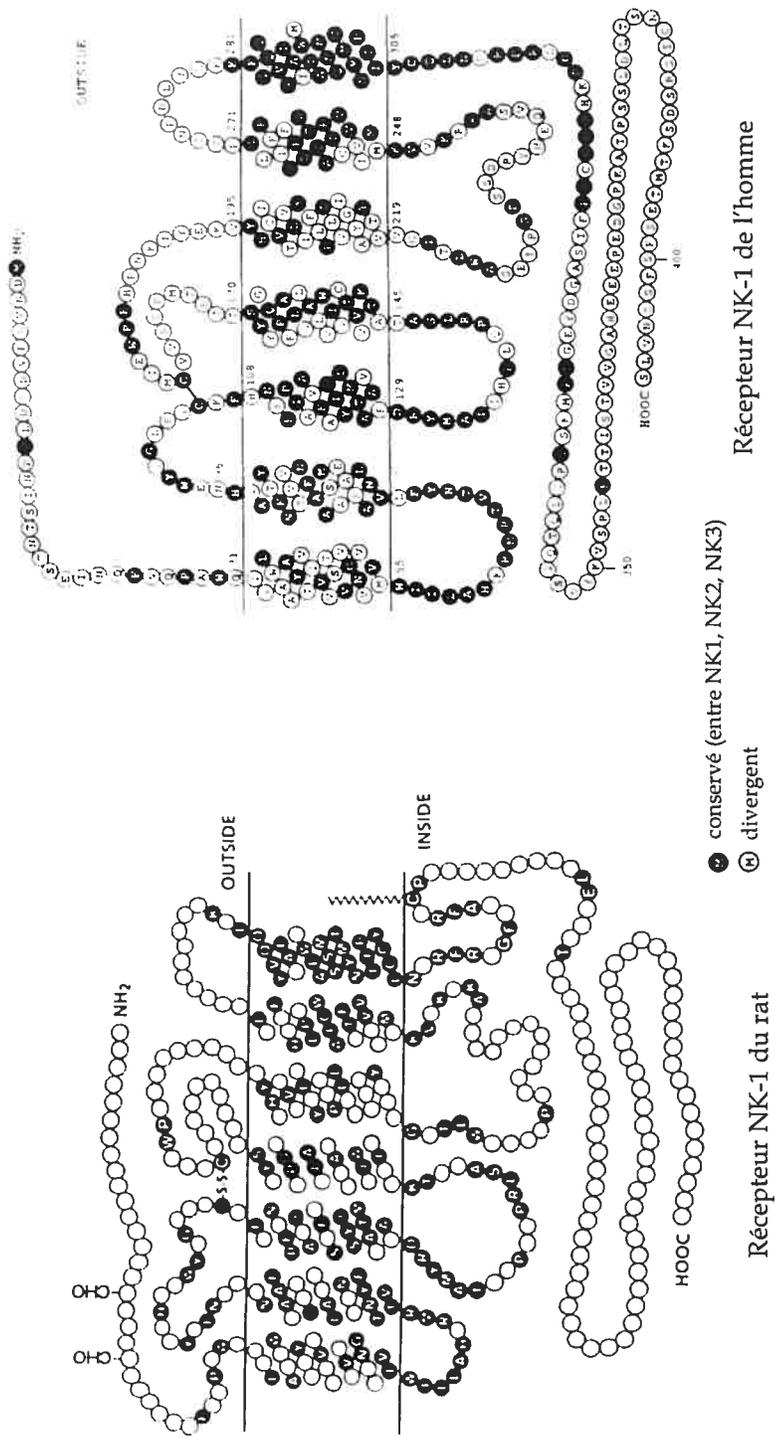
Les premières données suggérant l'existence de plusieurs récepteurs pour les tachykinines sont apparues avec les travaux de Erspamer. C'est en comparant la substance P avec les tachykinines présentes chez les non-mammifères que Erspamer a pu constater que l'élédoisine et la kassinine étaient beaucoup plus puissantes que la SP dans certains tissus (Erspamer,

1981). Des différences importantes dans le profil pharmacologique entre ces tachykinines lui suggéra donc qu'il puisse y avoir plus d'un récepteur pour les tachykinines. Les critères utilisés à l'origine pour distinguer chacun des trois récepteurs étaient : l'ordre de puissance des tachykinines (mammifères et non-mammifères), l'activité induite par les différents fragments des tachykinines et le développement d'agonistes sélectifs (Regoli et al., 1994; Maggi, 1995). C'est avec l'arrivée des premières générations d'antagonistes pour la SP, la découverte de la NKA et de la NKB et le clonage moléculaire que l'existence de trois récepteurs distincts s'est confirmée. Ces récepteurs font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines-G et possèdent sept passages trans-membranaires. Ils ont été nommés neurokinine-1 (NK<sub>1</sub>), neurokinine-2 (NK<sub>2</sub>) et neurokinine-3 (NK<sub>3</sub>) (Figure 3, p. 15).

### 1.3.2 Biologie moléculaire des récepteurs

Les trois récepteurs des tachykinines ont été clonés chez plusieurs espèces animales et chez l'humain. Chez le rat, les récepteurs NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> sont constitués respectivement de 407, 390 et 452 acides aminés (Gerard et al., 1993). Ces récepteurs sont différents par la longueur et la nature de leur séquence en acides aminés. Cependant, en tant que récepteurs couplés aux protéines-G, ils ont en commun des sites potentiels de glycosylation à l'extrémité N-terminale et plusieurs sites de phosphorylation sur les résidus sérine et thréonine à l'extrémité C-terminale. Les séquences d'acides aminés au niveau des domaines trans-membranaires et des portions cytoplasmiques adjacentes montrent une similarité de 54 à 66 % entre les trois récepteurs (Shigemoto et al., 1990).

Figure 3 : Représentation schématique du récepteur NK<sub>1</sub> des tachykinines chez le rat et l'homme



De plus, chacun des trois récepteurs contient un résidu histidine sur les segments trans-membranaires V et VI ce qui est caractéristique des récepteurs des tachykinines. La troisième boucle cytoplasmique de même que certaines portions à l'extrémité C-terminale sont très conservées entre le récepteur NK<sub>1</sub> et le récepteur NK<sub>3</sub> ce qui n'est pas le cas pour le récepteur NK<sub>2</sub> (Ohkubo et Nakanishi, 1991).

L'homologie entre les récepteurs des tachykinines chez le rat, la souris, le cochon d'Inde et l'humain a été évaluée. Il a été montré que seulement 10% des acides aminés permettait de différencier le récepteur NK<sub>1</sub> entre ces espèces. En fait, 23 acides aminés sont différents entre le récepteur NK<sub>1</sub> chez l'humain et le rat et seulement 9 acides aminés le sont entre le rat et la souris. Chez le rat et la souris, contrairement à chez l'humain et le cochon d'Inde, on a pu identifier dans la séquence du récepteur NK<sub>1</sub>, un quatrième site de glycosylation potentiel sur la deuxième boucle extra-cellulaire entre les segments trans-membranaires 4 et 5. Ceci pourrait être une des causes possibles expliquant les différences pharmacologiques observées entre les espèces. Pour le récepteur NK<sub>2</sub>, une homologie de 85% est observée entre les espèces mentionnées ci-haut. Le rat et la souris diffèrent dans leur séquence de 19 acides aminés. Le récepteur NK<sub>3</sub> se différencie du récepteur NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> par une extension de 40 à 50 acides aminés dans la séquence qui compose le récepteur. Toutefois, à l'instar des récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub>, le récepteur NK<sub>3</sub> est très conservé entre le rat et l'humain avec une différence de seulement 12% des acides aminés (Pour une revue voir Gerard et al., 1993).

### 1.3.3 Agonistes et antagonistes

#### 1.3.3.1 Récepteurs NK<sub>1</sub>

La SP est le ligand endogène le plus puissant pour activer le récepteur NK<sub>1</sub>. L'oxydation de la méthionine à l'extrémité C-terminale, de même que la N-méthylation du résidu Gly<sup>9</sup> de la SP ont permis d'améliorer considérablement la sélectivité du peptide naturel pour le récepteur NK<sub>1</sub> (Mussap et al., 1993). Le [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-SP est un agoniste assez stable qui possède la meilleure affinité et sélectivité pour le récepteur NK<sub>1</sub> (Regoli et al., 1988). Les agonistes NK<sub>1</sub> peuvent être divisés en deux groupes. En effet, jusqu'à maintenant plusieurs résultats ont suggéré l'existence d'un sous-type de récepteur NK<sub>1</sub> ou du moins que certains agonistes tel que le septide, puissent se lier à des sites différents du récepteur de la SP. On a suggéré que ces sites de liaison sont situés sur différents conformères du récepteur NK<sub>1</sub> (Torrens et al., 2000). Les agonistes qui ont un profil pharmacologique semblable à la SP sont donc appelés agonistes « classiques » alors que les agonistes qui montrent un profil semblable au septide sont appelés « septide-like agonists » (Maggi, 1995) (Tableau II, p. 18).

Le premier antagoniste pour le récepteur NK<sub>1</sub> a été le L668,169 (Cyclo(Gln,DTrp,(NMe)Phe(R)Gly[ANC-2]Leu,Met)<sub>2</sub>), développé au cours des années 90. Cependant, comme plusieurs autres qui ont suivi, cet antagoniste était caractérisé par une faible affinité et sélectivité et était pourvu d'effets secondaires (Maggi, 1995). Par contre, d'autres antagonistes peptidiques dont le FK 888 ((2-(N-Me)indolil)-CO-Hyp-Nal-NmeBzl) et le Cam 2445 ([4-Me]Z-(R)αMeTrpNH(S)CHMePh) ont été par la suite développés et possèdent une affinité et une sélectivité grandement supérieures (Fujii et al., 1992; Chan et al., 1996).

**Tableau II : Agonistes des récepteurs NK<sub>1</sub> des tachykinines.**

Agonistes "classiques"	"Septide-like agonists"
[Pro <sup>9</sup> ]SP	[Glp <sup>6</sup> ,Pro <sup>9</sup> ]SP(6-11)(septide)
[Pro <sup>9</sup> ]SP sulfone	SPOMe
[Sar <sup>9</sup> ]SP sulfone	[Apa <sup>9-10</sup> ]SP
Physalaémine	[Pro <sup>9-10</sup> ]SP
[Gly <sup>9</sup> ψ(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-Leu <sup>10</sup> ]SP	[Glu(OBz) <sup>11</sup> ]SP
	δ-aminovaleryl[Pro <sup>9</sup> ,NMeLeu <sup>10</sup> ]SP(7-11)
	(GR73,632)
	[Gly <sup>9</sup> ψ(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> )-Gly <sup>10</sup> ]SP

Selon les données de Petitet et al. (1992) et Meini et al. (1994).

(Adapté de Maggi, 1995)

Afin d'augmenter la résistance des antagonistes aux peptidases tissulaires, le CP 96,345 ((2S, 3S)-cis-2-(diphenylmethyl)-N-[(2-methoxyphenyl)-met1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-amine), premier antagoniste non peptidique, a été développé (Snider et al., 1991). Toutefois, ce dernier possède une très faible affinité pour le récepteur NK<sub>1</sub> de la souris et du rat et il peut induire plusieurs effets secondaires, entre autres, sur le système cardiovasculaire et la transmission neuronale (Donnerer et al., 1992; Wang et Hakanson, 1992). Le RP 67,580 ((3aR,7aR)-7,7-diphenyl-2-[1-imino-2-(2-methoxyphenyl)-ethyl]perhydroisoindol-4-one), très utilisé chez le rat et la souris pour évaluer les rôles physiologiques du récepteur NK<sub>1</sub>, aurait aussi certains effets secondaires dont le blocage des canaux calciques (Rupniak et al., 1993). Donc, afin de réduire les effets non spécifiques tout en conservant une forte affinité et sélectivité, d'autres antagonistes non peptidiques ont été développés tel que le LY 303870 ((R)-1-[N-(2-methoxybenzyl)acetyl-amino]-3-(1H-indol-3-yl)-2-[N-(2-(4-(piperidin-1-yl)piperidin-1-yl)acetyl)amino]propane), un puissant antagoniste, entre autres, sur les récepteurs NK<sub>1</sub> centraux (Iyengar et al., 1997) (Tableau III, p. 19).

**Tableau III : Affinité et sélectivité des antagonistes des récepteurs NK<sub>1</sub> des tachykinines**

Antagonistes NK <sub>1</sub>	Affinité	Sélectivité	Références
L668,169	7.0*	pA <sub>2</sub> : NK <sub>2</sub> = 5.1 / NK <sub>3</sub> = 5.6	McKnight et al., 1988
FK 888	9.3*	10000 fois plus élevée (NK <sub>1</sub> vs NK <sub>2</sub> et NK <sub>3</sub> )	Fujii et al., 1992
Cam 2445	7.8**	inactif sur NK <sub>2</sub> et NK <sub>3</sub> , pKi < 5	Guard et al., 1993
CP-96,345	8.1*	inactif à 10 µM sur NK <sub>2</sub> et NK <sub>3</sub>	Maggi, 1995
RP 67580	7.2*	inactif à 10 µM sur NK <sub>2</sub> et NK <sub>3</sub>	Garret et al., 1991
LY 303870	9.4***	50000 fois plus élevée (NK <sub>1</sub> vs NK <sub>2</sub> et NK <sub>3</sub> )	Gitter et al., 1995

\* pA<sub>2</sub>, iléum du cochon d'Inde

\*\* pKi, membrane du cortex cérébral chez le cochon d'Inde

\*\*\* pA<sub>2</sub>, veine cave de lapin

### 1.3.3.2 Récepteurs NK<sub>2</sub>

La NKA et ses deux formes allongées (NPK et NP $\gamma$ ) sont les ligands endogènes les plus puissants pour activer le récepteur NK<sub>2</sub>. Plusieurs agonistes pour le récepteur NK<sub>2</sub> ont été développés sur la base d'observations montrant que le fragment NKA (4-10) était non seulement plus actif, mais aussi plus sélectif pour le récepteur NK<sub>2</sub> comparativement à la NKA (Drapeau et al., 1987b). La sélectivité du fragment NKA (4-10) a été améliorée en remplaçant le résidu Met<sup>11</sup> par Nle, ce qui donna l'agoniste [Nle<sup>10</sup>]-NKA(4-10) et puis en remplaçant le résidu Gly<sup>8</sup> du fragment NKA(4-10) par le résidu  $\beta$ -Ala ce qui donna l'agoniste [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]-NKA(4-10) qui est très sélectif pour les récepteurs NK<sub>2</sub> (Rovero et al., 1989). Les agonistes [Lys<sup>5</sup>,MeLeu<sup>9</sup>,Nle<sup>10</sup>]-NKA(4-10) et [Lys<sup>3</sup>,Gly<sup>8</sup>-R-gamma-lactam-Leu<sup>9</sup>]-NKA (3-10) (GR 64,349) sont aussi très puissants et hautement sélectifs pour les récepteurs NK<sub>2</sub> (Chassaing et al., 1991; Hagan et al., 1991).

Plusieurs antagonistes NK<sub>2</sub> de nature peptidique ou non peptidique ont été développés ces dernières années. L'hexapeptide cyclique L 659,877 (Cyclo(Gln-Trp-Phe-Gly-Leu-Met)) est l'un des premiers antagonistes possédant une forte affinité et sélectivité pour le récepteur NK<sub>2</sub>. Par la suite, afin d'optimiser les propriétés du L 659,877, le MEN 10627 (Cyclo(Met-Asp-Trp-Phe-Dap-Leu)cyclo(2 beta-5 beta)) a été synthétisé. Cet hexapeptide polycyclique est plus stable et conserve davantage une conformation active. Le MEN 10627 est un antagoniste compétitif et réversible ayant une puissance comparable au SR 48968 (Maggi et al., 1994). Le SR 48968 ((S)-N-méthyl-N-[4-acétylamino-4-phénylpiperidino-2-(3,4-dichlorophényl)butyl]benzamide) est le premier antagoniste non peptidique développé. Il possède une très haute affinité et sélectivité pour le récepteur NK<sub>2</sub>. Le SR 48968 est aussi un

antagoniste compétitif connu pour sa longue durée d'action *in vivo* (Advenier et al., 1992a; b; Emonds-Alt et al., 1992). Le GR 159,897 ((R)-1-[2-(5-fluoro-1H-indol-3-yl)ethyl]-4-methoxy-4-[(phenylsulfinyl)methyl]piperidine) est un autre antagoniste NK<sub>2</sub> non peptidique puissant et hautement sélectif (Beresford et al., 1995) (Tableau IV, p. 22).

### 1.3.3.3 Récepteurs NK<sub>3</sub>

La NKB est le ligand endogène qui possède le plus d'affinité pour le récepteur NK<sub>3</sub>. L'agoniste [MePhe<sup>7</sup>]-NKB provient de la substitution du résidu Val de la NKB par le résidu Phe qui a été méthylé à son extrémité N-terminale. Ces changements structuraux ont permis d'obtenir une molécule avec beaucoup plus d'affinité et de sélectivité pour le récepteur NK<sub>3</sub> que le ligand naturel (Drapeau et al., 1987a; b). Un autre agoniste qui possède aussi une bonne affinité pour le récepteur NK<sub>3</sub> est le [Pro<sup>7</sup>]-NKB. Cependant, c'est le senktide (succinyl[Asp<sup>6</sup>,MePhe<sup>8</sup>]SP(6-11)) qui est considéré comme le meilleur agoniste NK<sub>3</sub> dû à sa très grande affinité et sélectivité. En effet, pour activer les récepteurs NK<sub>1</sub> ou NK<sub>2</sub>, la concentration de senktide doit être au minimum 60,000 fois plus forte que celle requise pour activer les récepteurs NK<sub>3</sub> (Wormser et al., 1986).

Le R-486 (H-Asp-Ser-Phe-Trp-β-Ala-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) et le R-487 ([Trp<sup>7</sup>,β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10)) font partie de la première génération d'antagonistes sélectifs pour le récepteur NK<sub>3</sub>; cependant, ils possèdent aussi une activité de type agoniste pour les récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> (Drapeau et al., 1990).

**Tableau IV: Affinité et sélectivité des antagonistes des récepteurs NK<sub>2</sub> des tachykinines**

Antagonistes NK <sub>2</sub>	Affinité	Sélectivité	Références
L 659,877	7.7*	NK <sub>1</sub> = inactif à 3 µM pA <sub>2</sub> : NK <sub>3</sub> = 5.4	Maggi et al., 1994
MEN 10627	8.8*	NK <sub>1</sub> = inactif à 1 µM NK <sub>3</sub> = inactif à 10 µM	Maggi et al., 1994
SR 48968	8.2*	NK <sub>1</sub> et NK <sub>3</sub> = inactif à 3 µM	Maggi et al., 1994
GR 159,897	8.7**	n/d	Ball et al., 1994

\* pA<sub>2</sub>, vessie de rat

\*\* pA<sub>2</sub>, trachée du cochon d'Inde

n/d : non disponible

Beaucoup plus sélectif, le R-820 (3-Indolyl-carbonyl-Hyp-Phg-N(Me)-Bzl) est un antagoniste semi peptidique (avec des acides aminés non naturels) qui possède une bonne affinité chez le rat (Regoli et al., 1994). Récemment, des antagonistes NK<sub>3</sub> non peptidiques ont été développés. Le SR 142801 ((S)-(N)-(1-(3-(1-benzoyl-3-(3,4-dichlorophenyl)piperidin-3-yl)propyl)-4-phenylpiperidin-4-yl)-N-methylacetamide) est le meilleur pour bloquer les récepteurs NK<sub>3</sub> chez l'homme (Chung et al., 1995), toutefois, il peut agir comme agoniste au niveau spinal et supra-spinal chez le rat (Cellier et al., 1997; Couture et al., 2000). Le SB 222200 ((S)-(-)-N-(alpha-ethylbenzyl)-3-methyl-2-phenylquinoline-4-carboxamide) possède une très haute affinité et sélectivité pour le récepteur NK<sub>3</sub> du rat et de la souris et il pénètre la barrière hémato-encéphalique. Cependant, sa très faible solubilité limite son utilisation (Sarau et al., 2000). Développé récemment, le SB 235375 ((-)-(S)-N-(alpha-ethylbenzyl)-3-(carboxymethoxy)-2-phenylquinoline-4-carboxamide) est un antagoniste non peptidique hydrosoluble qui montre une bonne affinité et sélectivité particulièrement chez le cochon d'Inde (Hay et al., 2002) (Tableau V, p. 24).

**Tableau V: Affinité et sélectivité des antagonistes des récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines**

Antagonistes NK <sub>3</sub>	Affinité	Sélectivité	Références
R-486	7.5*	Inactif sur les récepteurs NK <sub>1</sub> et NK <sub>2</sub>	Regoli et al., 1994
R-487	7.5*	Inactif sur les récepteurs NK <sub>1</sub> et NK <sub>2</sub> à 10 <sup>-5</sup> M	Drapeau et al., 1990
R-820	7.6*	pA <sub>2</sub> = 5.4 (NK <sub>1</sub> ) / 4.8 (NK <sub>2</sub> )	Regoli et al., 1994
SR 142801	34 nM**	IC <sub>50</sub> > 10000 nM (NK <sub>1</sub> ) IC <sub>50</sub> = 1000 nM (NK <sub>2</sub> )	Beaujouan et al., 1997
SB 222200	8.4***	100000 fois plus élevée (NK <sub>3</sub> vs NK <sub>1</sub> ) 60 fois plus élevée (NK <sub>3</sub> vs NK <sub>2</sub> )	Sarau et al., 2000
SB 235375	7.9***	100000 fois plus élevée (NK <sub>3</sub> vs NK <sub>1</sub> ) 100 fois plus élevée (NK <sub>3</sub> vs NK <sub>2</sub> )	Hay et al., 2002

\* pA<sub>2</sub>, veine porte de rat

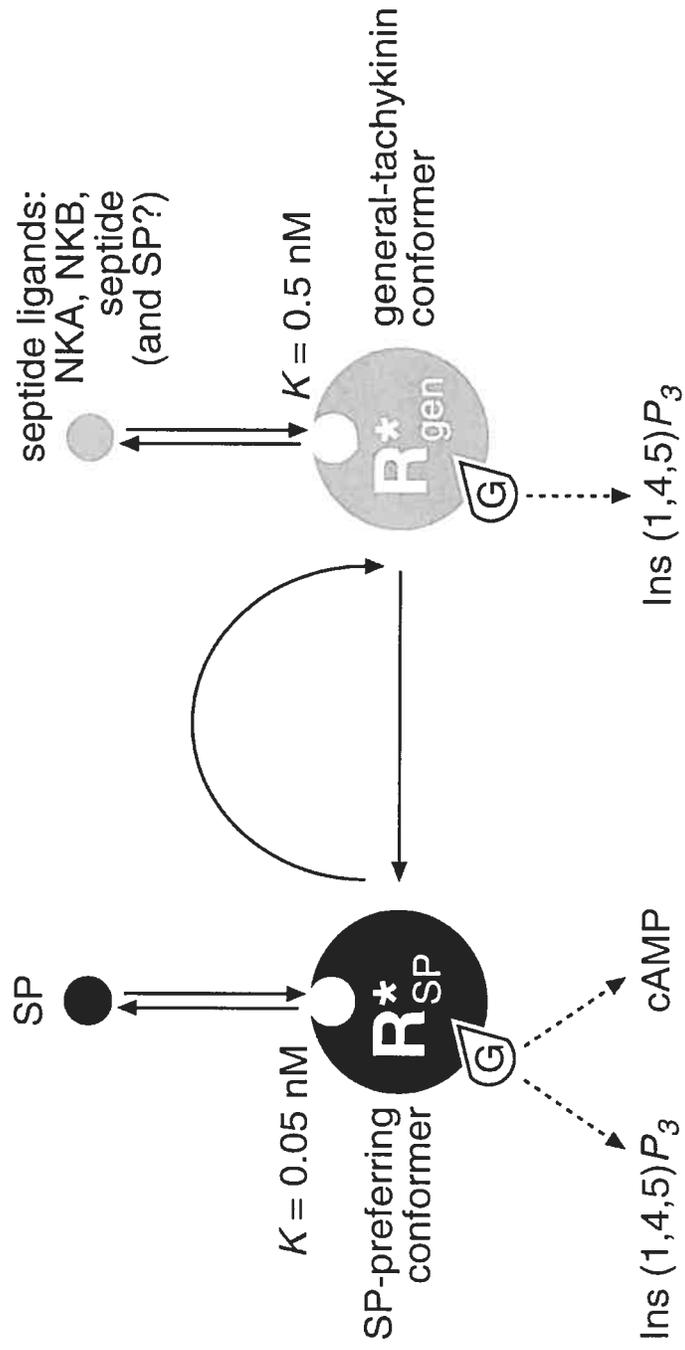
\*\* IC<sub>50</sub>, membrane corticale de rat

\*\*\* pA<sub>2</sub>, cellules HEK 293

### 1.3.4 Sous-types de récepteurs

Pour chacun des trois récepteurs des tachykinines, il existe des sous-types de récepteurs inter-espèces. Ce sont des formes homologues du même récepteur montrant toutefois des profils pharmacologiques différents en particulier avec des antagonistes (Regoli et al., 1994). C'est avec l'arrivée du CP 96345 et du RP 67580 qu'on a pu constater une hétérogénéité pharmacologique du récepteur NK<sub>1</sub>. En effet, le CP 96345, contrairement au RP 67580, possède une bien plus grande affinité pour les récepteurs NK<sub>1</sub> exprimés chez le bœuf, le cochon d'Inde, le lapin, le hamster et les tissus humains que ceux exprimés chez le rat et la souris (Patacchini et Maggi, 1995). Grâce aux agonistes NK<sub>1</sub> faisant partie de la famille du septide, on a pu constater qu'il y avait aussi une hétérogénéité intra-espèce. Ces agonistes montrent une grande puissance dans plusieurs essais fonctionnels tandis que leur affinité est vraiment très faible pour le récepteur NK<sub>1</sub> « classique » dans les essais de liaison (Lee et al., 1986). Afin d'expliquer cette incohérence, trois hypothèses ont été proposées. La première est qu'il y aurait un sous-type distinct de récepteur NK<sub>1</sub> particulièrement sensible au septide (Torrens et al., 1997; Beaujouan et al., 2000). La deuxième hypothèse suggère plutôt l'existence de sites de liaison différents entre le septide et les agonistes dits classiques sur le récepteur NK<sub>1</sub> (Pradier et al., 1994; Huleux et al., 1998). Finalement, Maggi et Schwartz (1997) suggèrent que le récepteur NK<sub>1</sub> possède deux conformères actifs. Un conformère « général » auquel se lie avec une affinité relativement élevée la majorité des agonistes des tachykinines (NKA, NKB, septide et possiblement la SP) et un conformère auquel se lie la SP avec une très forte affinité contrairement aux agonistes de la famille du septide (Figure 4, p. 26).

Figure 4 : Illustration des deux conformères actifs du récepteur NK<sub>1</sub> des tachykinines



Adapté de Maggi & Schwartz, 1997

Dans la glande sous-maxillaire chez le rat, on a rapporté l'existence de deux formes différentes du récepteur NK<sub>1</sub>, soit une forme allongée et une forme tronquée (96 acides aminés) à l'extrémité C-terminale (Kage et al., 1993). Ces deux isoformes ont des affinités différentes pour les agonistes de la famille du septide (Beaujouan et al., 1999). On a rapporté aussi deux isoformes du récepteur NK<sub>1</sub> chez l'humain. La forme allongée est davantage distribuée dans le cerveau tandis que la forme tronquée est plus représentée dans les tissus en périphérie (Caberlotto et al., 2003). Chez l'humain les deux isoformes seraient issus de l'épissage alternatif de l'ARNm encodant le récepteur (Fong et al., 1992), tandis que les études effectuées chez le rat suggèrent plutôt des modifications post-transcriptionnelles telles que l'action de protéases qui seraient à l'origine de la forme tronquée du récepteur NK<sub>1</sub> (Kage et al., 1993; Li et al., 1997).

Ce n'est qu'au début des années 90 avec l'arrivée du MEN 10207 qu'on a pu constater qu'il y avait une hétérogénéité intra- et inter-espèce pour le récepteur NK<sub>2</sub>. En effet, le MEN 10207 possède une meilleure affinité dans l'artère pulmonaire de lapin que dans la trachée isolée de hamster (Patacchini et Maggi, 1995). Des données pharmacologiques suggèrent la présence de sous-types de récepteurs NK<sub>2</sub> dans le même organe chez une même espèce. En effet, se basant sur des affinités différentes pour l'antagoniste MEN 10207, on a rapporté deux populations différentes de récepteurs NK<sub>2</sub> dans la vessie du rat (Nimmo et al., 1992). Récemment, une étude moléculaire a pu mettre en évidence qu'un saut de l'exon 2 lors de l'épissage de l'ARNm pour le récepteur NK<sub>2</sub> produisait un récepteur légèrement différent. Cet isoforme du récepteur appelé NK<sub>2</sub>β serait distribué dans les tissus de l'homme et du rat comme le récepteur sauvage identifié NK<sub>2</sub>α (Candenas et al., 2002).

Il existe aussi une hétérogénéité pour le récepteur NK<sub>3</sub>, particulièrement entre le cochon d'Inde et le rat. Plusieurs agonistes tel que le [Pro<sup>7</sup>]NKB montrent une affinité jusqu'à 10 fois supérieure pour les récepteurs NK<sub>3</sub> du rat comparativement à ceux présents chez le cochon d'Inde (Patacchini et Maggi, 1995). Différents antagonistes tels que le SR 48968 et le SR 142801 ont aussi permis de distinguer des sous-types de récepteurs NK<sub>3</sub> exprimés chez le rat et le cochon d'Inde (Petitet et al., 1993; Patacchini et al., 1995).

Cloné à l'origine d'une banque d'ADNc de placenta humain (Xie et al., 1992), le récepteur NK<sub>4</sub> a été initialement identifié comme un récepteur aux opiacés atypique. En effet, l'équipe de Donaldson (1996) a rapporté que le récepteur NK<sub>4</sub> n'induit aucune réponse fonctionnelle en réponse à des agonistes opiacés, mais est plutôt bloqué par la dynorphine. De plus, ce récepteur possède une remarquable homologie (80%) avec le récepteur NK<sub>3</sub> du rat et de l'homme et peut être activé par la NKB à des concentrations semblables à celles employées pour stimuler le récepteur NK<sub>3</sub>. L'ARNm pour le récepteur NK<sub>4</sub> serait exprimé dans plusieurs tissus chez le rat (Donaldson et al., 2001). Toutefois, ces données demeurent controversées puisque Sarau et al. (2000) ont été incapables de détecter la séquence du présumé récepteur NK<sub>4</sub> des tachykinines dans le génome de l'homme et de plusieurs espèces animales incluant le rat. De plus, Page et Bell (2002) n'ont révélé aucune expression du récepteur NK<sub>4</sub> dans une série de tissus humain examinés incluant le placenta.

### 1.3.5 Voies de signalisation intracellulaires

Les tachykinines exercent leurs effets principalement par la voie de signalisation couplée à la protéine Gq/11 qui induit l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et en diacylglycérol (DAG) (Quartara et Maggi, 1997). L'IP<sub>3</sub> agit en relâchant le Ca<sup>2+</sup> provenant des réserves intracellulaires, tandis que le DAG active plutôt la protéine kinase C (PKC). D'autres mécanismes ont été suggérés quant à l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire induite par la liaison des tachykinines à leurs récepteurs. Entre autres, dans les neurones myentériques du cochon d'Inde, la SP induit un influx de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire par l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendant (Sarosi et al., 1998). Aussi, dans des cellules HEK293 transfectées avec des récepteurs NK<sub>2</sub> et des canaux TRP (transient receptor potential), l'activation des récepteurs des tachykinines induit l'ouverture des canaux de type TRP et provoque l'entrée de cations incluant le Ca<sup>2+</sup> qui conduit à la dépolarisation de la cellule (Oh et al., 2003).

Le monoxyde d'azote (NO) est un autre second messenger impliqué dans les effets induits par la liaison des tachykinines à leurs récepteurs. En effet, l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire induit par la liaison de la SP aux récepteurs NK<sub>1</sub>, situés sur les cellules endothéliales, provoque la formation du complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline. Ce complexe active la NO synthase, permettant la production de NO. La diffusion du NO dans les cellules sous-jacentes du muscle lisse vasculaire induit par la suite une vasodilatation via une augmentation de GMPC impliquant l'activation de la guanylate cyclase soluble.

Des données obtenues à partir de cellules CHO transfectées suggèrent également l'activation de la voie intracellulaire de l'adényl cyclase suite à la liaison des tachykinines à leurs récepteurs. En effet, l'activation de chacun des trois récepteurs des tachykinines dans ces cellules induit une augmentation de la formation d'AMPc (Nakajima et al., 1992). La formation d'AMPc serait proportionnelle à la concentration de SP utilisée pour stimuler le récepteur et serait indépendante de la voie de la mobilisation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Mitsubishi et al., 1992). Il faut toutefois préciser qu'aucune donnée n'est disponible sur l'utilisation de cette voie dans les neurones.

Quelques études ont montré que l'activation des récepteurs  $NK_1$  et  $NK_2$  par la SP et la NKA pourrait aussi stimuler la relâche d'acide arachidonique (AA) et la production de prostaglandine  $E_2$  ( $PGE_2$ ). Cette voie passerait par l'activation d'une protéine-G sensible à la toxine de Bordetella Pertussis; elle serait dépendante du  $Ca^{2+}$  extracellulaire et sensible à l'activation de la PKC (Garcia et al., 1994; Catalioto et al., 1998).

L'activation des récepteurs  $NK_1$  peut moduler certains canaux ioniques. Par exemple, la stimulation du récepteur  $NK_1$  peut induire l'ouverture des canaux chlore des cellules musculaires lisses dans le colon du lapin (Sun et al., 1993) et inhiber les canaux  $K^+$  à rectification entrante ainsi que les canaux calciques de types L, N et P/Q dans les neurones (Nakajima et al., 1988; Yamada et al., 1999). Les effets opposés causés par l'activation des récepteurs des tachykinines sur les canaux calciques pourraient être expliqués par les différents types cellulaires et espèces utilisés. En effet, l'activation et l'inhibition des canaux calciques ont été respectivement observés dans des neurones myentériques chez le cochon d'Inde et des cellules ganglionnaires sous-mandibulaires chez le hamster.

La substitution de la séquence d'acides aminés située au niveau de la troisième boucle intracellulaire du récepteur NK<sub>1</sub> par une séquence équivalente provenant du récepteur NK<sub>2</sub> n'altère pas l'affinité de la SP pour son récepteur, mais empêche la génération des seconds messagers IP<sub>3</sub> et AMPc (Blount et Krause, 1993). Ceci suggère que dans la structure même du récepteur NK<sub>1</sub>, la troisième boucle intracellulaire serait particulièrement importante pour l'activation des seconds messagers intracellulaires.

### 1.3.6 Désensibilisation des récepteurs

Les récepteurs des tachykinines sont sujets à la désensibilisation suite à une exposition prolongée ou répétée à des agonistes. La désensibilisation des récepteurs des tachykinines implique une phosphorylation de l'extrémité C-terminale du récepteur par des kinases et le découplage subséquent de la protéine-G avec son récepteur. Chez le rat, le récepteur NK<sub>1</sub> tronqué suite à une mutation qui supprime 70 acides aminés à partir de l'extrémité C-terminale, est moins susceptible à la désensibilisation induite par la SP que le récepteur sauvage (Sasakawa et al., 1994). La PKC pourrait être impliquée dans la désensibilisation retardée du récepteur NK<sub>1</sub> dans les tissus humains (Barr et Watson, 1994).

Suite au découplage du récepteur NK<sub>1</sub> avec la protéine-G, le récepteur peut être internalisé dans des endosomes via un mécanisme dépendant des clathrines. L'acidification des endosomes permet par la suite la dissociation du complexe récepteur/ligand et donc le recyclage du récepteur à la membrane (Grady et al., 1995). On a toutefois rapporté que le processus d'internalisation ne serait pas à l'origine de la désensibilisation rapide des récepteurs NK<sub>1</sub>. Cette étape serait plutôt importante pour la re-sensibilisation

des récepteurs. En effet, le blocage de la translocation des récepteurs et donc l'inhibition de l'internalisation, diminue la re-sensibilisation des récepteurs NK<sub>1</sub> et non la désensibilisation (Bennett et al., 2002).

#### **1.4 Action des tachykinines en périphérie**

Les tachykinines sont présentes dans plusieurs tissus en périphérie où elles exercent de nombreuses fonctions. Les systèmes cardiovasculaire, respiratoire et gastro-intestinal font partie des cibles où les tachykinines ont un rôle important. Parmi leurs effets notons la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la bronchoconstriction et la contraction des cellules musculaires lisses. L'inflammation neurogénique est induite suite à la relâche des tachykinines à l'extrémité périphérique des fibres sensorielles de type C et serait impliquée dans l'asthme (Couture et Cuello, 1984; Harrison et Geppetti, 2001).

##### **1.4.1 Système cardiovasculaire**

La SP et à un plus faible degré la NKA et la NKB injectées par voie i.v. chez le rat, produisent un effet vasodépresseur et donc une diminution de la pression artérielle. Cette vasodilatation est due à l'activation des récepteurs NK<sub>1</sub> situés sur l'endothélium vasculaire et elle est dépendante du monoxyde d'azote (Couture et al., 1989). L'activation des récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> situés sur les fibres noradrénergiques cause une tachycardie, tandis que la stimulation des récepteurs NK<sub>3</sub> situés sur une sous-population de fibres sensorielles insensibles à la capsaïcine, active plutôt un réflexe vagal (le réflexe de Bezold-Jarisch) entraînant une bradycardie marquée (Couture et al., 1989). Un rôle bien connu de la SP sur les vaisseaux sanguins est

l'augmentation de la perméabilité vasculaire qui résulte de deux mécanismes. L'activation des récepteurs NK<sub>1</sub> situés sur les cellules endothéliales induit une augmentation de la pression hydrostatique via une vasodilatation des artérioles pré-capillaires et une constriction des veinules post-capillaires. Aussi, la SP en activant les récepteurs NK<sub>1</sub> provoque la formation de pores suite à la contraction des cellules endothéliales. De plus, la SP cause la dégranulation des mastocytes qui libèrent l'histamine et la sérotonine, deux médiateurs qui augmentent la perméabilité vasculaire des vaisseaux sanguins (Jacques et al., 1989). L'activation des récepteurs NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> des tachykinines augmente aussi la perméabilité vasculaire, entre autres, dans l'estomac et la vessie de rat (Nicolau et al., 1993).

#### **1.4.2 Voies respiratoires**

Les tachykinines sont de puissants bronchoconstricteurs (NKA > SP > NKB) (Hua et al., 1984). Elles sont présentes dans les voies respiratoires de plusieurs espèces de mammifères (Otsuka et Yoshioka, 1993). L'exposition des voies respiratoires à des irritants comme la capsaïcine induit plusieurs réflexes de protection tels que la bronchoconstriction, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la vasodilatation, l'augmentation de la sécrétion de mucus, etc. Les tachykinines présentes dans les fibres sensorielles de type C contribueraient à ces mécanismes protecteurs. Les effets induits sur les vaisseaux ainsi que sur la sécrétion de mucus seraient tributaires de la relâche de SP, tandis que la NKA serait plus importante dans la régulation du tonus musculaire des bronches (Otsuka et Yoshioka, 1993).

### 1.4.3 Tractus gastro-intestinal

Chez le rat et le cochon d'Inde, la SP et la NKA sont distribuées tout le long du tractus gastro-intestinal (Too et al., 1989; Tateishi et al., 1990). Les plexus myentérique et sous-muqueux ainsi que les couches musculaires circulaires et longitudinales contiennent plusieurs fibres SP-ergiques (Jessen et al., 1980). La SP et la NKA sont impliquées dans la motilité gastro-intestinale via la contraction des muscles lisses de l'intestin (Otsuka et Yoshioka, 1993). La SP peut aussi stimuler la sécrétion d'eau et d'électrolytes à partir des muqueuses du petit intestin et du colon chez plusieurs espèces (Walling et al., 1977; Kuwahara et Cooke, 1990).

### 1.5 Action des tachykinines dans la moelle épinière

Les trois principales tachykinines (SP, NKA et NKB) ainsi que leurs récepteurs sont retrouvés dans la moelle épinière chez le rat. La SP et la NKA sont localisées principalement dans les laminae I et II de la corne dorsale où se terminent les fibres sensorielles de type C et dans la colonne intermédiolatérale, tandis que la NKB serait présente dans la lamina III et originerait d'interneurones ou de fibres bulbospinales (Warden et Young, 1988; Helke et al., 1990). Les tachykinines de la moelle épinière sont impliquées dans plusieurs fonctions physiologiques. Entre autres, elles jouent un rôle important dans les processus impliqués dans la transmission de la douleur et dans la régulation cardiovasculaire.

L'injection intrathécale d'agonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> diminue le temps de réaction à un stimuli thermique douloureux chez le rat et donc induit une hyperalgésie (Laneuville et al., 1988; Picard et al., 1993; Severini et al., 2002).

Le rôle du récepteur NK<sub>3</sub> dans le processus de la douleur est cependant moins clair. En effet, certaines études rapportent que l'activation des récepteurs NK<sub>3</sub> pourrait induire une hyperalgésie dépendante de la libération du monoxyde d'azote (Linden et Seybold, 1999) particulièrement lors d'une inflammation en périphérie (Ackley et al., 2001), tandis que d'autres études rapportent plutôt une analgésie transitoire dépendante de la libération locale d'opiacés, suite à l'injection intrathécale d'agonistes NK<sub>3</sub> (Laneuville et al., 1988; Couture et al., 2000).

Les sites de liaison pour les récepteurs NK<sub>1</sub> dans la colonne intermédiolatérale sont situés sur les dendrites et les corps cellulaires des fibres pré-ganglionnaires sympathiques (Charlton et Helke, 1985). L'injection intrathécale d'agonistes en T8-T10 a permis d'évaluer l'effet des tachykinines sur ces neurones. L'injection intrathécale de SP et d'agonistes NK<sub>1</sub> induit des augmentations de pression artérielle moyenne et de fréquence cardiaque accompagnées d'une relâche de norépinéphrine et d'épinéphrine (Hassessian et al., 1990; Couture et al., 1995). Ces effets ont été bloqués par des antagonistes pour les récepteurs NK<sub>1</sub> (CP-96345 et RP-67580). La SP et le récepteur NK<sub>1</sub> jouent donc un rôle important dans la régulation du système sympatho-surrénalien au niveau spinal. Les récepteurs NK<sub>2</sub> situés sur les astrocytes en bordure des cornes dorsales et ventrales et autour du canal central (Zerari et al., 1998) de même que les récepteurs NK<sub>3</sub> retrouvés sur les corps cellulaires et dendrites des neurones de la lamina II (Seybold et al., 1997) ne sont pas impliqués dans les effets cardiovasculaires induits par les tachykinines au niveau spinal chez le rat normotendu.

## 1.6 Actions centrales des tachykinines

Les tachykinines et leurs récepteurs sont présents dans plusieurs régions du cerveau chez les mammifères (pour une revue voir Otsuka et Yoshioka, 1993). Ces neuropeptides sont impliqués à différents niveaux dans plusieurs fonctions cérébrales, notamment dans le contrôle de l'ingestion d'eau et de sel, dans les processus de mémoire et d'apprentissage, dans les mécanismes régissant les comportements et le contrôle autonome du système cardiovasculaire.

### 1.6.1 Modulation de la prise d'eau et de l'appétit au sel

L'injection i.c.v. des tachykinines induit une inhibition sélective de la prise d'eau suite à différents stimuli chez le rat. La NKA et la SP sont de puissants inhibiteurs de la prise d'eau induite respectivement par une déshydratation cellulaire et par l'administration d'angiotensine II (Perfumi et al., 1988; Massi et al., 1991). L'injection i.c.v. du NPY qui possède une meilleure affinité pour le récepteur NK<sub>2</sub> inhibe la prise d'eau induite par l'administration d'angiotensine II et par la déshydratation cellulaire. Le NPY semble posséder un rôle particulièrement important dans le contrôle de la prise d'eau chez le rat (Polidori et al., 1995). Les tachykinines ont aussi un effet inhibiteur sur l'appétit au sel chez le rat. Des agonistes NK<sub>3</sub>, injectés dans certains noyaux tels l'amygdale et le noyau basal de la stria terminalis, inhibent l'appétit au sel induit par une déplétion en sodium. L'effet inhibiteur des tachykinines sur l'appétit au sel serait tributaire de l'activation des récepteurs NK<sub>3</sub> centraux chez le rat (Massi et al., 1988; 1990; Pompei et al., 1991).

## 1.6.2 Mémoire et apprentissage

Plusieurs études ont rapporté que l'injection centrale et systémique de SP chez le rat stimule l'apprentissage et la mémoire (Hasenohrl et al., 2000). Le noyau basolatéral de l'amygdale (Lenard et Kertes, 2002), les divisions marginales du striatum (Bao et al., 2002) et le noyau magnocellulaire basal seraient particulièrement impliqués dans cet effet de la SP (Huston et al., 1993). L'administration intra-péritonéale d'une concentration fixe de SP améliore les processus d'apprentissage et de mémoire, mais induit aussi un renforcement du comportement, c'est-à-dire que la SP peut accroître un comportement déjà existant. Cependant ces effets seraient induits par des fragments différents de la SP. La portion N-terminale (SP 1-7) serait impliquée dans la facilitation de l'apprentissage et de la mémoire tandis que la portion C-terminale jouerait plutôt un rôle au niveau du renforcement (Huston et al., 1993; Tomaz et Nogueira, 1997). Bien que des sites de liaison pour la SP (1-7) aient été identifiés dans le système nerveux central (Igwe et al., 1990), aucun récepteur spécifique pour ce fragment n'a encore été caractérisé. Ainsi le récepteur par lequel le fragment N-terminal induit ses effets sur la mémoire et l'apprentissage demeure inconnu. Il a été suggéré que le septide ([Glp<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>]SP (6-11)) se lie à un site spécifique qui est différent de celui de la SP sur le récepteur NK<sub>1</sub> (Torrens et al., 2000). Ainsi, les effets induits sur le renforcement du comportement pourraient être la conséquence de la liaison du fragment C-terminal au site « septide » sur le récepteur NK<sub>1</sub>. Chez la souris, la NKA injectée dans les ventricules cérébraux ainsi que le NPy dans les portions rostrale et caudale de l'hippocampe et dans l'amygdale améliorent également la capacité de rétention (Flood et al., 1990).

### 1.6.3 Comportements stéréotypés

Les tachykinines induisent plusieurs comportements stéréotypés chez le rat. L'injection dans les ventricules cérébraux d'agonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> induit principalement une augmentation de la locomotion et des comportements de toilettage et de reniflement, tandis que l'injection d'agonistes NK<sub>3</sub> induit de façon prédominante le comportement de secousses corporelles (Tschöpe et al., 1992; Itoi et al., 1992; Picard et al., 1994; Cellier et al., 1997; 1999). Ces comportements sont également observés lors de l'administration des agonistes dans des noyaux précis tels que la substance noire, l'aire tegmentale ventrale et le noyaux du raphé médian (Stoessl et al., 1991; Elliott et al., 1992; Mason et Elliott, 1992; Lessard et Couture, 2001). Les comportements induits par les agonistes NK<sub>1</sub> seraient tributaires d'une activation dopaminergique centrale. En effet, l'augmentation de l'activité locomotrice induite par des agonistes NK<sub>1</sub> dans l'aire tegmentale ventrale est potentialisée par l'administration périphérique de D-amphétamine, une drogue qui stimule la relâche de dopamine et inhibe sa recapture (Eison et al., 1982). À l'opposé, ce comportement est inhibé par l'administration d'halopéridol, un antagoniste D<sub>2</sub> de la dopamine, et par une lésion des neurones dopaminergiques dans l'aire A10 (Kelley et al., 1979; Takano et al., 1985; Elliott et al., 1992). Les secousses corporelles induites par l'activation des récepteurs NK<sub>3</sub> seraient dépendantes de la sérotonine endogène car elles sont inhibées par des antagonistes sérotoninergiques 5-HT<sub>2</sub> et 5-HT<sub>1c/2</sub> ou par une déplétion globale (91.5 %) du cerveau en sérotonine. Un autre argument suggérant l'implication de la sérotonine endogène est l'intensification des secousses corporelles en présence d'un inhibiteur de la recapture de sérotonine (Stoessl et al., 1988; 1990).

Les comportements induits par les tachykinines, notamment l'augmentation du toilettage et de la locomotion sont également observés pendant la dépendance et le sevrage aux opiacés et lors de troubles affectifs, incluant la dépression, l'anxiété et le stress. Plusieurs études suggèrent un rôle pour la SP dans ces troubles (Kramer et al., 1998; Murtra et al., 2000; Gavioli et al., 2002). L'induction d'un stress aigu chez le rat altère la concentration de SP et la densité des récepteurs NK<sub>1</sub> dans plusieurs régions du système limbique (Takayama et al., 1986; Siegel et al., 1987; Rosen et al., 1992). L'injection i.c.v. de SP provoque chez l'animal éveillé une réaction typique de défense composée d'une réponse comportementale associée à une activation du système cardiovasculaire. Cette réaction est caractérisée par une intensification de la locomotion et des comportements de toilettage, de grattage et de morsure de la peau. Ces comportements sont accompagnés par une augmentation de l'activité sympatho-surrénalienne, de pression artérielle, de fréquence cardiaque, d'une vasoconstriction rénale et mésentérique ainsi que d'une vasodilatation des muscles squelettiques dans les membres postérieurs (Unger et al., 1988; Culman et Unger, 1995).

#### **1.6.4 Régulation cardiovasculaire**

Le site d'action probable de la réponse cardiovasculaire associée à la réaction de défense chez le rat est l'hypothalamus (Culman et Unger, 1995). Les zones paraventriculaire, ventro- et dorso-médiale de l'hypothalamus font partie des régions du système nerveux central les plus riches en SP (Brownstein et al., 1976). L'hypothalamus est une région particulièrement importante dans le contrôle autonome du système cardiovasculaire. De plus, l'injection de SP dans les régions antérieure et ventromédiale de l'hypothalamus induit une réponse (réaction de défense) très semblable à

celle observée suite à l'injection i.c.v. de SP (Itoi et al., 1991, 1994). Les tachykinines et leurs récepteurs se retrouvent aussi dans d'autres régions du système nerveux central reconnues pour leur implication cardiovasculaire. Par exemple, la SP et les sites de liaison pour la SP sont présents en assez grande quantité dans la médulla oblongata (Douglas et al., 1982; Helke et al., 1984) et dans le noyau du faisceau solitaire (Helke et al., 1980). Plusieurs données suggèrent d'ailleurs un rôle pour la SP dans la régulation du baroréflexe. Par exemple, l'injection i.c.v. de SP ou de phosphoramidon, un inhibiteur des endopeptidases, améliore la sensibilité du baroréflexe, tandis que l'injection d'anticorps contre la SP dans les ventricules cérébraux ou directement dans le noyau du tractus solitaire diminue le réflexe des barorécepteurs (Chan et al., 1990; Appenrodt et al., 1993). Aussi, l'injection de SP ou d'un agoniste NK<sub>1</sub> dans le noyau du faisceau solitaire induit une hypotension et une bradycardie (Kubo et Kihara, 1987; Feldman, 1995).

Une caractérisation pharmacologique à l'aide d'agonistes et d'antagonistes sélectifs des récepteurs NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> dans le système nerveux central a été rapportée dans diverses études. L'injection i.c.v. d'agonistes des récepteurs NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> des tachykinines chez le rat éveillé induit une augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque accompagnée de comportements stéréotypés (Itoi et al., 1992; Picard et al., 1994; Cellier et al., 1997). Les augmentations de pression artérielle et de fréquence cardiaque induites par les agonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> dépendent de l'activation du système nerveux sympathique étant donné leur inhibition par des bloqueurs  $\alpha$ 1- et  $\beta$ 1-adrénergiques. Les tachycardies et les effets presseurs observés suite à l'injection i.c.v. des agonistes NK<sub>3</sub> dépendent de l'activation du système nerveux sympathique, mais aussi de la relâche de vasopressine de la neurohypophyse puisque l'augmentation de pression

artérielle induite par l'activation des récepteurs NK<sub>3</sub> est bloquée par des antagonistes adrénérgiques et par l'administration i.v. d'un antagoniste V<sub>1</sub> de la vasopressine (Unger et al., 1981, 1988; Polidori et al., 1989; Takano et al., 1990; Cellier et Couture, 1997). Des études neuro-anatomiques et fonctionnelles chez le rat spontanément hypertendu (SHR) confirment un rôle important des tachykinines dans la régulation cardiovasculaire. Chez le SHR, le contenu en NKB dans le noyau supra-optique de l'hypothalamus ainsi que dans la partie caudale du noyau du faisceau solitaire est plus élevé que celui du rat normotendu Wistar Kyoto (Nagashima et al., 1989). Aussi, l'activation tonique des récepteurs NK<sub>3</sub> par les tachykinines endogènes dans la substance noire chez le SHR contribuerait au maintien d'une pression artérielle élevée, puisque l'administration intra-nigrale d'un antagoniste des récepteurs NK<sub>3</sub> diminue significativement la pression artérielle moyenne (Lessard et al., 2003).

Les voies neuronales impliquées dans les effets cardiovasculaires induits par l'administration i.c.v. des tachykinines sont peu connues. Les voies dopaminergiques centrales pourraient faire partie des voies recrutées. En effet, l'administration d'un antagoniste D<sub>2</sub> de la dopamine bloque l'augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque induite par le senktide, un agoniste sélectif des récepteurs NK<sub>3</sub> (Cellier et Couture, 1997). De plus, l'injection d'agonistes des tachykinines dans la substance noire, un centre dopaminergique important, induit des tachycardies qui sont bloquées par des antagonistes sélectifs des tachykinines (Lessard et Couture, 2001). Finalement, l'effet anti-hypertenseur observé suite au blocage des récepteurs NK<sub>3</sub> dans la substance noire chez le SHR semble confirmer la participation centrale de la dopamine dans les effets cardiovasculaires induits par les tachykinines (Lessard et al., 2003).

## **2.0 L'aire tegmentale ventrale**

### **2.1 Localisation dans le système nerveux central**

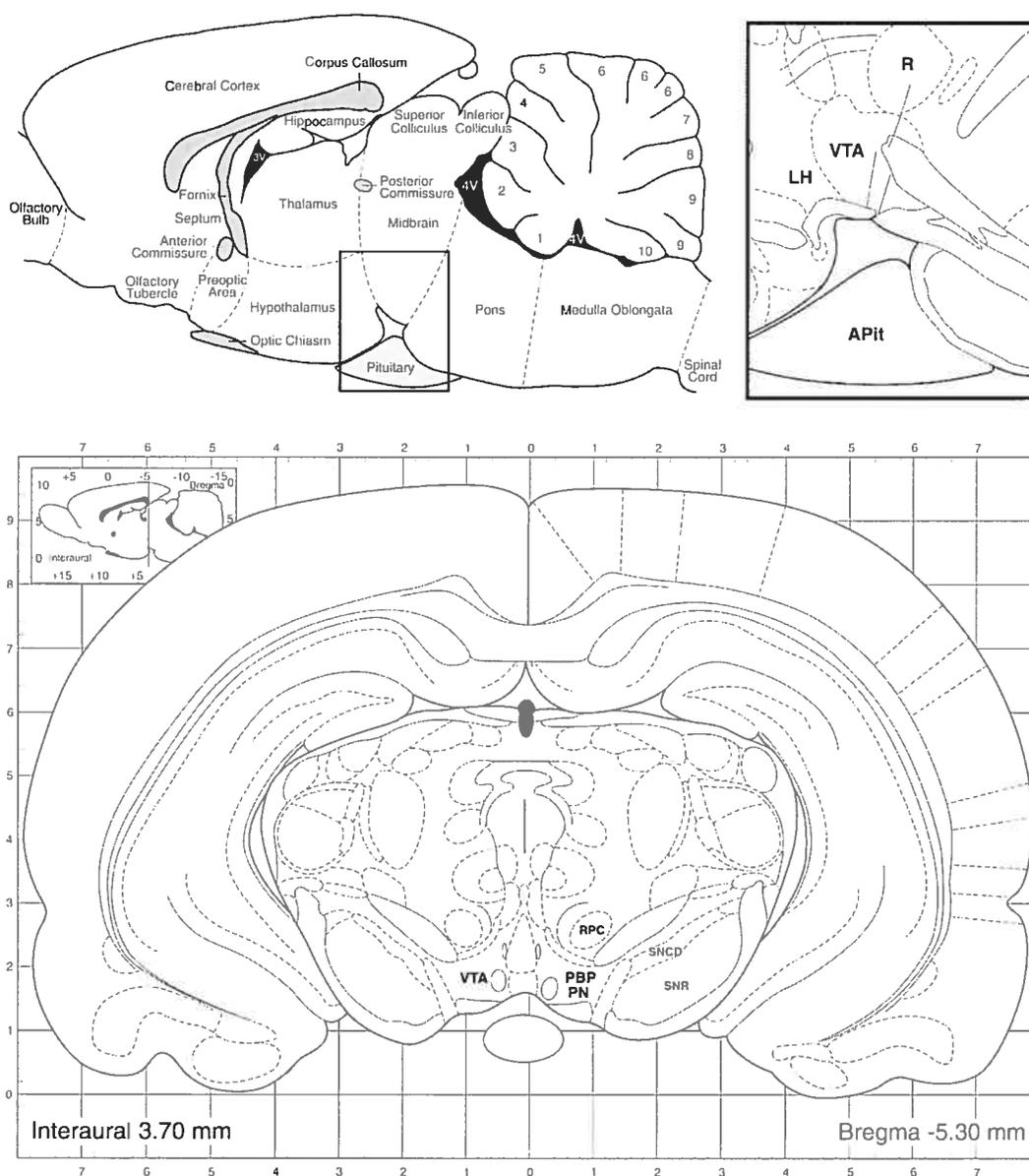
L'aire tegmentale ventrale (ATV) est un centre dopaminergique important situé dans la partie ventro-médiane de la formation réticulée au niveau du mésencéphale. Plus précisément, l'ATV est une région qui est médiane à la substance noire (SN) et ventrale au noyau rouge. Cette région est limitée par le pons au niveau caudal et par l'hypothalamus postérieur au niveau rostral (Oades et Halliday, 1987). Chez le rat, l'ATV peut être subdivisée principalement en deux parties, soit une région dorsale appelée noyau pigmenté para-branchial et une région ventro-caudale nommée noyau para-nigral (Halliday et Tork, 1986; Fallon et Loughlin, 1995) (Figure 5, p. 43). D'un point de vue morphologique, l'ATV est caractérisée par une majorité de neurones fusiformes, de dimension faible à moyenne et plutôt orientés sur un plan horizontal (Swanson, 1982). Les neurones dans la partie médiane du noyau para-branchial semblent en continuité avec ceux situés dans la partie dorsale de la substance noire compacte. Ainsi, ces neurones sont fonctionnellement et anatomiquement reliés (Fallon et Loughlin, 1995).

### **2.2 Principaux récepteurs et neurotransmetteurs**

L'aire tegmentale ventrale est composée majoritairement de neurones dopaminergiques (80%). Ce regroupement de neurones forme l'aire A10. Les neurones qui expriment la tyrosine hydroxylase sont retrouvés dans presque toutes les parties de l'ATV avec une plus forte concentration dans le tiers médian comparativement au tiers antérieur ou postérieur (Swanson, 1982). La majorité des récepteurs dopaminergiques retrouvés dans l'ATV sont des récepteurs D<sub>2</sub>.

**Figure 5 : Localisation de l'aire tegmentale ventrale dans le système nerveux central**

**Abréviations :** APit, anterior lobe of pituitary; LH, lateral hypothalamic area; PBP, parabranchial pigmented nucleus; PN, paranigral nucleus; R, red nucleus; RPC, red nucleus parvicellular part; SNCP, substantia nigra compacta part dorsal; SNR, substantia nigra reticular part; VTA, ventral tegmental area



Adapté de Paxinos & Watson, 1998

Des études en autoradiographie ont rapporté que les récepteurs D<sub>2</sub> situés dans la partie dorsale de l'ATV sont sur les dendrites et le soma des neurones dopaminergiques et joueraient donc un rôle d'auto-récepteurs (Bouthenet et al., 1987; Sales et al., 1989; Chen et Pan, 2000). Cependant, on retrouve aussi des récepteurs D<sub>2</sub> au niveau pré-synaptique sur des terminaisons neuronales afférentes (Pickel et al., 2002). Les récepteurs D<sub>1</sub> de la dopamine sont aussi présents dans l'ATV (Dubois et al., 1986). Ces récepteurs seraient situés sur les boutons terminaux des afférences GABAergiques et glutamatergiques innervant l'ATV (Smith et al., 1996; Steffensen et al., 1998; Rinaldi et Wise, 2001). Donc, contrairement aux récepteurs D<sub>2</sub>, les récepteurs D<sub>1</sub> ne modulent pas directement les neurones dopaminergiques, mais plutôt contrôlent la relâche de neurotransmetteurs des afférences innervant l'ATV.

Mise à part les afférences, la nature des neurones non-dopaminergiques dans l'ATV est peu connue. Toutefois, il semblerait qu'une certaine proportion de ces neurones sont GABAergiques. En effet, des études en électrophysiologie (Steffensen et al., 1998) et en immunocytochimie (Carr et Sesack, 2000) ont permis d'identifier des neurones non-dopaminergiques contenant du GABA dans l'ATV. Une certaine portion de ces cellules serait des inter-neurones locaux fournissant des afférences inhibitrices aux neurones dopaminergiques (O'Brien et White, 1987; Johnson et North, 1992; Steffensen et al., 1998). Cependant, on a aussi rapporté l'existence de neurones GABAergiques dans l'ATV qui auraient des projections au cortex préfrontal (Carr et Sesack, 2000) et au noyau accumbens (Van Bockstaele et Pickel, 1995). Ainsi, les cellules GABAergiques dans l'ATV formeraient une population mixte d'interneurones locaux et de neurones de projection. Plusieurs études neuroanatomiques et fonctionnelles suggèrent la présence des récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub> dans l'ATV. Ces récepteurs seraient plus

densément distribués dans la région para-nigrale de l'ATV (Churchill et al., 1992; Lu et al., 1999).

D'autres neurotransmetteurs et récepteurs sont présents dans l'ATV. Entre autres, on a identifié par immunofluorescence une sous-population de neurones dopaminergiques contenant la neurotensine (NT) et la cholécystokinine (Seroogy et al., 1987, 1988). Les récepteurs pour la NT sont situés au niveau somatodendritique et présynaptique sur les neurones dopaminergiques (Szigethy et Beaudet, 1989; Legault et al., 2002). Plusieurs études suggèrent aussi la présence de récepteurs nicotiques (Le Novère et al., 1996; Klink et al., 2001), sérotoninergiques (5-HT<sub>2</sub>) (Ugedo et al., 1989; Doherty et Pickel, 2000), NMDA et métabotropes au glutamate (Zheng et Johnson, 2003; Rodriguez et al., 2000; Swanson et Kalivas, 2000) sur des neurones dopaminergiques dans l'ATV. On a pu mettre aussi en évidence la présence de récepteurs  $\mu$ -opiacés sur les interneurones GABAergiques (Gysling et Wang, 1983; Bergevin et al., 2002).

Des études en autoradiographie et en immunohistochimie ont mis en évidence la présence des récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines dans l'ATV (Smith et Flynn, 2000; Langlois et al., 2001; Lessard et al., 2003). Un double marquage pour la tyrosine hydroxylase et le récepteur NK<sub>3</sub> a permis d'affirmer que ces récepteurs sont localisés sur les neurones dopaminergiques (Chen et al., 1998), plus précisément sur les corps cellulaires et les dendrites (Seabrook et al., 1995; Whitty et al., 1995; Ding et al., 1996). Toutefois, une étude de Stoessl (1994) a rapporté qu'une lésion à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) des faisceaux médians du cerveau antérieur ne diminue pas significativement la liaison de l'agoniste NK<sub>3</sub> senktide dans l'ATV, suggérant qu'une proportion importante de récepteurs NK<sub>3</sub> est localisée ailleurs que sur les corps

cellulaires dopaminergiques. Même si aucune étude neuroanatomique directe n'a permis de détecter les récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> dans l'ATV, plusieurs études fonctionnelles, électrophysiologiques et pharmacologiques suggèrent leur présence dans cette région. En effet, l'injection d'agonistes sélectifs pour les récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> dans l'ATV augmente la fréquence de décharge des neurones de l'aire A10 (Overton et al., 1992). Aussi, on a rapporté que l'injection de substance K (NKA) et de SP augmente l'activité comportementale (Burns et Kelley, 1988) de même que le métabolisme de la dopamine dans le noyau accumbens et le cortex préfrontal respectivement (Deutch et al., 1985). De plus, la présence de contacts synaptiques directs a été montrée entre des afférences SPergiques et des neurones dopaminergiques (Tamiya et al., 1990). Toutes ces études suggèrent donc fortement que les récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> soient présents dans l'ATV.

## **2.3 Efférences et afférences neuronales**

### **2.3.1 Principales efférences**

L'ATV est aussi appelée système mésocorticolimbique puisque ses projections peuvent être globalement subdivisées en deux : les projections mésolimbiques et les projections mésocorticales. Les projections mésolimbiques incluent les efférences au noyau accumbens (partie ventrale du striatum), aux tubercules olfactifs, aux noyaux central, médian et latéral de l'amygdale, à la région septale qui inclut le noyau basal de la stria terminalis et le septum latéral, à l'hypocampe, à la partie médiane du thalamus (habénula latérale et médiale) et au noyau supra-optique de l'hypothalamus. Les projections mésocorticales incluent les efférences aux cortex préfrontal, entorhinal, cingulaire et occipital. De plus, l'ATV a des projections à la substance grise péri-aqueducule, au noyau parabranchial, au

locus coeruleus et aux noyaux médian et dorsal du raphé, qui ont des rôles dans le système nerveux autonome (Swanson, 1982; Oades et Halliday, 1987; Saper, 1995). Les afférences au noyau accumbens, à l'amygdale, à la région septale, aux tubercules olfactifs et aux cortex préfrontal, entorhinal et cingulate sont des projections particulièrement denses en dopamine (Figure 6, p. 48) (Oades et Halliday, 1987; Fallon et Loughin, 1995). Toutefois, certaines études ont montré une sous-population de neurones GABAergiques dans l'ATV projetant aussi au cortex préfrontal et au noyau accumbens (Van Bockstaele and Pickel, 1995; Carr et Sesack, 2000). Ainsi, ces deux derniers noyaux recevraient des afférences dopaminergiques et GABAergiques de l'ATV.

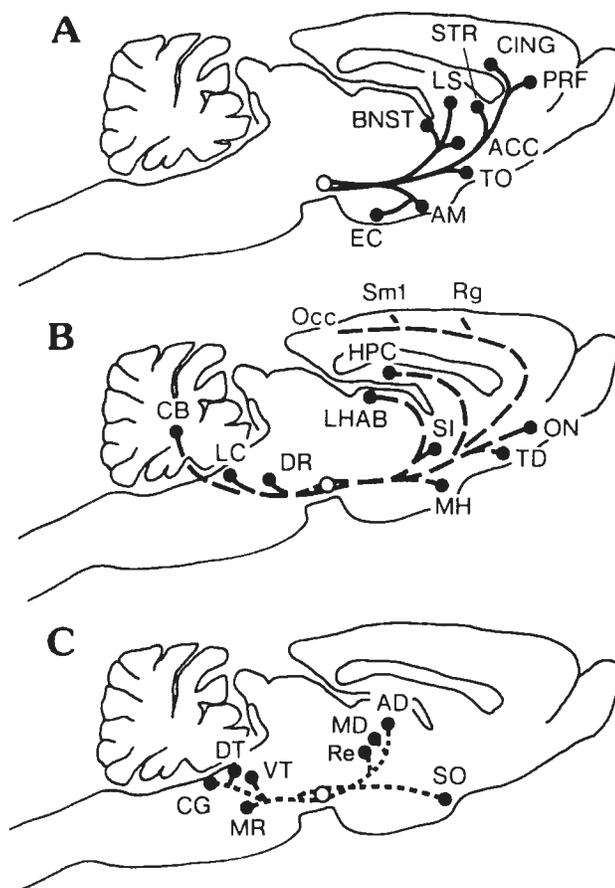
### 2.3.2 Principales afférences

L'ATV reçoit plusieurs afférences provenant de différentes régions du système nerveux central (Phillipson, 1979). Les afférences provenant de l'amygdale (Wallace et al., 1992), du noyau accumbens (Heimer et al., 1991), du cortex préfrontal (Sesack et Pickel, 1992b), du noyau du raphé dorsal (Gervais et Rouillard, 2000), du noyau de l'habénula médial (Cuello et al., 1978), du noyau tegmental pédunculo-pontine (Oakman et al., 1995) et de la région préoptique latérale et médiale de l'hypothalamus (Swanson 1982) sont celles qui sont les mieux caractérisées.

La nature de ces afférences est très variée. Par exemple, une projection de la partie « shell » du noyau accumbens au noyau para-nigral de l'ATV implique des fibres GABAergiques et enképhalinergiques (Kalivas et al., 1993). Les projections du noyau tegmental pédunculo-pontine sont plutôt cholinergiques (Oakman et al., 1995).

**Figure 6 :** Représentation schématique et nature des principales projections de l'aire tegmentale ventrale riches en dopamine (A), moyennement riches en dopamine (B), pauvres en dopamine (C)

Abréviations : ACC, N. accumbens; AD, anterodorsal thalamus; AM, amygdala; BNST, basal nucleus of stria terminalis; CB, cerebellum; CG, central gray; CING, cingulate cortex; DR, dorsal raphé; DT/VT, dorsal/ventral tegmental nucleus of Gudden; EC, entorhinal cortex; HPC, hippocampus; LC, locus coeruleus; LHAB, lateral habenula; LS, lateral septum; MD, mediodorsal thalamus; MH, medial hypothalamus; MR, median raphe; Occ, occipital cortex; ON, olfactory nuclei; PRF, prefrontal cortex; Re, N.reuniens; Rg, retrosplenial granular cortex; SI, substantia innominata; Sml, first somatosensory cortex; STR, neostriatum; SO, supraoptic nucleus; TD, diagonal band of Broca; TO, tuberculum olfactorium



Adapté de Oades & Halliday, 1987

Les afférences du cortex préfrontal feraient synapse sur les dendrites des neurones dopaminergiques et des neurones GABAergiques (Carr et Sesack, 2000). La nature de ces afférences serait glutamatergique, du moins chez les primates (Kalivas, 1993; Smith et al., 1996). Les afférences sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal font également synapse sur les neurones dopaminergiques et non-dopaminergiques (Hervé et al., 1987; Van Bockstaele et al., 1994).

Il existe une certaine discordance entre les fibres afférentes tachykininergiques qui innervent l'ATV et la présence des récepteurs des tachykinines dans cette région. En effet, bien que les récepteurs NK<sub>3</sub> soient les récepteurs des tachykinines les plus concentrés dans l'ATV, les fibres afférentes contenant la NKB ne sont pas retrouvées dans l'ATV. En contre partie, on a pu identifier des fibres SPergiques innervant l'ATV, alors qu'aucune donnée neuroanatomique directe démontre la présence des récepteurs NK<sub>1</sub> dans cette région. Les méthodes de détection utilisées peuvent ne révéler que les sites de plus forte affinité et laisser dans l'ombre les sites de faible affinité, mais physiologiquement significatifs.

On a pu identifier par microdissection chirurgicale que le noyau de l'habénula médiale est une des sources importantes de fibres SPergiques qui innerve l'ATV via le noyau fasciculus rétroflexus (Cuello et al., 1978). De plus, une étude récente utilisant la technique d'hybridation *in situ* a rapporté que 60 à 70 % des neurones qui projettent à l'ATV, expriment l'ARNm  $\beta$ -préprotachykinine (Lu et al, 1998). Ceci suggère qu'il y a des fibres afférentes SPergiques et/ou pour la NKA qui projettent à l'ATV à partir du noyau accumbens. Les fibres SPergiques sont observées dans toutes les subdivisions de l'ATV, avec cependant une plus forte densité dans la région para-nigrale

(Halliday et Tork, 1988). De plus, une étude en immunohistochimie a montré que les fibres SPergiques dans l'ATV font des contacts synaptiques directs avec les neurones dopaminergiques (Tamiya et al., 1990). Une contribution plus modeste en SP proviendrait du noyau du raphé dorsal en co-localisation avec la sérotonine (Hokfelt et al., 1978) et de la région pédonculopontine en co-localisation avec l'acétylcholine (Vincent et al., 1986). La densité et la distribution des fibres marquées pour la NKA seraient approximativement égales à celles des fibres SPergiques dans l'ATV (Kalivas et al., 1985; Deutch et al., 1985). Aucune afférence contenant la NKB n'a encore été décrite. Cependant, des études en immunohistochimie et en hybridation *in situ* ont mis en évidence la présence de NKB et d'ARNm pour la NKB, entre autres, au niveau du complexe amygdaloïde, du noyau accumbens, du noyau de l'habénula, du cortex et de la région préoptique médiale. Tout ces noyaux ont des voies de projections à l'ATV (Marksteiner et al., 1992; Merchenthaler et al., 1992).

## **2.4 Rôles fonctionnels de l'aire tegmentale ventrale**

L'ATV possède un très grand nombre d'afférences et d'efférences qui mettent en relation le système limbique et cortical, deux systèmes impliqués classiquement dans les émotions, la motivation et les fonctions motrices. L'ATV qui est au centre de ce réseau de voies neuronales est donc impliquée dans plusieurs grandes fonctions du système nerveux central.

### **2.4.1 Régulation de l'activité locomotrice**

L'ATV est une région très importante pour la régulation de l'activité locomotrice. En particulier chez les rats néonataux, une lésion électrolytique

des neurones dopaminergiques mésocorticaux qui entraîne une réduction importante de dopamine dans le cortex préfrontal et le septum, augmente vers le 20<sup>e</sup> jour l'activité locomotrice. Ceci suggère que les neurones dopaminergiques mésocorticaux ont un rôle dans le développement de l'activité locomotrice chez le rat (Heffner et al., 1983). Normalement, chez le rat adulte, le comportement d'exploration est très fréquent en présence d'un objet inconnu ou encore d'un environnement nouveau. Cependant, suite à une dénervation du système dopaminergique mésocorticolimbique, ce comportement est significativement réduit. Cette réduction est corrélée avec une perte complète ou presque des terminaisons dopaminergiques dans le noyau accumbens, les tubercules olfactifs, le noyau basal de la stria terminalis, le noyau septal latéral et les couches profondes du cortex frontal et piriforme. De plus, l'administration systémique d'apomorphine, un agoniste dopaminergique, renverse le déficit d'exploration chez les rats lésionnés, suggérant fortement que les différentes projections dopaminergiques du système mésocorticolimbique sont nécessaires pour une activité locomotrice et un comportement d'exploration normal chez le rat adulte (Fink et Smith, 1980).

L'injection répétée d'opiacés ou de psychostimulants dans l'ATV induit une sensibilisation comportementale qui se caractérise par une augmentation progressive et continue du comportement en réponse à certains psychostimulants tels que l'amphétamine et la cocaïne (Kalivas et al., 1985; DuMars et al., 1988). Un changement durable de la transmission dopaminergique de la projection se rendant de l'ATV au noyau accumbens pourrait être associé à la sensibilisation comportementale (Kalivas et al., 1993).

### 2.4.2 Sevrage et dépendance aux drogues

Plusieurs études ont rapporté que le système mésolimbique ainsi que les récepteurs aux opiacés présents dans l'ATV sont responsables de l'initiation du renforcement aux opiacés et à l'abus des drogues. L'administration systémique de morphine (agoniste des récepteurs Mu) augmente la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques dans l'ATV (Matthews et German, 1984). De plus, on a rapporté que les amphétamines, la cocaïne et l'héroïne augmentent la relâche de dopamine et de ses métabolites dans le noyau accumbens (Di Chiara et Imperato, 1988; Wise, 1996). L'activation des récepteurs Mu sur les neurones GABAergiques enlèverait l'inhibition que ces derniers exercent sur les neurones dopaminergiques et ainsi stimulerait la relâche de dopamine dans le noyau accumbens (Leone et al., 1991; Johnson et North, 1992). Des terminaisons enképhalinerigiques font synapses directement sur les neurones dopaminergiques et non-dopaminergiques dans l'ATV. Les opiacés peuvent donc réguler directement ou indirectement les voies dopaminergiques mésocorticolimbiques (Sesack et Pickel, 1992a). L'alcool (éthanol) influence aussi l'activité des neurones dopaminergiques dans l'ATV (Wise, 1996; Appel et al., 2003). En effet, un retrait de l'éthanol suite à un traitement chronique chez le rat, donne lieu à une réduction de l'activité électrique des neurones dopaminergiques (Shen, 2003).

### 2.4.3 Implication dans le stress

On a rapporté que le stress, de la même manière que les psychostimulants, peut précipiter les épisodes de psychose et jouerait un rôle dans l'initiation de plusieurs troubles psychiatriques. Des événements

stressants agiraient comme stimuli afférents sur les neurones dopaminergiques dans l'ATV. La SP, le glutamate et les opiacés seraient impliqués dans les réponses induites par le stress dans l'ATV. En effet, une inhibition de ces récepteurs dans la région A10 prévient la transmission dopaminergique induite par le stress dans le cortex préfrontal et le noyau accumbens (Kalivas et Stewart, 1991). De plus, on a rapporté qu'un stress induit par un choc intermittent à la queue chez le rat augmente les niveaux extracellulaires de dopamine de 25% dans le striatum, de 39% dans le noyau accumbens et de 95% dans le cortex médial frontal (Abercrombie et al., 1989).

#### **2.4.4 Régulation cardiovasculaire**

Plusieurs noyaux impliqués dans les projections mésolimbiques et mésocorticales de l'ATV ont un rôle cardiovasculaire. Par exemple, le noyau accumbens (Kirouac et Ciriello, 1997), le noyau basal de la strie terminale (van der Kooy et al., 1984) et l'amygdale (Cassell et Gray, 1989) ont tous des afférences ou efférences qui les relient au noyau du faisceau solitaire et /ou à la médulla ventrolatérale, deux noyaux du système nerveux central connus pour leur implication dans la régulation cardiovasculaire. De plus, on a rapporté qu'une stimulation du noyau accumbens et de l'amygdale induit respectivement une diminution et une augmentation de la pression artérielle (Shen et al., 1993; Li et Ku, 2002). La région septale latérale qui reçoit aussi des afférences de l'ATV est impliquée dans les changements phasiques de la pression artérielle en réponse à un comportement (Kubo, 1998). L'ATV projette également au noyau supra-optique de l'hypothalamus qui reçoit des afférences de la médulla ventrolatérale (Anderson et al., 1990). De plus, ce noyau contient les neurones magnocellulaires responsables de la sécrétion de vasopressine, un neuropeptide important dans le contrôle de la pression

artérielle. Une des projections mésocorticales importante de l'ATV est au cortex préfrontal. On a rapporté qu'une stimulation du cortex préfrontal médial induit une inhibition sympathique et un effet dépresseur via une stimulation du baroréflexe (Owens et al., 1999). Ainsi, par ses nombreuses projections, l'ATV est en mesure de moduler indirectement le système cardiovasculaire.

Grâce à des observations faites dans des modèles de rats hypertendus (SHR ou DOCA-sel) ou encore chez des patients ayant une altération centrale du système dopaminergique, l'ATV s'est vu attribuer depuis quelques années un rôle dans la régulation centrale du système cardiovasculaire. Le système dopaminergique mésolimbique jouerait un rôle dans la régulation diurne de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque chez le rat. Normalement, durant le sommeil, la pression artérielle diminue. Toutefois, une lésion du système dopaminergique mésolimbique altère la baisse de pression artérielle observée chez le rat au repos (Sakata et al., 2002). De plus, la majorité des patients atteints de Parkinson et qui ont des problèmes avec leur système nerveux autonome, ne présentent pas de baisse nocturne de pression artérielle. En fait, le sommeil comporte deux phases soit la phase REM (rapid eye movement) et la phase non-REM. Il a été montré que la pression artérielle et la fréquence cardiaque augmentent durant le passage de la phase non-REM à la phase REM. Les neurones dopaminergiques mésolimbiques seraient également impliqués dans ces changements cardiovasculaires puisque qu'une lésion à la 6-OHDA dans l'ATV supprime l'augmentation de pression artérielle et de fréquence cardiaque observée durant le passage à la phase de REM (Sei et al., 1999).

L'injection i.c.v. de 6-OHDA chez de jeunes rats SHR préhypertendus inhibe le développement subséquent de l'hypertension (van den Buuse et al., 1986), suggérant ainsi que le système dopaminergique central est impliqué dans l'étiologie de l'hypertension artérielle chez ces rats. De plus, on a rapporté une augmentation des récepteurs D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> de la dopamine chez les SHR de 5 semaines de même qu'une augmentation des récepteurs D<sub>1</sub> chez les SHR de 15 semaines dans le noyau accumbens (Kirouac et Ganguly, 1993). L'ARNm pour le récepteur D<sub>2</sub> est aussi augmenté chez les SHR de 6 semaines dans le noyau accumbens et les tubercules olfactifs, deux afférences importantes de l'ATV (Vaughan et al., 1999). Dans le modèle d'hypertension DOCA-sel, on rapporte aussi une augmentation des récepteurs D<sub>2</sub> dans le striatum et les tubercules olfactifs chez les rats de 7 semaines (Le Fur et al., 1981). Il semble donc que l'augmentation de l'expression des récepteurs dopaminergiques chez les rats préhypertendus n'est pas spécifique au modèle d'hypertension utilisé.

Chez le rat normotendu, une activation du baroréflexe soit par une stimulation électrique du nerf dépresseur aortique ou par l'injection intra-veineuse de phényléphrine altère la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques dans l'ATV (Kirouac et Ciriello, 1997). Les neurones de l'ATV sont donc sensibles aux variations de pression artérielle. De plus, des études rapportent qu'une stimulation électrique de l'ATV chez le rat anesthésié (Cornish et van den Buuse, 1994), de même qu'une stimulation chimique avec un analogue stable de la SP (le DiMe-C7) chez le rat conscient (Cornish et van den Buuse, 1995) causent une augmentation de la pression artérielle qui peut être bloquée par l'administration i.v. des antagonistes D<sub>1</sub> et/ou D<sub>2</sub> de la dopamine ainsi que par un antagoniste V<sub>1</sub> de la vasopressine.

Les tachykinines injectées dans l'ATV modulent les neurones dopaminergiques du système mésocorticolimbique. En effet, plusieurs études ont rapporté que l'injection d'agonistes naturels et synthétiques pour les récepteurs NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> dans l'ATV augmente la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques ainsi que la transmission dopaminergique et le métabolisme de la dopamine au niveau des principales efférences de l'ATV, soit le cortex préfrontal et le noyau accumbens (Deutch et al., 1985; Elliott et al., 1986; Cador et al., 1989; Overton et al., 1992; Marco et al., 1998).

### 3.0 Objectifs généraux du mémoire

Plusieurs données directes et indirectes suggèrent que l'ATV et les tachykinines sont impliquées dans la régulation centrale de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et de l'activité comportementale. De plus, plusieurs études ont montré que l'administration d'agonistes des tachykinines dans l'ATV module les neurones dopaminergiques du système mésocorticolimbique. Toutefois, aucune étude n'a évalué directement l'implication relative de chacun des trois récepteurs des tachykinines dans les effets cardiovasculaires et comportementaux observés suite à la stimulation de l'ATV.

Cette étude *in vivo* vise donc à évaluer, en premier lieu, les effets cardiovasculaires des tachykinines dans l'ATV à l'aide d'agonistes et d'antagonistes sélectifs des récepteurs NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> chez le rat normotendu. En parallèle, notre modèle du rat éveillé et non restreint nous permettra d'étudier les effets comportementaux de chacun de ces agonistes suite à leur injection dans l'ATV et de voir s'ils sont reliés aux effets cardiovasculaires. Cette étude pharmacologique confirmera d'un point vu fonctionnel la présence de chacun des récepteurs des tachykinines dans l'ATV. Enfin, ces résultats permettront de mieux connaître la participation des tachykinines dans les mécanismes centraux de régulation cardiovasculaire et dans l'activité comportementale chez le rat.

## DEUXIÈME CHAPITRE

### THE VENTRAL TEGMENTAL AREA AS A PUTATIVE TARGET FOR TACHYKININS IN CARDIOVASCULAR REGULATION

Kathleen Deschamps & Réjean Couture\*

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128,

Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

**Running title :** Tachykinin receptors in the ventral tegmental area

**\*Author for correspondence**

Tel.: (514)-343-7060

Fax: (514)-343-2111



## Summary

- 1 A pharmacological study was performed in freely behaving rat to examine the relative participation of the three tachykinin receptors in cardiovascular regulation at the level of the ventral tegmental area (VTA).
- 2 The microinjection of increasing doses (1 to 1000 pmol) of NK<sub>1</sub> agonist ([Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP) and NK<sub>3</sub> agonist (senktide) produced pressor responses and tachycardia while the NK<sub>2</sub> agonist ([β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10)) induced variable effects on blood pressure and heart rate (tachycardia and/or bradycardia). These cardiovascular effects were selectively and reversibly blocked by the prior injection of antagonists for NK<sub>1</sub> receptors (LY 303870, 5 nmol), NK<sub>2</sub> receptors (SR 48968, 250 pmol) and NK<sub>3</sub> receptors (SB 235375, 25 nmol).
- 3 Accompanying the cardiovascular responses, behavioural manifestations were elicited by [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (face washing = sniffing < wet dog shake), [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (head scratching < wet dog shake) and senktide (sniffing = digging < face washing < head scratching < rearing < wet dog shake) where senktide >> NK<sub>1</sub> agonist > NK<sub>2</sub> agonist.
- 4 These data show that tachykinins can act in the VTA to control blood pressure and heart rate in normotensive rat. The modulation of the mesocorticolimbic dopaminergic system by the three tachykinin receptors, primarily by NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub>, may play an important role in the cardiovascular component of the defence reaction and in the adjustment of cardiovascular changes with psychomotor function.

**Keywords:** Tachykinins; tachykinin NK<sub>1</sub>; NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors; ventral tegmental area; cardiovascular regulation; behaviours; dopamine

**Abbreviations:** aCSF, artificial cerebrospinal fluid; ANOVA, analysis of variance; DA, dopamine; DMSO, dimethylsulphoxide; HR, heart rate; i.c.v., intracerebroventricular; i.p., intraperitoneal; MAP, mean arterial blood pressure; NKA, neurokinin A; NKB, neurokinin B; NTS, nucleus tractus solitarius; s.c., subcutaneous; SP, substance P

## Introduction

A role for tachykinins has been suggested in the central autonomic control of blood pressure and in cardiovascular defence reactions (Unger *et al.*, 1988; Culman & Unger, 1995; Couture *et al.*, 1995). The intracerebroventricular (i.c.v) injection of substance P (SP), neurokinin A (NKA) and neurokinin B (NKB) or receptor selective agonists in freely moving rats leads to increases in mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) and this is accompanied by typical behaviours such as face washing, sniffing, grooming and wet dog shakes (Takano *et al.*, 1990; Tschöpe *et al.*, 1992; Itoi *et al.*, 1992; Cellier *et al.*, 1997; 1999). The exact site and mechanism of action of tachykinins in the central autonomic control of blood pressure remain unclear. Thus far, the anterior hypothalamus represents the primary putative target for tachykinins (Itoi *et al.*, 1991; 1994) although a role for the nigro-striatal dopaminergic system was highlighted in recent pharmacological studies in normotensive and spontaneously hypertensive rats (Lessard & Couture 2001; Lessard *et al.*, 2003).

A potential strategic site for tachykinins in cardiovascular regulation is the ventral tegmental area (VTA) (A10 dopamine cell group) located in the midbrain, medially to the substantia nigra. The main neuronal dopaminergic projections of the mesocortical-mesolimbic system from the VTA are to the prefrontal cortex, the nucleus accumbens of the striatum and the amygdala (Swanson, 1982; Oades & Halliday, 1987). Endogenous SP, NKA and tachykinin NK<sub>3</sub> receptors are present in the VTA (Kalivas *et al.*, 1985; Deutch *et al.*, 1985; Warden & Young, 1988; Ding *et*

*al.*, 1996; Shughrue *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Lessard *et al.*, 2003). The distribution of NK<sub>3</sub> receptor immunoreactive neurons completely overlaps that of tyrosine hydroxylase neurons in this area (Chen *et al.*, 1998) and SP immunoreactive axon terminals make direct synaptic contact with dopaminergic neurons in the VTA (Tamiya *et al.*, 1990). SP projecting fibres in the VTA originate from the nucleus accumbens and the medial habenular nucleus (Cuello *et al.*, 1978; Lu *et al.*, 1998). Application of NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptor agonists in the VTA increases the firing rate of A10 dopamine cells (Overton *et al.*, 1992). Also, SP and NK<sub>3</sub> agonists cause increases in the levels of dopamine, its metabolite dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and dopamine turnover in the prefrontal cortex and nucleus accumbens (Elliott *et al.*, 1986 a, b; Cador *et al.*, 1989; Marco *et al.*, 1998) as well as behavioural effects consistent with mesolimbic dopaminergic activation (Eison *et al.*, 1982).

Electrical stimulation of the VTA or microinjection of a stable analogue of SP (DiMe-C7 or [pGlu<sup>5</sup>, MePhe<sup>8</sup>, Sar<sup>9</sup>]-SP (5-11)) in the rat VTA produces increases in blood pressure and heart rate. The DiMe-C7-mediated effects result from central dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors activation and vasopressin release (Cornish & van den Buuse, 1994; 1995; van den Buuse, 1998). Despite the wealth of anatomical, biochemical and behavioural evidence for a regulatory function of tachykinins on the mesolimbic dopaminergic system, little is known regarding the relative participation of the three tachykinin receptors in the cardiovascular function of the VTA.

Therefore, this study was undertaken to assess the relative participation of the three tachykinin receptors in cardiovascular control at the level of the VTA. This was

achieved with a pharmacological approach using selective agonists and antagonists microinjected unilaterally in the VTA of freely behaving rat. The agonists and non-peptide antagonists used were: [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (Regoli *et al.*, 1988) and LY 303870 (Iyengar *et al.*, 1997; Cellier *et al.*, 1999) for NK<sub>1</sub> receptors, [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (Rovero *et al.*, 1989) and SR 48968 (Advenier *et al.*, 1992; Emonds-Alt *et al.*, 1992) for NK<sub>2</sub> receptors, and senktide (Wormser *et al.*, 1986) and SB 235375 (Hay *et al.*, 2002) for NK<sub>3</sub> receptors. Behavioural activity induced by the agonists was measured in parallel to the cardiovascular changes to provide insights into possible relationship between these centrally mediated responses.

## Methods

### *Animal source and care*

Male Wistar rats (300-350g) were purchased 3-5 days prior to experiments from Charles River, St-Constant, Québec, Canada and housed two per cage under a 12h light-dark cycle in a room with controlled temperature (22°C) and humidity (40%). Food (Charles River Rodent) and tap water were available *ad libitum*. The care of animals and research protocols conformed to the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal Care and approved by the Animal Care Committee of our University.

### *Animal preparation*

Male Wistar rats (n =147) were anaesthetized with an intraperitoneal (i.p) injection of 65 mg kg<sup>-1</sup> sodium pentobarbitone (Somnotol; M.T.C. Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada). Before each surgery, rats received a mixture of Trimethoprim and Sulfadiazine (tribrissen 24%, 5 and 26 mg kg<sup>-1</sup> respectively, s.c. Schering Canada Inc., Montréal, Québec, Canada) and Ketoprophen (anafen, 10 mg kg<sup>-1</sup>, s.c., MERIAL Canada Inc., Montréal, Québec Canada). Also, to avoid core hypothermia during the surgery, rats were installed with a rectal thermometer connected to a heating-pad calibrated at 35°C. Animals were then positioned in a stereotaxic frame (David Kopf Instrumentation, Tujunga, CA, U.S.A) with the incisor bar set at 3.3 mm below the interaural line. The skull was exposed, cleaned and a hole was drilled above the right VTA (coordinates: 5.3 mm posterior to the bregma, 0.7 mm lateral to the midline, 7.0 mm ventral from the skull surface; Paxinos & Watson,

1998). A 23G stainless steel guide cannula was implanted 2 mm above the VTA to prevent its damage and fixed with two screws and dental cement to the skull. Then, the skin was repositioned and sutured. Finally, stylet (31G stainless steel) was inserted into the guide cannula to prevent loss of cerebrospinal fluid and hemorrhage. Animals were housed in individual plastic cage (40 x 23 x 20 cm) in the same controlled conditions and allowed to recover for 5 to 7 days. Afterwards, the rats were re-anaesthetized with sodium pentobarbitone ( $65 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) and an intravascular siliconized (Sigmacote, Sigma, St-Louis, MO, U.S.A.) polyethylene tubing PE-50 catheter (Intramedics, Clay Adams, NJ, U.S.A.), filled with physiological saline and  $100 \text{ i.u. ml}^{-1}$  heparin sodium salt (Sigma, St-Louis, MO, U.S.A.), was inserted into the abdominal aorta via the femoral artery. Then, the catheter was tunneled subcutaneously and exteriorized at the back of the neck for direct blood pressure recording. Recovery from anaesthesia was monitored closely under a warming lamp to maintain the body temperature of the animals. Thereafter, rats were housed individually in polyethylene cages with a top grid and returned to their resident room. On the subsequent days, rats that lost more than 25% of their body weight or had clear signs of cerebral hemorrhage, atypical behaviour or weaknesses were immediately humanely killed with an overdose of pentobarbitone. Experimental protocols were initiated 24 to 48h after the last surgery in conscious and freely moving rats.

### *Measurement of cardiovascular parameters*

During all experiments, continuous direct recordings of pulse blood pressure and heart rate were made respectively with a Statham pressure Transducer (P23ID) and a cardiac tachometer (model 7P4) (triggered by the arterial blood pressure pulse) coupled to a Grass polygraph (model 79; Grass Instruments Co., Quincy, MA, U.S.A.). Cardiovascular responses were measured 1h after the rats were transported to an isolated and quiet testing-room, where only the experimenter had access. Rats remained in their resident cage but the top grid was removed and they had no more access to the food and water for about 3-5 h, which corresponds to the duration of the experiments. When resting blood pressure and heart rate were stable, a 31G stainless steel injector connected to a Hamilton microsyringe (5  $\mu$ l Fisher Scientific Ltd, Montréal, Québec, Canada) with a PE-10 tubing was inserted into the guide cannula without handling the rat. The injector extended 2 mm beyond the guide cannula (17 mm) to penetrate in the VTA. Microinjections were made into the VTA of resting and freely behaving rats. All solutions were freshly prepared and injected (volume of 0.2  $\mu$ l) over a period of 1 min. The injector was removed from the guide cannula one min after injection to prevent any possible leakage of the injectate.

### *Measurement of behavioural parameters*

Behavioural activity was measured as previously reported (Picard *et al.*, 1994). Briefly, during every consecutive period of 15 s, a score of 1 or 0 was given systematically depending on whether the animal showed the specific type of behaviour or not, whatever its frequency, intensity or duration during that period.

Summation of scores for the first 30 min period following VTA injection provided the behavioural scores for face washing, sniffing, head scratching, digging and rearing. The maximal theoretical score was 120 (15 s intervals x 30 min). Wet dog shake behaviour was measured according to the number of episodes or frequency during the first 30 min period.

### *Histology*

At the end of the experimental protocol, the rats were sacrificed with an overdose of sodium pentobarbitone and received immediately 0.1 µl of Evans Blue dye (Sigma, St-Louis, MO, U.S.A.) in VTA. The brains were removed and fixed with 10% (v v<sup>-1</sup>) formol and 20% (w v<sup>-1</sup>) sucrose. Coronal sections (40 µm, cut on freezing microtome) were mounted on glass slides and stained with cresyl violet for histological examination of the microinjection sites (Fig. 1). Rats that showed any evidence of haemorrhage or extensive necrosis (n = 29) were excluded from the study.

### *Experimental protocols*

#### *Experiment 1: dose-response curves to VTA microinjection of selective tachykinin agonists*

Two different groups of rats were used to construct the entire dose-responses curves with agonists: the first group was used for the doses of 1 pmol, 10 pmol and 25 pmol whereas the second group was used for the highest doses of 50 pmol, 100 pmol, 200 pmol and 1000 pmol. Rats initially received a VTA microinjection of

artificial cerebrospinal fluid (aCSF) followed 60 min later by a single dose of either [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (1 to 25 pmol (n = 8), 50 to 1000 pmol (n = 10)), [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (1 to 25 pmol (n = 10), 50 to 1000 pmol (n = 6)) and senktide (1 to 25 pmol (n = 8), 50 to 1000 pmol (n = 9)). Each rat was selected randomly and injected with only one of the three agonists for the remainder of the protocol. For each group, increasing doses of [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP, [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) or senktide were given at 24 h intervals so the rats were used on 3 to 4 consecutive days.

*Experiment 2: effects of VTA microinjection of selective tachykinin antagonists*

Rats that had previously (24 h) received 10 pmol of [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP or 25 pmol of either [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) or senktide were given VTA microinjection of the NK<sub>1</sub> antagonist LY 303870 (5 nmol against [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (n = 8) or senktide (n = 6)), the NK<sub>2</sub> antagonist SR 48968 (250 pmol against [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (n = 14) or [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (n = 6)) and NK<sub>3</sub> antagonist SB 235375 (25 nmol against senktide (n = 6) or [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (n = 8)), Then, the agonist was injected in the VTA 15 min later (25 pmol of NK<sub>2</sub> or NK<sub>3</sub> agonist) or 30 min later (10 pmol of NK<sub>1</sub> agonist). The agonists were re-injected alone 24 h later to assess the reversibility of any blockade observed in the presence of antagonist on the preceding day. This protocol also permitted to determine the selectivity of the blockade by each antagonist.

To control for specific blockade with the antagonist and to exclude any possibility that the blockade was not the consequence of receptor desensitization, the vehicle of LY 303870 (8 % DMSO + 10 % of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin mixed

with aCSF, n = 6) and of SB 235375 (aCSF, n = 5) or the opposite (R) enantiomer of SR 48968 (SR 48965, n = 8) were injected prior to the agonists as described above with the antagonists. Doses of agonists in these protocols represent the minimal doses displaying significant cardiovascular effects on the pre-established dose-response curves. The doses of LY 303870 and SB 235375 were based on a series of preliminary experiments that showed potent inhibition without side effects at 5 nmol and 25 nmol, respectively. Lower doses of antagonists provided only partial blockade. The dose of SR 48968 (250 pmol) was based on a previous study that reported an effective inhibition of the intra-nigral effects of 25 pmol [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) in the same animal model (Lessard & Couture, 2001).

#### *Drugs and solutions*

The artificial CSF (aCSF) was purchased from Harward Bioscience (Massachusetts, U.S.A.). [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (MW: 1392.9), [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (MW: 780.9) and succinyl-[Asp<sup>6</sup>, MePhe<sup>8</sup>]SP(6-11) (senktide) (MW: 842) were all purchased from Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA, U.S.A.). The non-peptide NK<sub>1</sub> antagonist LY 303870 ((R)-1-[N-(2-methoxybenzyl)acetylamino]-3-(1H-indol-3-yl)-2-[N-(2-(4-(piperidin-1-yl)piperidin-1-yl)acetyl)amino]propane) (MW: 686.7) was obtained from Eli Lilly (Indianapolis, IN, U.S.A.), the non-peptide NK<sub>2</sub> antagonist SR 48968 ([S)-N-methyl-N-[4-acetylamino-4-phenylpiperidino-2-(3,4-dichlorophenyl)butyl]benzamide]) (MW: 552.5) and its opposite enantiomer SR 48965([R)-N-methyl-N-[4-acetylamino-4-phenylpiperidino-2-(3,4-dichlorophenyl)

butyl]benzamide]) were provided by Dr X. Emonds-Alt (Sanofi Recherche, Montpellier, France). The non-peptide NK<sub>3</sub> antagonist SB 235375 ((-)-(S)-N-( $\alpha$ -ethylbenzyl)-3-(carboxymethoxy)-2-phenylquinoline-4-carboxamide) (MW: 437) was obtained from Dr H.M. Sarau (GlaxoSmithKline, PA, USA). [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP and SB 235375 were dissolved directly in aCSF whereas the other agonists and antagonists were solubilized in dimethyl sulphoxide (DMSO; Fisher, Montréal, Québec, Canada) and aCSF mixed with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (Sigma, St-Louis, MO, U.S.A.) was added to obtain the desired solution (final concentrations contained a maximum of 15% DMSO and 20 % 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin). In all experiments, vehicle was tested as control and no significant effects were seen on any parameters when compared to baseline values. Stock solutions (1 to 10 mg ml<sup>-1</sup>) of agonists and antagonists were stored in aliquot of 20 to 100  $\mu$ l at -20°C until use.

#### *Statistical analysis of data*

Results are expressed as means  $\pm$  s.e. mean of (n) rats. Maximal effects were analyzed for statistical significance by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett test for multiple comparisons with one control group. The time course of the effects was analyzed with a two-way ANOVA. The behaviour values were evaluated with the Kruskal-Wallis non-parametric test and the paired Student's *t*-test. Only probability values (P) less than 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

### *Cardiovascular effects of the NK<sub>1</sub> agonist, [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP*

The effects of five increasing doses of [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP on MAP and HR are shown in Figure 2. The NK<sub>1</sub> agonist produced significant increases ( $P < 0,05$ ) in MAP and HR when compared to vehicle values (aCSF, Fig. 3a). The maximum rises in MAP were significant at 10 pmol ( $11 \pm 2$  mmHg,  $n = 8$ ), 100 pmol ( $10 \pm 2$  mmHg,  $n = 10$ ) and 1000 pmol ( $15 \pm 2$  mmHg,  $n = 10$ ). The maximum increases in HR evoked by [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP were significant at all doses: 1 pmol ( $74 \pm 10$  b.p.m.), 10 pmol ( $87 \pm 22$  b.p.m.), 25 pmol ( $76 \pm 17$  b.p.m.), 100 pmol ( $117 \pm 16$  b.p.m.) and 1000 pmol ( $125 \pm 14$  b.p.m.). The effect of 10 and 200 pmol [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP peaked at 8 min post-injection for MAP and HR. Although the pressor response was already maximal at 10 pmol, the tachycardia was slightly greater and more prolonged at 200 pmol (Figs. 2c, d and 3b).

### *Cardiovascular effects of the NK<sub>2</sub> agonist, [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>] NKA (4-10)*

The effects of five increasing doses of [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>] NKA (4-10) on MAP and HR are shown in Figure 4. [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) had a weak but significant effect on MAP at 25 pmol; the time-course effect was significant when compared with vehicle (aCSF + 10 % DMSO), yet maximal values did not reach statistical significance (Fig. 4a and c). The NK<sub>2</sub> agonist increased significantly HR when compared with vehicle values but not at all doses since the agonist caused also bradycardia at 1 pmol ( $-30$  b.p.m. in 1/10 rat), 10 pmol ( $-33 \pm 3$  b.p.m. in 3/10 rats), 25 pmol ( $-33 \pm 3$  b.p.m. in 3/8 rats), 100 pmol ( $-55 \pm 15$  b.p.m. in 2/10 rats) and 1000 pmol ( $-45 \pm 9$  b.p.m. in 4/6 rats).

Thus, the maximum rise in HR produced by [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) was not significant at 1 and 100 pmol, yet it was significant at 10 pmol ( $68 \pm 9$  b.p.m.,  $n = 10$ ), 25 pmol ( $75 \pm 16$  b.p.m.,  $n = 10$ ), and 1000 pmol ( $73 \pm 23$  b.p.m.,  $n = 6$ ). The tachycardia produced at 25 pmol reached its maximum at 7 min post-injection (Figs. 3c and 4d). A larger dose (100 pmol) caused a smaller tachycardia because of the predominant bradycardia. The effect of 25 pmol was reproduced after the pre-injection of 100 pmol of [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10). Moreover, the effect of the agonist at 100 pmol was similarly small when injected for the first time to naïve animals (data not shown), excluding therefore the possibility that the lower tachycardia elicited by the NK<sub>2</sub> agonist at higher doses is due to a desensitization mechanism caused by the prior injections of agonist.

#### *Cardiovascular effects of the NK<sub>3</sub> agonist, Senktide*

The effects of five increasing doses of senktide on MAP and HR are shown in Figure 5. The NK<sub>3</sub> agonist induced pressor responses and tachycardia which were significant ( $P < 0,05$ ) compared with vehicle values (aCSF + 10 % DMSO). The maximal pressor responses produced by senktide were significant at 25 pmol ( $16 \pm 4$  mmHg,  $n = 8$ ), 100 pmol ( $16 \pm 2$  mmHg,  $n = 9$ ) and 1000 pmol ( $16 \pm 2$  mmHg,  $n = 9$ ). The maximum rises in HR were significant at all doses: 1 pmol ( $95 \pm 19$  b.p.m.), 10 pmol ( $92 \pm 13$  b.p.m.), 25 pmol ( $95 \pm 13$  b.p.m.), 100 pmol ( $102 \pm 18$  b.p.m.) and 1000 pmol ( $80 \pm 13$  b.p.m.). Thus, maximal increases in MAP and HR were reached at 25 and 1 pmol, respectively. The pressor and tachycardic responses induced by 25

and 100 pmol senktide peaked at 8-9 min post-injection and displayed similar time-course effect at both doses (Figs. 3d and 5c, d).

#### *Behavioural responses to tachykinin agonists*

The injection of [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP and [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) into the VTA increased behavioural activity but to a lower extent than senktide (Fig.6). While the maximal responses were obtained at 10 pmol for [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (face washing = sniffing < wet dog shake), [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) increased dose-dependently head scratching and wet dog shake reaching its nadir at 25 pmol (head scratching < wet dog shake). Senktide increased in a dose-dependent manner face washing, head scratching and wet dog shake with a maximal effect at 25 pmol. The rearing behaviour was already maximal at 10 pmol as sniffing and digging behaviours whose effects were smaller. The three tachykinin agonists failed to cause additional behavioural effects when injected at doses of 100 and 1000 pmol (data not shown). Each tachykinin agonist had a similar time-course effect on behavioural and cardiovascular changes (not shown).

#### *Effects of LY 303870 on cardiovascular responses induced by [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP and senktide*

The effects of the tachykinin NK<sub>1</sub> antagonist LY 303870 and its vehicle on [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP or senktide-induced cardiovascular responses are shown in Fig. 7 and Tables 1 and 2. The MAP and HR responses to [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (10 pmol) were completely abolished by 5 nmol LY 303870 (Fig. 7a). The effects of [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP on MAP and HR were partly back 24 h after LY 303870 injection. On the

other hand, the cardiovascular responses induced by 10 pmol senktide were not significantly altered by 5 nmol LY 303870 (Table 1). Also, the vehicle of LY 303870 (aCSF + 8 % DMSO and 10 % of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin) had no effect on the pressor response and the tachycardia induced by [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP administered 30 min or 24h later (Table 2). LY 303870 or its vehicle had no direct effect on MAP and HR when compared to aCSF (data not shown).

*Effects of SR 48968 on cardiovascular responses induced by [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>] NKA (4-10) and [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP*

Effects of the NK<sub>2</sub> antagonist SR 48968 and its inactive enantiomer SR 48965 on the cardiovascular changes to [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) and [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP are shown in Fig. 7 and Tables 1 and 2. The increases in MAP and HR induced by [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) at 25 pmol were completely abolished by 250 pmol SR 48968 and the responses to the agonist were entirely back to pre-antagonist values 24h later (Fig. 7b). In contrast, the same treatment with SR 48968 failed to significantly alter the cardiovascular effects produced by 25 pmol [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP (Table 1). Also, the inactive enantiomer, SR 48965 (250 pmol), failed to affect both the MAP and HR responses to [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (25 pmol) (Table 2). SR 48968 and SR 48965 or their vehicles had no direct effect on MAP and HR when compared to aCSF (data not shown).

*Effects of SB 235375 on cardiovascular responses induced by senktide and [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10)*

The effects of the tachykinin NK<sub>3</sub> antagonist SB 235375 and its vehicle on the cardiovascular responses evoked by senktide and [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) are shown in Figure 7 and Tables 1 and 2. The increases in MAP and HR induced by 25 pmol of senktide were abolished by 25 nmol SB 235375 (Fig. 7c). These cardiovascular effects of senktide were back to pre-antagonist values when the agonist was re-injected alone 24 h later. Although SB 235375 at 25 nmol was effective against senktide, it failed to affect the changes in MAP and HR induced by 25 pmol [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (Table 1). Also the vehicle of SB 235375 (aCSF) did not alter significantly the MAP and HR responses elicited by senktide injected either 15 min or 24 h later (25 pmol) (Table 2). SB 235375 had no direct effect on MAP and HR when compared to aCSF (data not shown).

*Effects of tachykinin antagonists on tachykinin agonists-induced behavioural activity*

The effects of LY 303870, SR 48968 and SB 235375 against the changes of behavioural activity induced by their respective agonist ([Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP, [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) and senktide) are shown in Figure 8. The sniffing behaviour induced by [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (10 pmol) was blocked by LY 303870 (5 nmol) and this behaviour was not completely restored 24 h later. The face washing and wet dog shake behaviours induced by the NK<sub>1</sub> agonist were no longer significant in rats pre-treated with LY 303870 (Fig. 8a). Head scratching was not significantly increased by 25 pmol [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) in this group of rats on day 1 (prior to antagonist) or in

the presence of NK<sub>2</sub> antagonist. SR 48968 (250 pmol) failed to alter wet dog shakes induced by the agonist (Fig. 8a). SB 235375 (25 nmol) inhibited completely and in a reversible manner (24h later) the majority of behavioural manifestations evoked by 25 pmol senktide (face washing, digging, rearing and wet dog shake) (Fig. 8b). None of the antagonists caused behavioural changes when administered alone (data not shown).

## Discussion

The mesocorticolimbic dopaminergic system originating in the VTA is traditionally known for its implication in the regulation of locomotor activity, stress responses, reinforcement and rewards mechanisms (Le Moal & Simon, 1991; Swanson 2000; Hyman & Malenka, 2001). However, recent evidence highlights a putative role for this system in cardiovascular control (van den Buuse 1997; 1998; Kirouac & Ciriello, 1997; Vaughan *et al.*, 1999). The present study provides the first pharmacological evidence that the three tachykinin receptors may exert a modulatory role in cardiovascular regulation in this midbrain area. Previous studies reported cardiovascular changes with fairly high doses (10 nmol) of DiMe-C7 in the VTA (Cornish & van den Buuse, 1994; 1995, van den Buuse, 1998). In contrast, the present data show cardiovascular responses with physiological doses (pmol range) of tachykinin NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptor agonists in freely behaving rats. Moreover, cardiovascular effects elicited by agonists were selectively and reversibly blocked by their respective receptor antagonist.

The hypothesis that tachykinins can affect the mesocorticolimbic system was based on the presence of endogenous tachykinins and NK<sub>3</sub> receptors in the VTA (Kalivas *et al.*, 1985; Deutch *et al.*, 1985; Warden & Young, 1988; Ding *et al.*, 1996; Shughrue *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Langlois *et al.*, 2001; Lessard *et al.*, 2003), and by microinfusion in the VTA of NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> agonists which increased the levels of dopamine and/or its metabolite, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), in the prefrontal cortex, nucleus accumbens and striatum (Deutch *et al.*, 1985; Elliott *et al.*, 1986a,b; Marco *et al.*, 1998). The VTA may indeed represent

a highly strategic site for tachykinins in cardiovascular regulation since the mesolimbic dopaminergic system is involved in diurnal blood pressure and heart rate regulation (Sei *et al.*, 1999; Sakata *et al.*, 2002). An up-regulation of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors in the nucleus accumbens, one major neuronal projection of the VTA, was reported in young prehypertensive spontaneously hypertensive rat (Kirouac & Ganguly, 1993; Vaughan *et al.*, 1999). Finally, electrophysiological evidence indicates that the activation of arterial baroreceptors alters the discharge rate of neurons in the VTA, likely through a relay in the NTS (Kirouac & Ciriello, 1997).

Comparison of the cardiovascular effects of the three tachykinin agonists reveals that the NK<sub>3</sub> agonist induced at low doses the most prominent effects on mean arterial pressure and heart rate, suggesting that the VTA is particularly sensitive to the NK<sub>3</sub> agonist. This is congruent with the fact that the NK<sub>3</sub> receptors are the most concentrated tachykinin receptors in this brain area (Nakanishi, 1991; Ding *et al.*, 1996). The cardiovascular responses to senktide reached a plateau at lower doses than the NK<sub>1</sub> agonist, [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP.

Thus far, there is no information regarding the presence or cellular localization of NK<sub>2</sub> receptors in the VTA. The expression of this receptor is relatively low in comparison to that of the two other tachykinin receptors in the CNS (Ribeiro-Da-Silva *et al.*, 2000; Saffroy *et al.*, 2001); this could account for the variable pressor and behavioural responses elicited by the NK<sub>2</sub> receptor agonist in this study. Nevertheless, the NK<sub>2</sub> antagonist abolished the cardiovascular effect induced by the NK<sub>2</sub> agonist in a selective and reversible manner. The amplitude of the tachycardia evoked by [β-Ala<sup>8</sup>] NKA (4-10) was blunted in many rats by the occurrence of a

significant bradycardia. This dual effect of the NK<sub>2</sub> agonist on heart rate (tachycardia or bradycardia or both) may suggest the activation of two neuronal pathways from the VTA.

Although the onset of the cardiovascular response to all agonists occurred within 1 min, the maximal effect peaked between 7 and 9 min post-injection. This slow developing response to the agonist is unlikely to be due to its diffusion outside the VTA on the basis of three arguments: first, control experiments with a large dose of DiMe-C7 (10 nmol) 2 mm above the VTA did not cause any cardiovascular/behavioural changes (Cornish & van den Buuse, 1995). In the latter study, the agonist was injected in a volume of 1 µl which is five times greater than the volume (0.2 µl) used in our study; second, the injection site for each rat was carefully confirmed by histological post-mortem examination; third, the injection of the same agonists at the same doses in the substantia nigra, a nucleus located in the vicinity of the VTA, induced only increases in heart rate and no changes in MAP and behaviour (Lessard & Couture, 2001).

Senktide induced several behaviours, but the most frequent ones were rearing and particularly the wet dog shake which is in agreement with previous studies on the intracerebroventricular injection of this agonist in rat (Picard *et al.*, 1994; Cellier *et al.*, 1997). Senktide-induced wet dog shake results from brain serotonergic mechanisms (Stoessl *et al.*, 1990) while the rearing caused by NK<sub>3</sub> receptor stimulation with DiMe-C7 in the VTA would be dependent upon dopaminergic activity since it was potentiated by peripheral administration of D-amphetamine and blocked by pre-treatment with haloperidol (Eison *et al.*, 1982). These two

mechanisms are supported by neuroanatomical and electrophysiological data showing that dopamine cells in the VTA receive important serotonergic innervation from the dorsal raphe nucleus (Oades and Halliday, 1987; Gervais & Rouillard, 2000).

The injection of [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP in the VTA induced face washing and sniffing whereas [β-Ala<sup>8</sup>] NKA (4-10) produced head scratching. In addition, both agonists induced wet dog shake, but at lower intensity than senktide. These data confirm earlier studies showing similar behavioural effects with increased locomotor activity following the injection of SP, NKA, DiMe-C7, GR 73632 (NK<sub>1</sub> agonist) and senktide in the rat VTA (Elliott & Iversen, 1986; Elliott *et al.*, 1991) or in the rat cerebral ventricles (Tschöpe *et al.*, 1992; Cellier *et al.*, 1997; 1999). According to several studies, the behavioural manifestations and locomotor activity induced by injection of SP or NK<sub>1</sub> agonist in the VTA are mediated by dopamine since they can be blocked by antagonist of DA receptors in the nucleus accumbens or by 6-hydroxydopamine lesions of the ascending dopaminergic A10 neurons (Kelley *et al.*, 1979; Elliott *et al.*, 1992).

The cardiovascular response and behavioural manifestations induced by NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> agonists occurred simultaneously and displayed a similar time course. Moreover, the effects induced on both parameters were significantly blocked or reduced in the presence of the respective antagonists. Thus, it appears that the autonomic control of cardiovascular function and the control of motor behaviour exerted by tachykinins on NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptors in the mesolimbic dopaminergic system operate through similar mechanisms. However, evidence suggests a dissimilar cellular localization of NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptors in the VTA. While one study

suggested the presence of NK<sub>1</sub> receptors on non-dopaminergic inhibitory neurons in the VTA (Lejeune *et al.*, 2002), NK<sub>3</sub> receptors were shown to be located on dopaminergic neurons (Chen *et al.*, 1998).

This study using tachykinin receptor antagonists failed to dissociate the cardiovascular and behavioural responses induced by agonists. Thus, further investigations will be required to determine the neuronal pathways involved in these central responses. It is still uncertain whether or not common neuronal pathways are implicated in both components of the defence reaction (cardiovascular and behaviour) induced by tachykinins in the mesocorticolimbic system. The mesolimbic dopaminergic pathway projects to the amygdala, a nucleus involved in the cardiovascular defence reaction to physiological stress (van den Buuse & Catanzariti, 2000). Likewise, the mesocortical dopaminergic pathway is involved in the cardiovascular component of the defence reaction (Al Maskati & Zbrozyna, 1989; Kawahara *et al.*, 2002). This is in keeping with the release of endogenous SP in the VTA following the application of a peripheral noxious stimulus (Bannon *et al.*, 1986) and with the involvement of endogenous SP and NK<sub>1</sub> receptors in the VTA on stress-induced analgesia in a tonic pain model (Altier & Stewart, 1999).

### **Conclusion**

The present *in vivo* pharmacological study identifies the VTA as a strategic target for tachykinins in central autonomic control of blood pressure and heart rate in normotensive rat. The modulation of the mesocorticolimbic dopaminergic system by the three tachykinin receptors, primarily by NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub>, may play an important role

in the integration of the behavioural and cardiovascular response to stress and in the adjustment of cardiovascular changes with psychomotor function.

### **Acknowledgements**

The authors acknowledge Drs Smriti. Iyengar from Eli Lilly (Indianapolis, IN, U.S.A.), Xavier. Emonds-Alt (Sanofi Recherche, Montpellier, France) and Henri. M. Sarau (GlaxoSmithKline, PA, USA) for the donation of LY 303870, SR 48968/SR 48965 and SB 235375, respectively. The authors are also grateful to Dr. Andrée Lessard who was involved in the initiation of this work, and to Mr Claude Gauthier for the artwork. K. Deschamps held a Studentship Award from the Research Group on The Autonomic Nervous System of the Université de Montréal. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MT-14379).

## References

ADVENIER, C., ROUISSI, N., NGUYEN, Q.T., EMONDS-ALT, X., BRELIERE, J.C., NELIAT, G., NALINE, E. & REGOLI, D. (1992). Neurokinin A (NK2) receptor revisited with SR 48968, a potent non-peptide antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 1418-24.

ALTIER, N. & STEWART, J. (1999). The tachykinin NK-1 receptor antagonist, RP-67580, infused into the ventral tegmental area prevents stress-induced analgesia in the formalin test. *Physiol. Behav.*, **66**, 717-21.

AL MASKATI, H.A. & ZBROZYNA, A.W. (1989). Stimulation in prefrontal cortex area inhibits cardiovascular motor components of the defence reaction in rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **28**, 117-125.

BANNON, M.J., DEUTCH, A.Y., TAM, S.Y., ZAMIR, N., ESKAY, R.L., LEE, J.M., MAGGIO, J.E. & ROTH, R.H. (1986). Mild footshock stress dissociates substance P from substance K and dynorphin from Met- and Leu-enkephalin. *Brain Res.*, **381**, 393-6.

CADOR, M., RIVET, J.M., KELLEY, A.E., LE MOAL, M. & STINUS, L. (1989). Substance P, neurotensin and enkephalin injections into the ventral

tegmental area: comparative study on dopamine turnover in several forebrain structures. *Brain Res.*, **486**, 357-63.

CELLIER, E., BARBOT, L., IYENGAR, S. & COUTURE, R. (1999). Characterization of central and peripheral effects of septide with the use of five tachykinin NK<sub>1</sub> receptor antagonists in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **127**, 717-728.

CELLIER, E., BARBOT, L., REGOLI, D. & COUTURE, R. (1997). Cardiovascular and behavioural effects of intracerebroventricularly administered tachykinin NK<sub>3</sub> receptor antagonists in the conscious rat.. *Br. J. Pharmacol.*, **122**,643-654.

CHEN, L.W., GUAN, Z.L. & DING, Y.Q. (1998). Mesencephalic dopaminergic neurons expressing neuromedin K receptor (NK<sub>3</sub>): a double immunocytochemical study in the rat.. *Brain Res.*, **780**,150-154.

CORNISH, J.L. & VAN DEN BUUSE, M. (1995). Stimulation of the rat mesolimbic dopaminergic system produces a pressor response which is mediated by dopamine D-1 and D-2 receptor activation and the release of vasopressin.. *Brain Res.*, **701**, 28-38.

CORNISH, J.L. & VAN DEN BUUSE, M. (1994). Pressor responses to electrical and chemical stimulation of the rat brain A10 dopaminergic system. *Neurosci. Lett.*, **176**, 142-6.

COUTURE, R., PICARD, P., POULAT, P. & PRAT, A. (1995). Characterization of the tachykinin receptors involved in spinal and supraspinal cardiovascular regulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**, 892-902.

CUELLO, A.C., EMSON, P.C., PAXINOS, G. & JESSELL, T. (1978). Substance P containing and cholinergic projections from the habenula. *Brain Res.*, **149**, 413-29.

CULMAN, J. & UNGER, T. (1995). Central tachykinins: mediators of defence reaction and stress reactions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**, 885-91.

DEUTCH, A.Y., MAGGIO, J.E., BANNON, M.J., KALIVAS, P.W., TAM, S.Y., GOLDSTEIN, M. & ROTH, R.H. (1985). Substance K and substance P differentially modulate mesolimbic and mesocortical systems. *Peptides*, **6 Suppl 2**, 113-22.

DING, Y.Q., SHIGEMOTO, R., TAKADA, M., OHISHI, H., NAKANISHI, S. & MIZUNO, N. (1996). Localization of the neuromedin K receptor (NK<sub>3</sub>) in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **364**, 290-310.

EISON, A.S., EISON, M.S. & IVERSEN, S.D. (1982). The behavioural effects of a novel substance P analogue following infusion into the ventral tegmental area or substantia nigra of rat brain. *Brain Res.*, **238**, 137-52.

ELLIOTT, P.J., MASON, G.S., GRAHAM, E.A., TURPIN, M.P. & HAGAN, R.M. (1992). Modulation of the rat mesolimbic dopamine pathway by neurokinins. *Behav. Brain Res.*, **51**, 77-82

ELLIOTT, P.J., MASON, G.S., STEPHENS-SMITH, M. & HAGAN, R.M. (1991). Behavioural and biochemical responses following activation of midbrain dopamine pathways by receptor selective neurokinin agonists. *Neuropeptides*, **19**, 119-26.

ELLIOTT, P.J. & IVERSEN, S.D. (1986). Behavioural effects of tachykinins and related peptides. *Brain Res.*, **381**, 68-76.

ELLIOTT, P.J., ALPERT, J.E., BANNON, M.J. & IVERSEN, S.D. (1986 a). Selective activation of mesolimbic and mesocortical dopamine metabolism in rat brain by infusion of a stable substance P analogue into the ventral tegmental area. *Brain Res*, **363**, 145-7.

ELLIOTT, P.J., NEMEROFF, C.B. & KILTS, C.D. (1986 b). Evidence for a tonic facilitatory influence of substance P on dopamine release in the nucleus accumbens. *Brain Res.*, **385**, 379-82.

EMONDS-ALT, X., VILAIN, P., GOULAOUIC, P., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., ADVENIER, C., NALINE, E., NELIAT, G., LE FUR, G. & BRELIERE, J.C. (1992). A

potent and selective non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK<sub>2</sub>) receptor. *Life Sci.*, **50**, PL101-6.

GERVAIS, J. & ROUILLARD, C. (2000). Dorsal raphe stimulation differentially modulates dopaminergic neurons in the ventral tegmental area and substantia nigra. *Synapse*, **35**, 281-91.

HAY, D.W., GIARDINA, G.A., GRISWOLD, D.E., UNDERWOOD, D.C., KOTZER, C.J., BUSH, B., POTTS, W., SANDHU, P., LUNDBERG, D., FOLEY, J.J., SCHMIDT, D.B., MARTIN, L.D., KILIAN, D., LEGOS, J.J., BARONE, F.C., LUTTMANN, M.A., GRUGNI, M., RAVEGLIA, L.F. & SARAU, H.M. (2002). Nonpeptide tachykinin receptor antagonists. III. SB 235375, a low central nervous system-penetrant, potent and selective neurokinin-3 receptor antagonist, inhibits citric acid-induced cough and airways hyper-reactivity in guinea pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**, 314-23.

HYMAN, S.E. & MALENKA, R.C. (2001). Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 695-703.

ITOI, K., JOST, N., CULMAN, J., TSCHÖPE, C. & UNGER, T. (1994). Further localization of cardiovascular and behavioral actions of substance P in the rat brain. *Brain Res.*, **668**, 100-106.

ITOI, K., TSCHÖPE, C., JOST, N., CULMAN, J., LEBRUN, C., STAUSS, B. & UNGER, T. (1992). Identification of the central tachykinin receptor subclass involved in substance P-induced cardiovascular and behavioral responses in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.* **219**, 435-44.

ITOI, K., JOST, N., BADOER, E., TSCHÖPE, C., CULMAN, J. & UNGER, T. (1991). Localization of the substance P-induced cardiovascular responses in the rat hypothalamus. *Brain Res.*, **558**, 123-6.

IYENGAR, S., HIPSKIND, P.A., GEHLERT, D.R., SCHOBBER, D., LOBB, K.L., NIXON, J.A., HELTON, D.R., KALLMAN, M.J., BOUCHER, S., COUTURE, R., LI, D.L. & SIMMONS, R.M. (1997). LY303870, a centrally active neurokinin-1 antagonist with a long duration of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 774-85.

KALIVAS, P.W., DEUTCH, A.Y., MAGGIO, J.E., MANTYH, P.W. & ROTH, R.H. (1985). Substance K and substance P in the ventral tegmental area. *Neurosci. Lett.*, **57**, 241-6.

KAWAHARA, Y., KAWAHARA, H. & WESTERINK, B.H. (2002). Hypotension-induced dopamine release in prefrontal cortex is mediated by local glutamatergic projections at the level of nerve terminals. *J. Neurochem.*, **81**, 285-91.

KELLEY, A.E., STINUS, L. & IVERSEN, S.D. (1979). Behavioural activation induced in the rat by substance P infusion into ventral tegmental area: implication of dopaminergic A10 neurones. *Neurosci. Lett.*, **11**, 335-9.

KIROUAC, G.J. & CIRIELLO, J. (1997). Cardiovascular afferent inputs to ventral tegmental area. *Am. J. Physiol.*, **272**, R1998-2003.

KIROUAC, G.J. & GANGULY, P.K. (1993). Up-regulation of dopamine receptors in the brain of the spontaneously hypertensive rat: an autoradiographic analysis. *Neuroscience*, **52**, 135-41.

LANGLOIS, X., WINTMOLDERS, C., TE RIELE, P., LEYSEN, J.E. & JURZAK, M. (2001). Detailed distribution of Neurokinin-3 receptors in the rat, guinea pig and gerbil brain: a comparative autoradiographic study. *Neuropharmacology*, **40**, 242-53.

LEJEUNE, F., GOBERT, A. & MILLAN, M.J. (2002). The selective neurokinin (NK-1) antagonist, GR205,171, stereospecifically enhances mesocortical dopaminergic transmission in the rat: a combined dialysis and electrophysiological study. *Brain Res.*, **935**, 134-9.

LE MOAL, M. & SIMON, H. (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol. Rev.*, **71**, 155-234.

LESSARD, A., CAMPOS, M.M., NEUGEBAUER, W. & COUTURE, R. (2003). Implication of nigral tachykinin NK3 receptors in the maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats: a pharmacologic and autoradiographic study. *Br. J. Pharmacol.*, **138**, 554-63.

LESSARD, A. & COUTURE, R. (2001). Modulation of cardiac activity by tachykinins in the rat substantia nigra. *Br. J. Pharmacol.*, **134**, 1749-59.

LU, X.Y., GHASEMZADEH, M.B. & KALIVAS, P.W. (1998). Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in the neurons projecting from the nucleus accumbens. *Neuroscience*, **82**, 767-80.

MARCO, N., THIRION, A., MONS, G., BOUGAULT, I., LE FUR, G., SOUBRIE, P. & STEINBERG, R. (1998). Activation of dopaminergic and cholinergic neurotransmission by tachykinin NK<sub>3</sub> receptor stimulation: an in vivo microdialysis approach in guinea pig. *Neuropeptides*, **32**, 481-8.

NAKANISHI, S. (1991). Mammalian tachykinin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, **14**, 123-36.

OADES, R.D. & HALLIDAY, G.M. (1987). Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res.*, **434**, 117-65.

OVERTON, P., ELLIOTT, P.J., HAGAN, R.M. & CLARK, D. (1992). Neurokinin agonists differentially affect A9 and A10 dopamine cells in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **213**, 165-6.

PAXINOS, G., WATSON, C., THE RAT BRAIN IN STEREOTAXIC COORDINATES & NEW YORK: ACADEMIC PRESS, S.B., 1998.

PICARD, P., REGOLI, D. & COUTURE, R. (1994). Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered tachykinins in the rat: characterization of receptors with selective antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 240-249.

REGOLI, D., DRAPEAU, G., DION, S. & COUTURE, R. (1988). New selective agonists for neurokinin receptors: pharmacological tools for receptor characterization. *Trends Pharmacol. Sci.*, **9**, 290-5.

RIBEIRO-DA-SILVA, A., MCLEOD, A.L. & KRAUSE, J.E. (2000). Neurokinin receptors in the CNS. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Vol. 16, Part I. Peptide Receptors. Eds. Quirion, R., Björklund, A., Hökfelt, T. pp 195-240. Amsterdam: Elsevier Science B.V.

ROVERO, P., PESTELLINI, V., PATACCHINI, R., GIULIANI, S., SANTICIOLI, P., MAGGI, C.A., MELI, A. & GIACHETTI, A. (1989). A potent and selective agonist for NK-2 tachykinin receptor. *Peptides*, **10**, 593-5.

SAFFROY, M., TORRENS, Y., GLOWINSKI, J. & BEAUJOUAN, J.C. (2001). Presence of NK<sub>2</sub> binding sites in the rat brain. *J. Neurochem.*, **79**, 985-96.

SAKATA, M., SEI, H., TOIDA, K., FUJIHARA, H., URUSHIHARA, R. & MORITA, Y. (2002). Mesolimbic dopaminergic system is involved in diurnal blood pressure regulation. *Brain Res.*, **928**, 194-201.

SEI, H., IKEMOTO, K., ARAI, R. & MORITA, Y. (1999). Injection of 6-hydroxydopamine into the ventral tegmental area suppresses the increase in arterial pressure during REM sleep in the rat. *Sleep Res. Online*, **2**, 1-6.

SHUGHRUE, P.J., LANE, M.V. & MERCHENTHALER, I. (1996). In situ hybridization analysis of the distribution of neurokinin-3 mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, **372**, 395-414.

STOESSL, A.J., DOURISH, C.T. & IVERSEN, S.D. (1990). Pharmacological characterization of the behavioural syndrome induced by the NK-3 tachykinin agonist senktide in rodents: evidence for mediation by endogenous 5-HT. *Brain Res.*, **517**, 111-6.

SWANSON, L.W. (2000). Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior(1). *Brain Res.*, **886**, 113-164.

SWANSON, L.W. (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull.*, **9**, 321-53.

TAKANO, Y., NAGASHIMA, A., HAGIO, T., TATEISHI, K. & KAMIYA, H. (1990). Role of central tachykinin peptides in cardiovascular regulation in rats. *Brain Res.*, **528**, 231-7.

TAMIYA, R., HANADA, M., KAWAI, Y., INAGAKI, S. & TAKAGI, H. (1990). Substance P afferents have synaptic contacts with dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the rat. *Neurosci. Lett.*, **110**, 11-5.

TSCHÖPE, C., PICARD, P., CULMANN, J., PRAT, A., ITOI, K., REGOLI, D., UNGER, T. & COUTURE, R. (1992). Use of selective antagonists to dissociate the central cardiovascular and behavioural effects of tachykinins on NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **107**, 750-5.

UNGER, T., CAROLUS, S., DEMMERT, G., GANTEN, D., LANG, R.E., MASER-GLUTH, C., STEINBERG, H. & VEELKEN, R. (1988). Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ. Res.*, **63**, 812-20.

VAN DEN BUUSE, M. & CATANZARITI, R. (2000). Stimulation of the ventral tegmental area enhances the effect of vasopressin on blood pressure in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.*, **129**, 29-36.

VAN DEN BUUSE, M. (1998). Role of the mesolimbic dopamine system in cardiovascular homeostasis. Stimulation of the ventral tegmental area modulates the effect of vasopressin on blood pressure in conscious rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **25**, 661-8.

VAN DEN BUUSE, M. (1997). Pressor responses to brain dopaminergic stimulation. *Clin Exp. Pharmacol. Physiol.*, **24**, 764-9.

VAUGHAN, C.E., VAN DEN BUUSE, M. & ROLAND, B.L. (1999). Brain dopamine D2 receptor mRNA levels are elevated in young spontaneously hypertensive rats. *Neurosci. Res.*, **34**, 199-205.

WARDEN, M.K. & YOUNG, W.S., 3RD (1988). Distribution of cells containing mRNAs encoding substance P and neurokinin B in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, **272**, 90-113.

WORMSER, U., LAUFER, R., HART, Y., CHOREV, M., GILON, C. & SELINGER, Z. (1986). Highly selective agonists for substance P receptor subtypes. *Embo J.*, **5**, 2805-8.

**Table 1** Selectivity of the inhibitions by the tachykinin antagonists

<i>Treatment</i>	$\Delta MAP$ (mmHg)	$\Delta HR$ (b.p.m.)	n
<b>A. LY 303870 (5 nmol)</b>			
Vehicle	6.1 ± 1.3	22 ± 4	6
Senktide, 10 pmol (before)	15.6 ± 1.7 **	107 ± 8 **	6
Senktide, 10 pmol (30 min after)	15.6 ± 1.7 **	125 ± 17 **	6
<b>B. SR 48968 (250 pmol)</b>			
Vehicle	4.7 ± 1.0	15 ± 3	6
[Sar <sup>9</sup> , Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ] SP, 25 pmol (before)	9.4 ± 1.6	82 ± 14 **	6
[Sar <sup>9</sup> , Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ] SP, 25 pmol (15 min after)	12.0 ± 2.0 *	117 ± 16 **	6
<b>C. SB 235375 (25 nmol)</b>			
Vehicle	3.5 ± 0.6	20 ± 3	8
[β-Ala <sup>8</sup> ] NKA (4-10), 25 pmol (before)	10.4 ± 1.4 **	66 ± 10 **	8
[β-Ala <sup>8</sup> ] NKA (4-10), 25 pmol (15 min after)	10.0 ± 1.7 **	78 ± 15 **	8

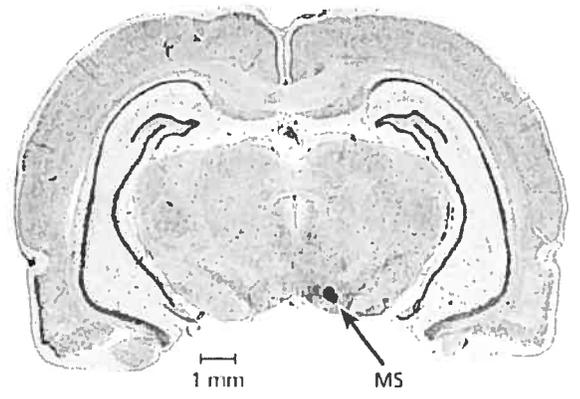
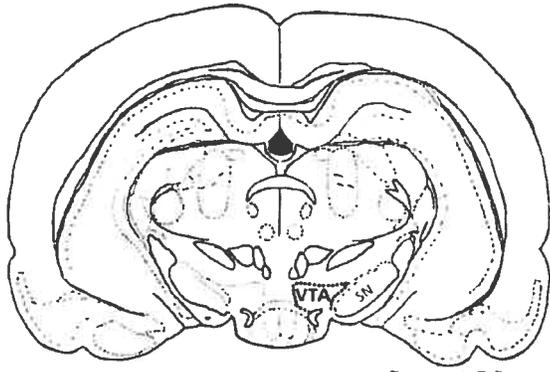
Data are means ± (n) rats. Statistical comparison to vehicle values is indicated by \* P < 0.05, \*\* P < 0.01. Statistical comparison to the agonist before treatment with antagonist is not significantly different in (A), (B) and (C).

**Table 2** Influence of antagonist vehicles or enantiomer on the cardiovascular responses to agonists

<i>Treatment</i>	$\Delta MAP$ (mmHg)	$\Delta HR$ (b.p.m.)	n
<b>A. LY 303870-vehicle</b>			
Vehicle	3.3 ± 0.9	17 ± 3	6
[Sar <sup>9</sup> , Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ] SP, 10 pmol (before)	12.2 ± 0.6 *	70 ± 6 *	6
[Sar <sup>9</sup> , Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ] SP, 10 pmol (30 min after)	14.2 ± 2.9 **	82 ± 19 **	6
[Sar <sup>9</sup> , Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ] SP, 10 pmol (24 h after)	13.1 ± 2.3 **	77 ± 15 **	6
<b>B. SR 48965</b>			
Vehicle	5.4 ± 1.1	20 ± 7	8
[β-Ala <sup>8</sup> ] NKA (4-10), 25 pmol (before)	9.8 ± 2.7	76 ± 18 *	8
[β-Ala <sup>8</sup> ] NKA (4-10), 25 pmol (15 min after)	8.1 ± 1.8	75 ± 15 *	8
[β-Ala <sup>8</sup> ] NKA (4-10), 25 pmol (24 h after)	13.6 ± 2.3 *	76 ± 19 *	7
<b>C. SB 235375 – vehicle</b>			
Vehicle	4.3 ± 0.9	16 ± 4	5
Senktide, 25 pmol (before)	12.3 ± 2.4	86 ± 17 *	5
Senktide, 25 pmol (15 min after)	14 ± 4.3	92 ± 17 *	5
Senktide, 25 pmol (24 h after)	18 ± 1.9 **	140 ± 28 **	5

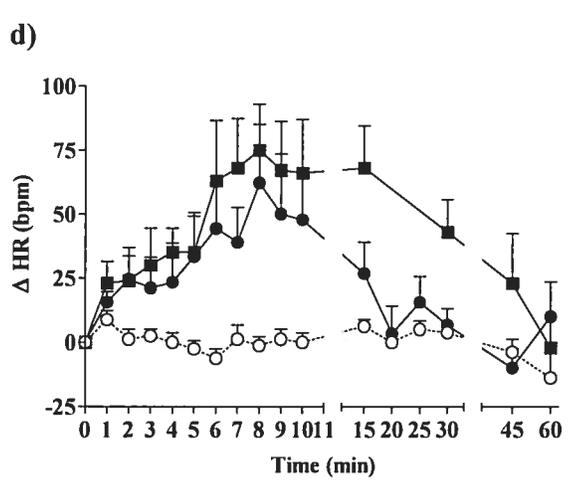
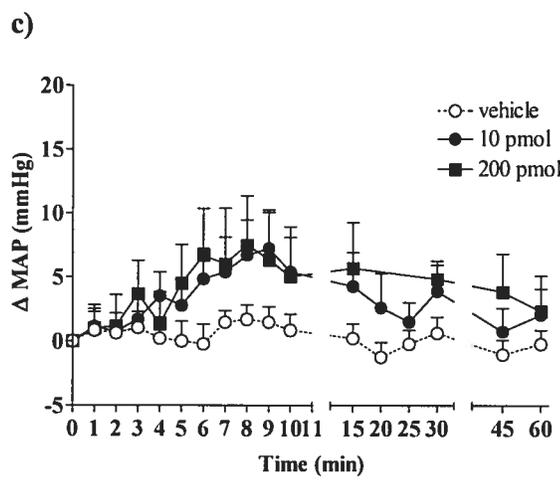
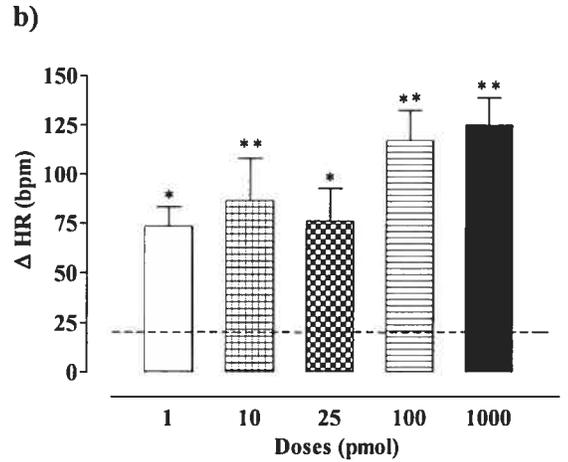
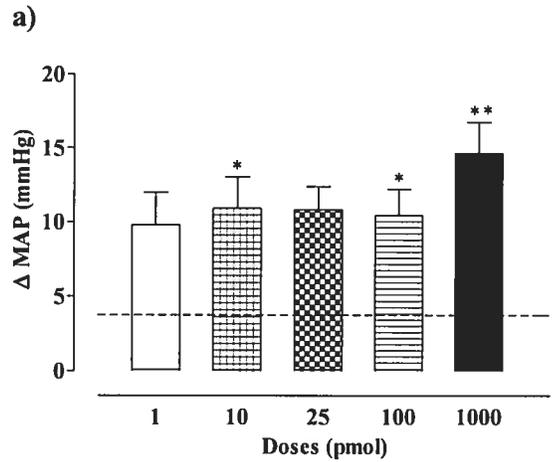
Data are means  $\pm$  (n) rats. Statistical comparison to vehicle values is indicated by \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Statistical comparison to the agonist before treatment with the antagonist-vehicle (A,C) or with the enantiomer SR48965 (B) is not significantly different.

**Figure 1** Identification of a microinjection site (MS) in the VTA (dark point) following post-mortem histological examination of microinjected Evan's blue (histological section on right side). A rat was considered to be correctly injected when the Evan's blue was in the VTA and when the cannula trace was just above the VTA without any haemorrhage or extended necrosis. Diagram on left side was modified from the atlas of Paxinos & Watson (1998). Abbreviations: MS, microinjection site; VTA, ventral tegmental area; SN, substantia nigra. Scale: 1 mm.

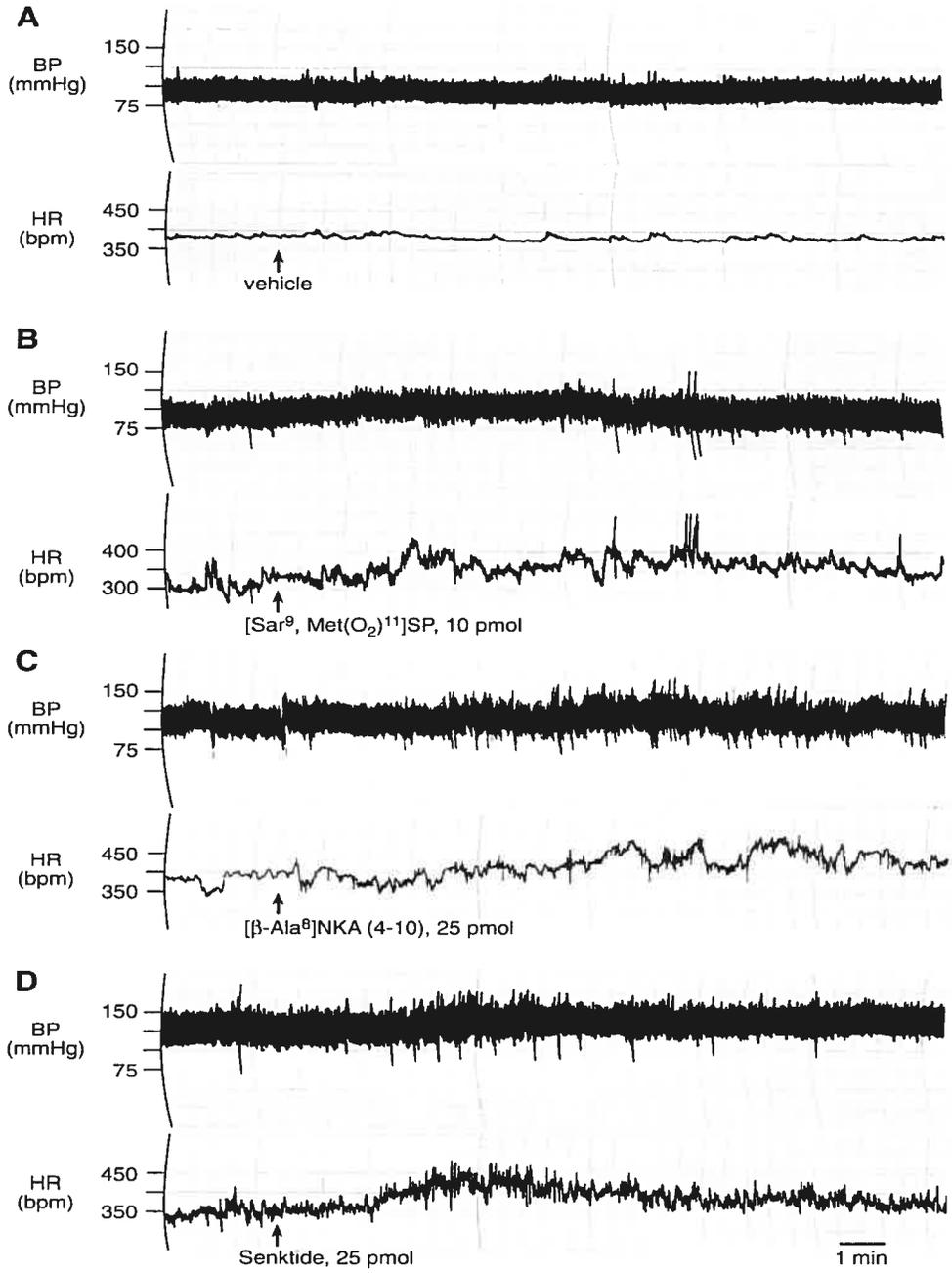


**Figure 2** Maximal changes (a, b) and time-course effects (c, d) on mean arterial pressure ( $\Delta$  MAP, a and c) and heart rate ( $\Delta$  HR, b and d) following five increasing doses (1 to 1000 pmol, n = 18) of [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP in the VTA. Values represent the mean  $\pm$  s.e. mean of (n) rats. Comparison to vehicle values (dotted line) is indicated by \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 (a, b). Statistical comparison in (c) are: 10 pmol (F (1,16) = 20.50, P < 0.001), 200 pmol (F (1, 19) = 37.11, P < 0.001) and in (d) are: 10 pmol (F (1,16) = 41.78, P < 0.001), 200 pmol (F (1,19) = 108.9, P < 0.001). Basal values were: MAP: 103.8  $\pm$  4.1 mmHg; HR: 375  $\pm$  18 bpm.

[Sar<sup>9</sup>,Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP

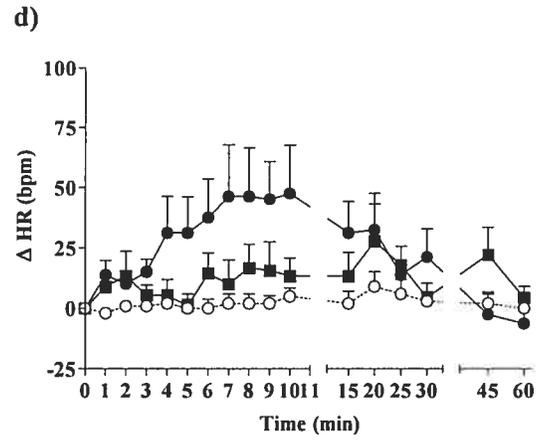
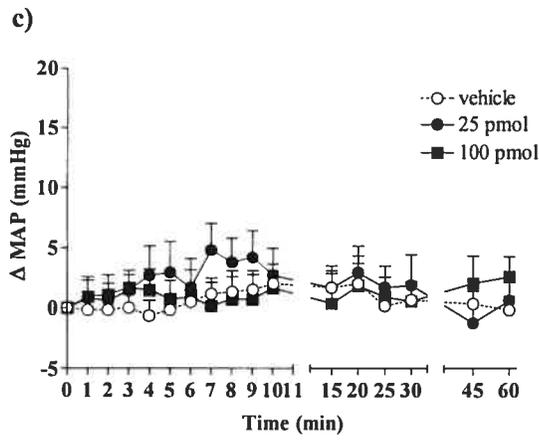
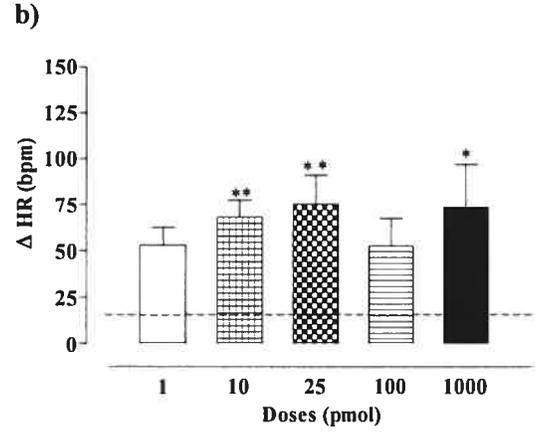
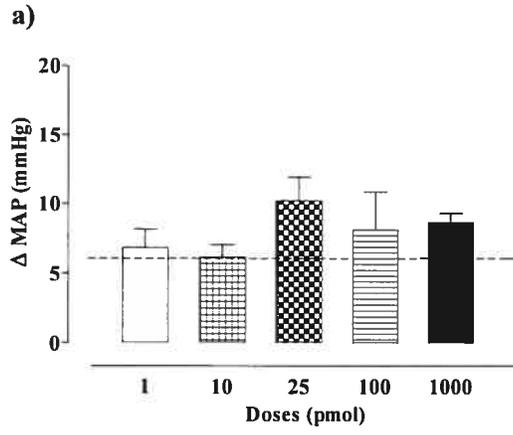


**Figure 3** Original traces showing blood pressure (BP) and heart rate (HR) changes induced by VTA microinjection of (A) vehicle (aCSF), (B) [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP (10 pmol), (C) [β-Ala<sup>8</sup>] NKA (4-10) (25 pmol) and (D) senktide (25 pmol) in freely moving rats.



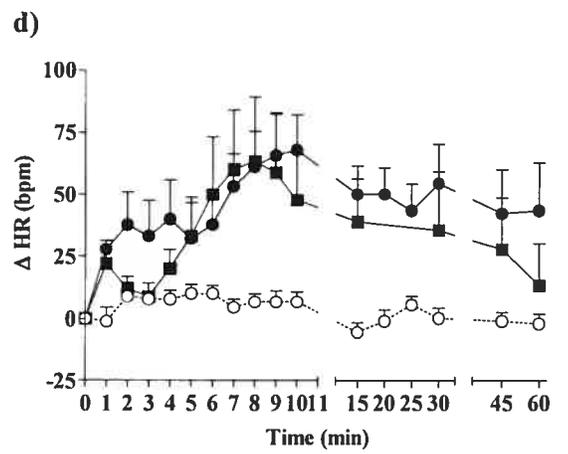
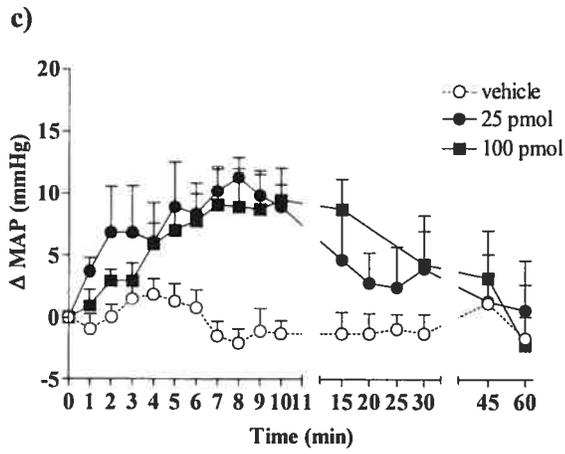
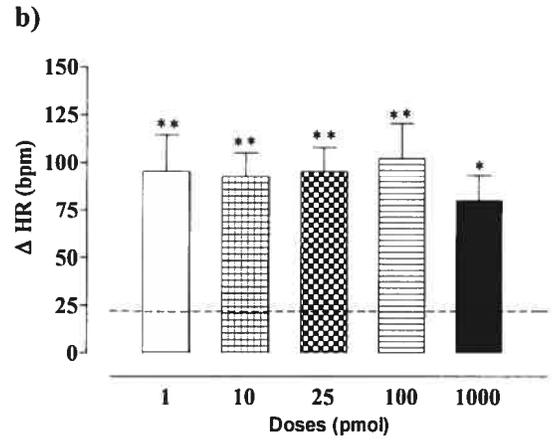
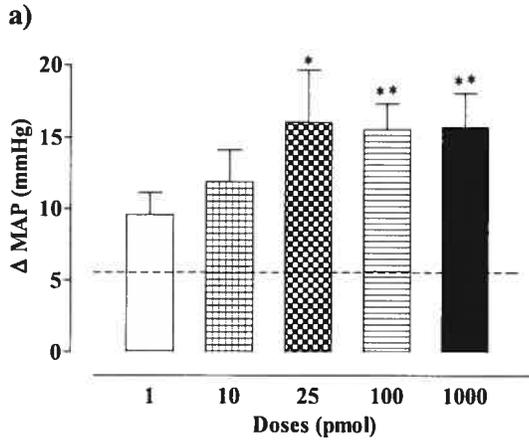
**Figure 4** Maximal changes (a, b) and time-course effects (c, d) on mean arterial pressure ( $\Delta$  MAP, a and c) and heart rate ( $\Delta$  HR, b and d) following five increasing doses (1 to 1000 pmol, n = 16) of [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>] NKA (4-10) in the VTA. Values represent the mean  $\pm$  s.e. mean of (n) rats. Comparison to vehicle values (dotted line) is indicated by \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 (a, b). Statistical comparison in (c) are: 25 pmol (F (1,17) = 6.08, P < 0.014), 100 pmol (F (1,17) = 1.19, P > 0.05) and in (d) are: 25 pmol (F (1,17) = 52.81, P < 0.001), 100 pmol (F (1,17) = 22.60, P < 0.001). Basal values were: MAP: 105.2  $\pm$  2.5 mmHg; HR: 372  $\pm$  10 bpm.

[ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>] NKA (4-10)

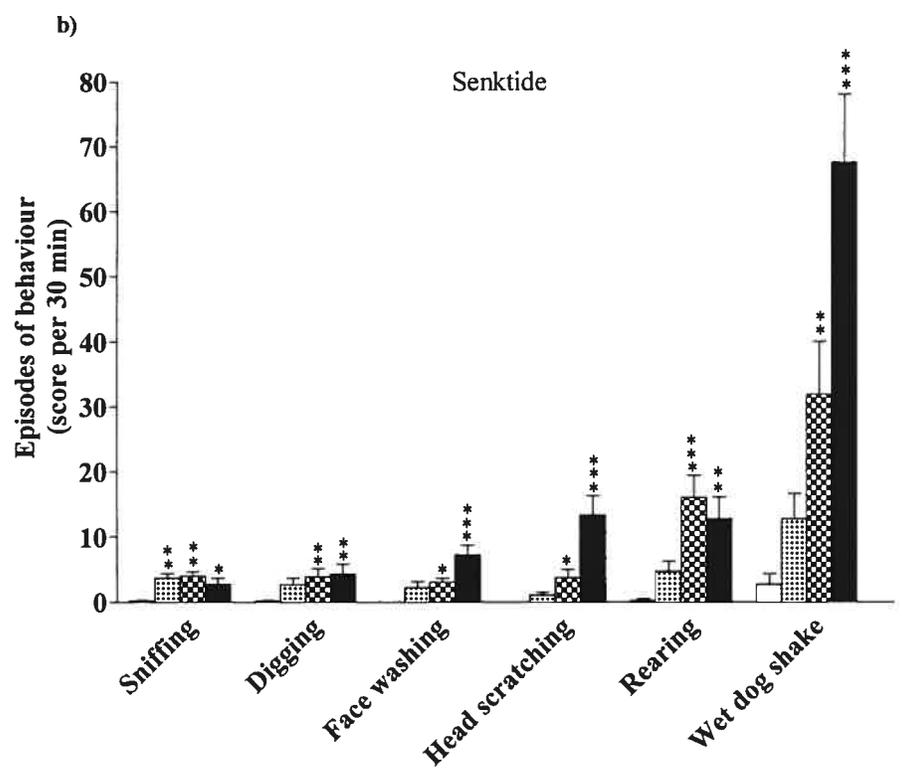
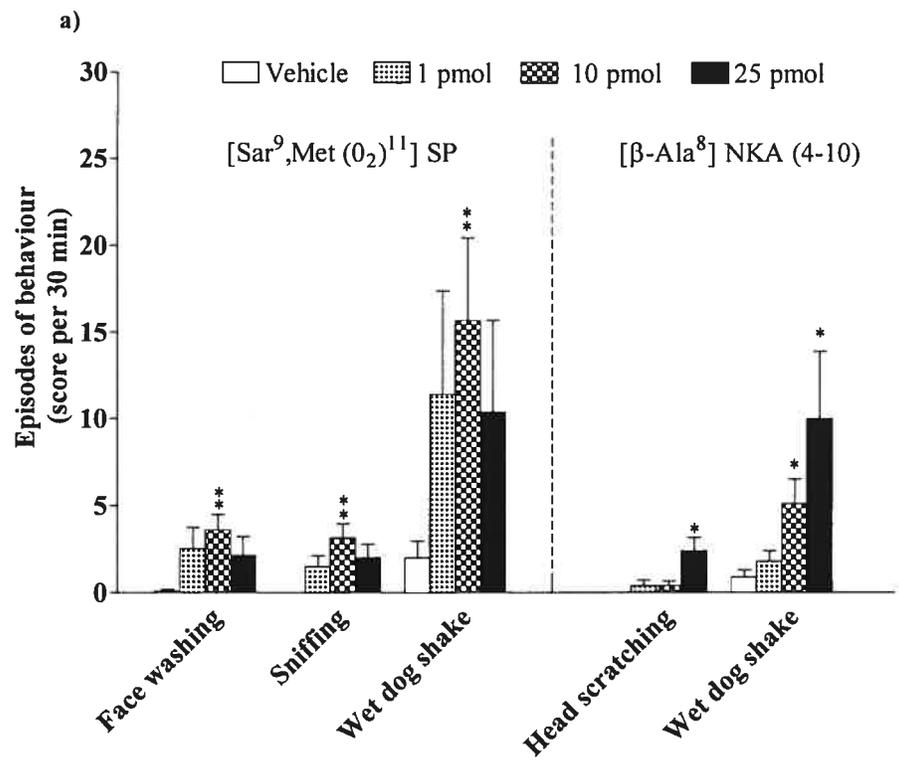


**Figure 5** Maximal changes (a, b) and time-course effects (c, d) on mean arterial pressure ( $\Delta$  MAP, a and c) and heart rate ( $\Delta$  HR, b and d) following five increasing doses (1 to 1000 pmol, n = 17) of senktide in the VTA. Values represent the mean  $\pm$  s.e. mean of (n) rats. Comparison to vehicle values (dotted line) is indicated by \* P < 0,05, \*\* P < 0,01 (a, b). Statistical comparison in (c) are: 25 pmol (F (1,15) = 50.77, P < 0.001), 100 pmol (F (1,17) = 41.42, P < 0.001) and in (d) are: 25 pmol (F (1,15) = 102.8, P < 0.001), 100 pmol (F (1,17) = 51.28, P < 0.001). Basal values were: MAP:  $102.9 \pm 6.2$  mmHg; HR:  $354 \pm 18$  bpm.

Senktide



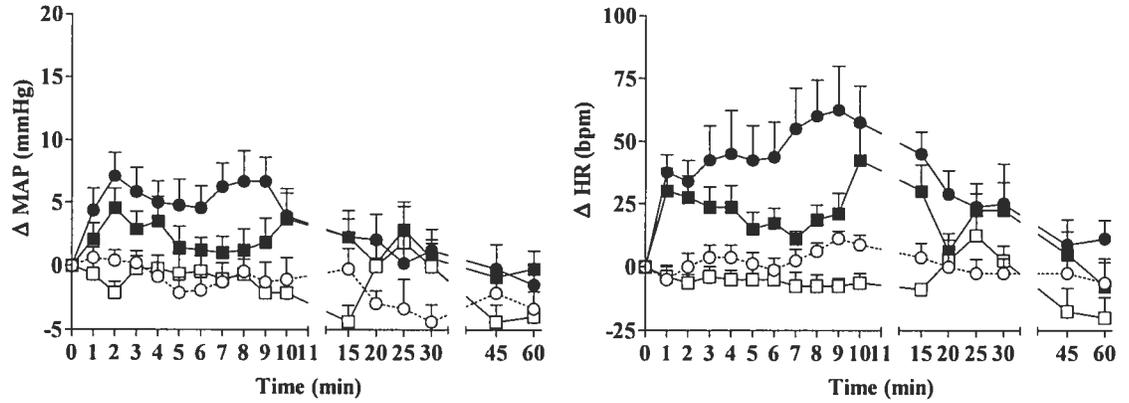
**Figure 6** Bar graphs showing changes in behavioural activity induced by VTA microinjection of [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP (a, left), [β-Ala<sup>8</sup>] NKA (4-10) (a, right) and senktide (b) at 1, 10 and 25 pmol during the first 30 min post-injection period in conscious rats (same rats than Figs. 2, 4 and 5). Each bar represents the mean ± s.e. mean (n values are given in the previous legends). Comparison to vehicle values is indicated by \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001.



**Figure 7** Time course effects on changes in mean arterial pressure ( $\Delta$  MAP, left) and heart rate ( $\Delta$  HR, right) responses induced by (a) [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP (10 pmol, n = 8), (b) [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>] NKA (4-10) (25 pmol, n = 14), (c) senktide (25 pmol, n = 6) injected in the VTA before or after their respective antagonist. Values represent the mean  $\pm$  s.e. mean of (n) rats. Statistical comparison to the agonist before treatment with antagonist are: (a) MAP (F (1,15) = 67.33, P < 0.001), HR (F (1,15) = 154, P < 0.001); (b) MAP (F (1,27) = 39.12, P < 0.001), HR (F (1,27) = 101, P < 0.001); (c) MAP (F (1,11) = 99.54, P < 0.001); HR (F (1,11) = 87.58, P < 0.001). Basal values were: (a) MAP: 98.5  $\pm$  5.8 mmHg; HR: 381  $\pm$  17 bpm, (b) MAP: 100.8  $\pm$  2.8 mmHg; HR: 372  $\pm$  16 bpm, (c) MAP: 97.5  $\pm$  7.4 mmHg; HR: 403  $\pm$  21 bpm.

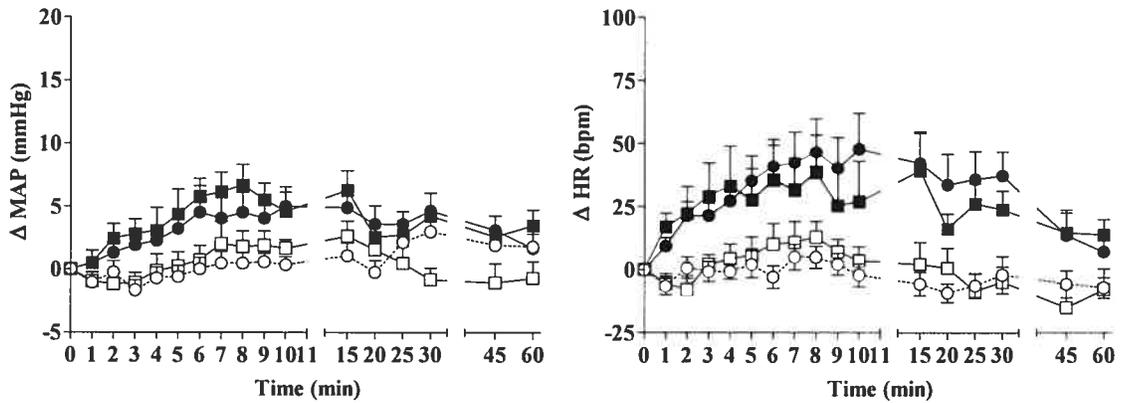
a)

○-○- Vehicle, 10 pmol [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP before (●-●-), 30 min (□-□-) or 24 h (■-■-) after LY 303870 (5 nmol)



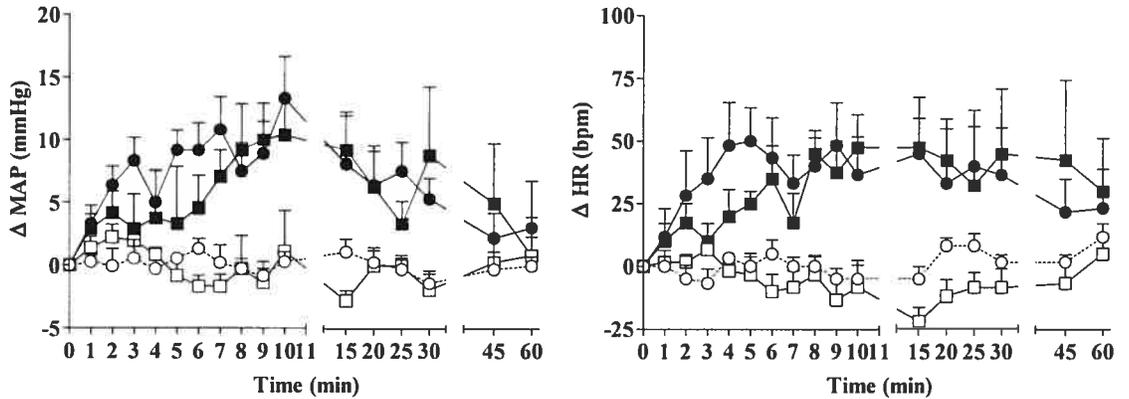
b)

○-○- Vehicle, 25 pmol [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) before (●-●-), 15 min (□-□-) or 24 h (■-■-) after SR 48968 (250 pmol)

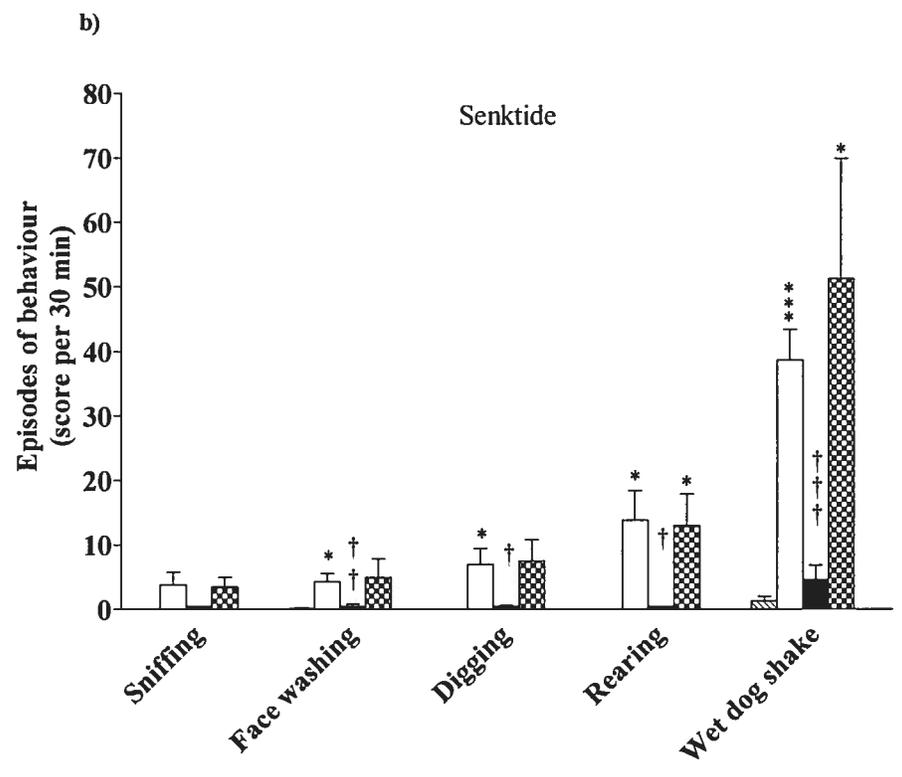
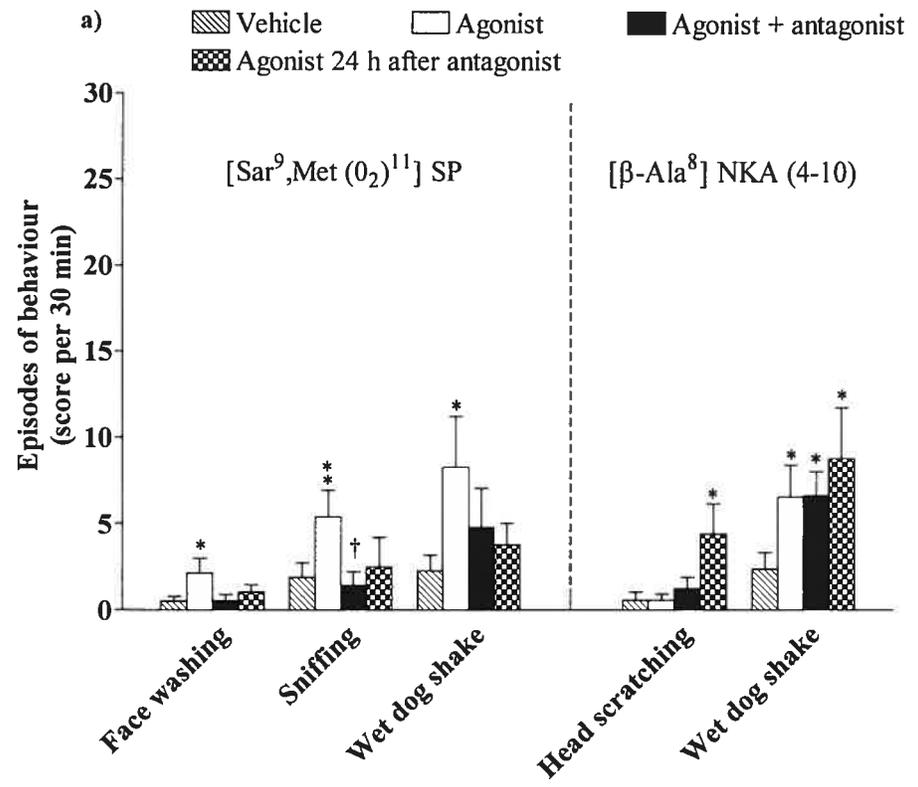


c)

○-○- Vehicle, 25 pmol senktide before (●-●-), 15 min (□-□-) or 24 h (■-■-) after SB 235375 (25 nmol)



**Figure 8** Bar graphs showing changes in behavioural activity induced by (a) [Sar<sup>9</sup>, Met (O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP (10 pmol) and [β-Ala<sup>8</sup>] NKA (4-10) (25 pmol) following the injection of their respective antagonist: LY 303870 (5 nmol) and SR 48968 (250 pmol) (b) senktide (25 pmol) following the injection of SB 235375 (25 nmol) during the first 30 min post-injection period in conscious rats (same rats than Fig. 7). Each bar represents the mean ± s.e. mean (n values are given in Fig. 7). Comparison to vehicle values is indicated by \* P < 0,05, \*\*\* P < 0,001 and to the agonist before treatment with antagonist by † P < 0,05, ††† P < 0,001.



## TROISIÈME CHAPITRE

### DISCUSSION GÉNÉRALE

## 1.0 Pertinence du modèle utilisé

Dans cette étude pharmacologique *in vivo*, le rat a été utilisé comme modèle animal pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le rat est l'animal de référence pour la majorité des études portant sur les effets cardiovasculaires et comportementaux des tachykinines dans le système nerveux central. La disponibilité de plusieurs modèles établis de pathologies cardiovasculaires chez le rat tel que le modèle du rat spontanément hypertendu (SHR) est un atout pour la suite de ce projet. De plus, il est important de souligner que l'ATV du rat et de l'homme a une distribution neuronale similaire contrairement à celui d'autres modèles animaux, incluant le primate (Halliday et Tork, 1986).

Afin que les résultats obtenus aient une pertinence physiologique, les expériences ont été faites chez le rat éveillé et non restreint. Il est connu que l'anesthésie générale diminue les réflexes cardiovasculaires proportionnellement à la profondeur de l'anesthésie (Martner et Biber, 1982). Chez le rat, l'anesthésie atténue le réflexe des barorécepteurs suite à l'administration d'agonistes comme l'angiotensine II, le neuropeptide Y et la vasopressine. De plus, chez le rat anesthésié, la réponse pressive à ces agonistes de même qu'à la norépinéphrine est altérée (Hauser et al., 1995). Donc afin d'éviter les effets confondants de l'anesthésie sur les paramètres cardiovasculaires, les expériences ont été réalisées chez le rat non-anesthésié. Cette approche permet aussi de mesurer les changements d'activité comportementale à l'injection centrale des agonistes des tachykinines.

Le stress est un facteur qui peut affecter les paramètres cardiovasculaires et la transmission dopaminergique au niveau des efférences

de l'ATV. En effet, on a rapporté chez le rat conscient que des stress environnementaux peuvent affecter la pression artérielle, la fréquence cardiaque et agir comme stimuli afférents dans l'ATV (Nakamura et Hayashida, 1990; Kalivas et Stewart, 1991). L'immobilisation est une contrainte physique qui augmente le niveau de stress chez le rat et qui modifie la concentration de SP et de ses récepteurs dans le système nerveux central (Takayama et al., 1986). Cette étude réalisée chez le rat non immobilisé permet donc en premier lieu d'évaluer la réponse comportementale induite par l'injection des tachykinines dans l'ATV, mais aussi d'éviter les effets confondants du stress sur les résultats obtenus.

## **2.0 Effets cardiovasculaires et comportementaux induits par l'agoniste NK<sub>1</sub>, [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP dans l'ATV**

L'injection de [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP dans l'ATV induit des augmentations de la pression artérielle moyenne et de la fréquence cardiaque accompagnées de comportements de toilettage de la tête, de reniflement et de secousses corporelles. Ces effets cardiovasculaires et comportementaux sans être de même amplitude, sont néanmoins semblables à ceux observés suite à l'injection i.c.v. de [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (Cellier et al., 1999). L'ATV pourrait donc être une des régions du système nerveux central impliquées dans les effets presseurs et la tachycardie observés suite à l'injection i.c.v. de [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP.

Les effets cardiovasculaires et comportementaux induits par [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP sont bloqués de façon sélective et réversible par l'antagoniste NK<sub>1</sub>, le LY 303870. Ceci appuie donc les données suggérant la présence des récepteurs NK<sub>1</sub> dans l'ATV (Elliott et al., 1992; Overton et al., 1992; Altier et

Stewart, 1999). Toutefois, il y a très peu d'information quant à la localisation cellulaire de ces récepteurs. Récemment il a été rapporté que les récepteurs NK<sub>1</sub> sont localisés sur des neurones inhibiteurs dans l'ATV. En effet, l'administration systémique du GR 205,171, un antagoniste NK<sub>1</sub>, augmente d'une part, l'activité électrique des neurones dopaminergiques dans le noyau para-branchial de l'ATV, et d'autre part, les taux extracellulaires de dopamine dans le cortex préfrontal (Lejeune et al., 2002). Ces effets sont absents dans le striatum, le noyau accumbens et le noyau para-nigral de l'ATV. On a rapporté la présence d'interneurones GABAergiques faisant synapse sur les neurones dopaminergiques dans l'ATV (Johnson et North, 1992). Ainsi, les récepteurs NK<sub>1</sub> seraient situés sur des neurones inhibiteurs (possiblement des interneurones GABAergiques) dans la partie para-branchiale de l'ATV. Cette région correspond aux neurones qui projettent majoritairement au cortex préfrontal (CPF), tandis que la région para-nigrale correspond davantage aux neurones qui projettent au noyau accumbens et aux autres régions limbiques (Svensson et al., 1995). Certaines études neuroanatomiques suggèrent cependant qu'il y a aussi des récepteurs NK<sub>1</sub> sur les neurones dopaminergiques. Entre autres, la présence de terminaisons SPergiques faisant synapse directement sur les neurones dopaminergiques dans l'ATV a été rapportée (Tamiya et al., 1990). On pourrait donc émettre l'hypothèse suivante : les récepteurs NK<sub>1</sub> dans la région para-branchiale sont situés sur les interneurones GABAergiques alors que ceux dans la région para-nigrale sont majoritairement situés sur les neurones dopaminergiques (Figure 7, p. 120).

Un rôle cardiovasculaire pour le cortex préfrontal médial a été rapporté. Une stimulation électrique ou chimique (au glutamate) du cortex préfrontal médial induit une diminution de la pression artérielle moyenne.

Cet effet dépresseur serait tributaire d'une activation du baroréflexe via une stimulation de la voie neuronale originant du cortex préfrontal et se dirigeant vers le noyau du faisceau solitaire (Owens et al., 1999). La stimulation du cortex préfrontal médial inhibe les neurones prémoteurs sympathiques situés dans la médulla rostro-ventro latérale (Verberne, 1996). L'effet presseur et la tachycardie observés suite à l'injection de [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP dans l'ATV pourrait être le résultat d'une stimulation des récepteurs NK<sub>1</sub> situés sur les interneurones GABAergiques. L'activation des récepteurs NK<sub>1</sub> permettrait d'inhiber via les interneurones GABAergiques les neurones dopaminergiques de la région para-branchiale qui projettent au CPF. L'inhibition de la voie dopaminergique ATV-CPF empêcherait la stimulation du CPF et l'activation subséquente du baroréflexe. Ceci favoriserait un effet presseur ainsi qu'une stimulation du système sympathique.

L'injection de [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP dans l'ATV pourrait aussi activer directement les récepteurs NK<sub>1</sub> situés sur les neurones dopaminergiques dans la région para-nigrale et ainsi stimuler les efférences dopaminergiques au système limbique. Le noyau accumbens est impliqué dans la régulation de l'activité locomotrice. L'injection de SP dans l'ATV induit une augmentation de l'activité locomotrice qui peut être bloquée par l'infusion d'un neuroleptique dans le noyau accumbens ou une lésion des neurones dopaminergiques (6-OHDA) de l'aire A10 (Kelley et al., 1979). De plus, une augmentation de la transmission dopaminergique au niveau de la projection méso-accumbens pourrait conduire à une sensibilisation comportementale aux psychostimulants (Kalivas et al., 1993). La stimulation des récepteurs NK<sub>1</sub> possiblement localisés sur les neurones dopaminergiques dans la région para-nigrale pourrait activer le noyau accumbens et induire les comportements observés suite à l'injection de [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP dans l'ATV. Les effets

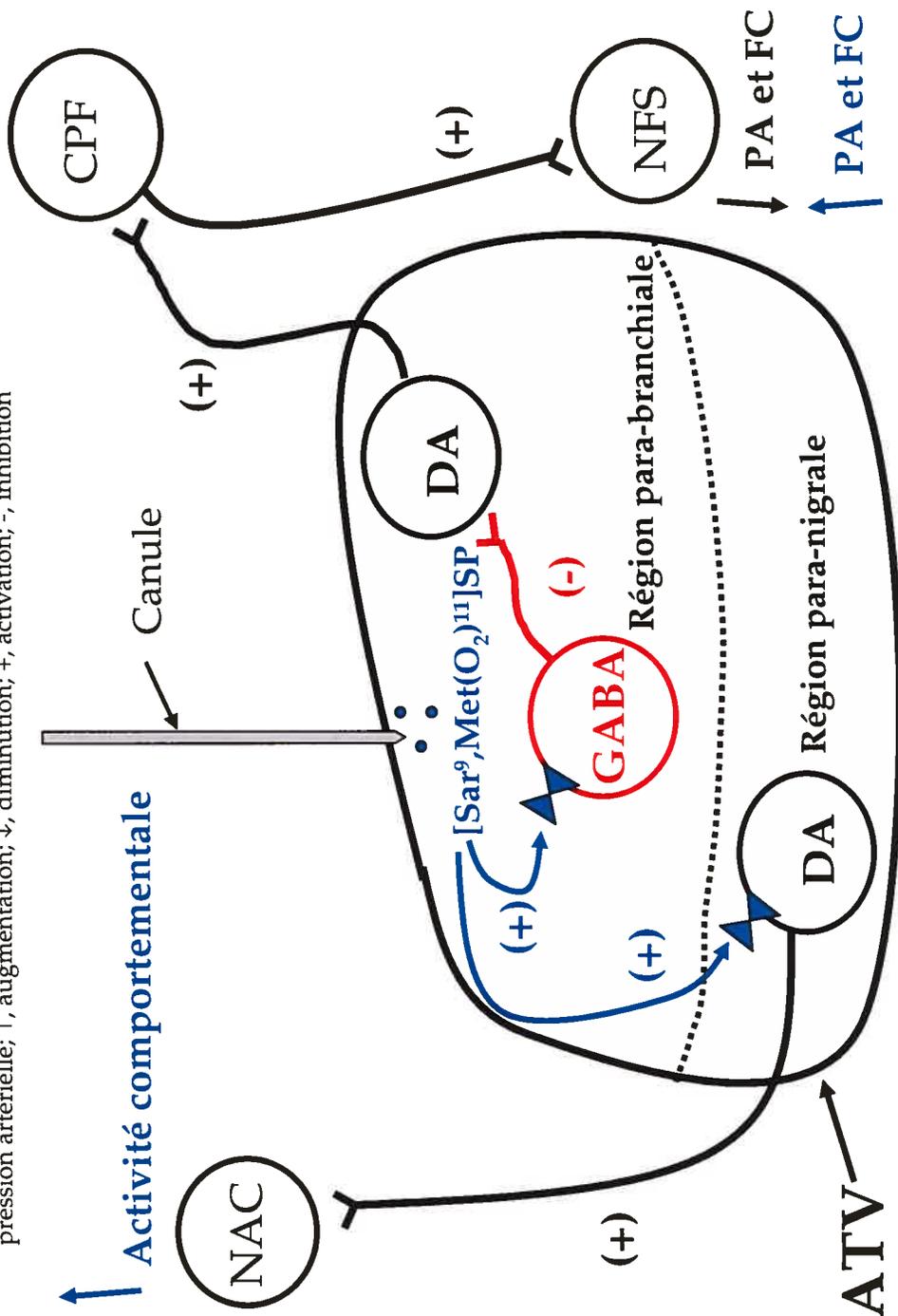
cardiovasculaires et comportementaux induits par l'injection de [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP dans l'ATV peuvent donc, tout en ayant un décours temporel similaire, être le résultat de l'activation des récepteurs NK<sub>1</sub> situés sur deux populations différentes de neurones dans l'ATV (Figure 7, p120.).

Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions tout d'abord administrer (i.v.) un antagoniste dopaminergique qui traverse la barrière hémato-encéphalique afin de vérifier si les effets cardiovasculaires et comportementaux induits par [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP sont dépendants de la dopamine. Ensuite, pour étudier les voies d'activation plus en profondeur, nous pourrions dans un premier temps injecter directement dans l'ATV un antagoniste GABAergique afin de vérifier si les effets cardiovasculaires induits par l'injection de [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP dans l'ATV ont pour intermédiaire les interneurons GABAergiques. L'injection locale d'un antagoniste dopaminergique non sélectif D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> dans le noyau accumbens et le cortex préfrontal permettrait de vérifier respectivement l'implication dopaminergique de ces deux noyaux dans les effets comportementaux et cardiovasculaires induits par l'activation des récepteurs NK<sub>1</sub> dans l'ATV.

### **3.0 Effets cardiovasculaires et comportementaux induits par l'agoniste NK<sub>2</sub>, [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) dans l'ATV**

L'injection de [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) dans l'ATV induit des réponses cardiovasculaires et comportementales variables. Chez la majorité des rats, le [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) augmente la fréquence cardiaque. Cette tachycardie est maximale à 25 pmoles et diminue avec une augmentation subséquente de la dose.

**Figure 7:** Hypothèse sur la localisation des récepteurs  $NK_1$  dans les voies neuronales activées par l'injection de  $[Sar^9, Met(O_2)^{11}]SP$  dans l'aire tegmentale ventrale (ATV). Abréviations: CPF, cortex préfrontal; DA, dopamine; FC, fréquence cardiaque; GABA, acide gamma-aminobutyrique; NAC, noyau accumbens; NFS, noyau du faisceau solitaire; PA, pression artérielle;  $\uparrow$ , augmentation;  $\downarrow$ , diminution; +, activation; -, inhibition



Cette atténuation de l'effet n'est pas due à une désensibilisation des récepteurs puisque l'administration de [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) à une dose de 100 pmoles chez des rats n'ayant reçu aucune autre injection, produit un effet comparable à celui obtenu à la même dose de [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) lors du protocole de la courbe dose-réponse. En fait, chez certains rats, l'injection de [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) dans l'ATV induit une bradycardie importante, particulièrement à des doses de 100 et 1000 pmoles. Cette dualité d'effet sur la fréquence cardiaque suggère que l'agoniste NK<sub>2</sub>, [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10), active deux voies neuronales distinctes.

La caractérisation du récepteur NK<sub>2</sub> à l'aide du SR 48968, un antagoniste hautement sélectif, suggère que les récepteurs NK<sub>2</sub> sont présents dans l'ATV. Cependant, les effets cardiovasculaires et comportementaux induits par l'injection de [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) sont labiles et supposent que les récepteurs sont en très faible concentration et distribués de façon diffuse.

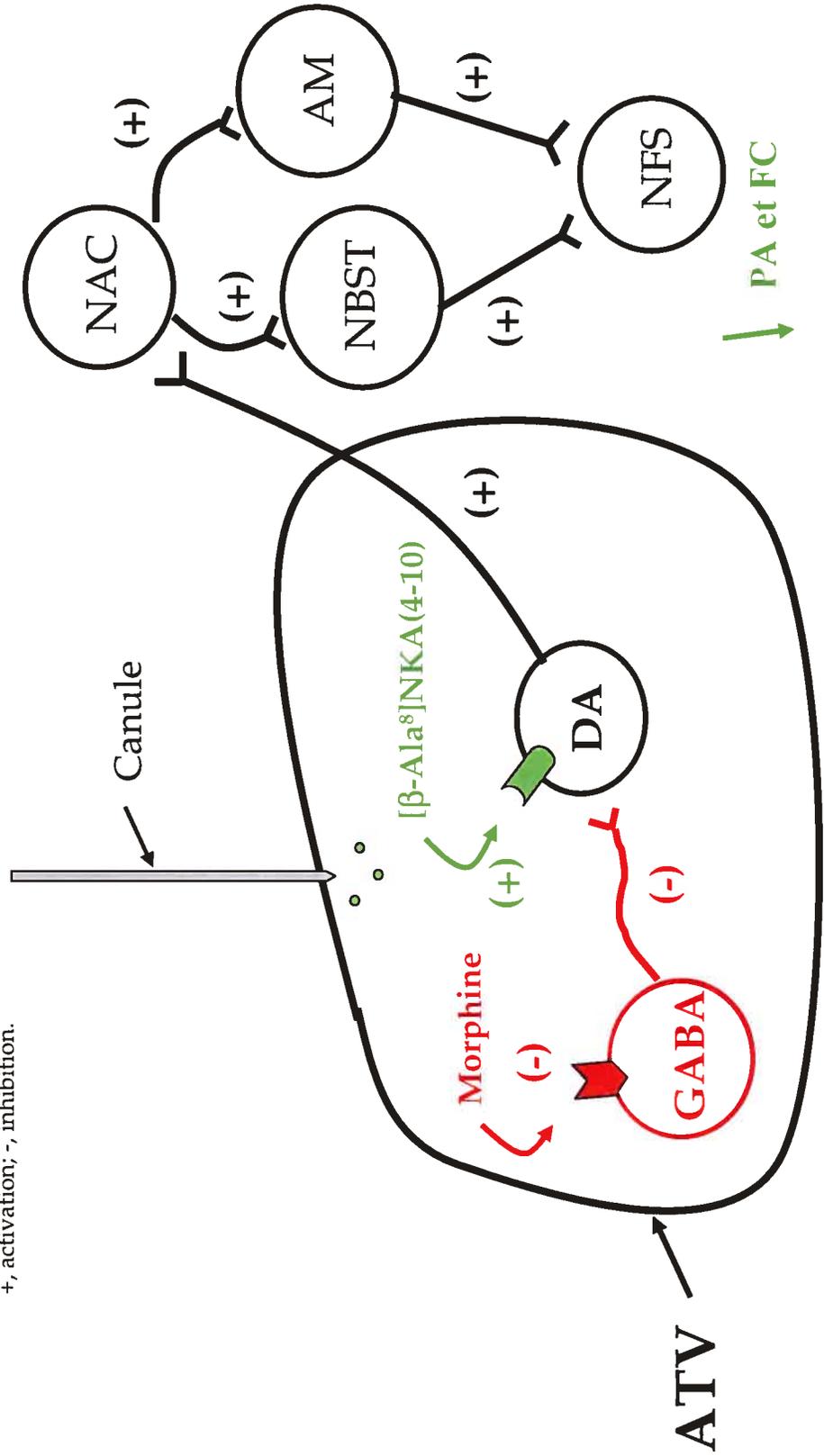
La bradycardie induite par l'injection de [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) suggère que la stimulation des récepteurs NK<sub>2</sub> dans l'ATV active le système parasympathique. On a récemment rapporté que le blocage des récepteurs NK<sub>2</sub> par l'injection i.c.v. du SR 48968 accentue l'augmentation de la pression artérielle et la tachycardie induite lors du sevrage à la morphine (Michaud et Couture, 2003). Ceci suggère également que le système parasympathique puisse être activé par les récepteurs NK<sub>2</sub> lors d'un sevrage à la morphine.

Une stimulation électrique du noyau accumbens, chez le rat, induit une hypotension et une bradycardie (Shen et al., 1993; Fan et Zhang, 1995). Cet effet cardio-dépresseur est corrélé avec une diminution de la fréquence de décharge des neurones du locus coeruleus, une région impliquée dans le

contrôle du système nerveux autonome sympathique. De plus, une vagotomie bilatérale abolit la bradycardie induite par la stimulation du noyau accumbens (Shen et al., 1993). Une stimulation du noyau accumbens activerait donc le système parasympathique possiblement par une stimulation indirecte du noyau du faisceau solitaire via l'amygdale et/ou le noyau basal de la strie terminale (Groenewegen et Russchen, 1984; van der Kooy et al., 1984; Heimer et al., 1991). On a rapporté que la SP et la substance K (NKA) modulent différemment le système mésocorticolimbique. En effet, la SP active le métabolisme de la dopamine dans le cortex préfrontal, tandis que la NKA stimule le métabolisme de dopamine dans le noyau accumbens (Deutch et al., 1985). Ainsi, l'injection de [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) dans l'ATV activerait les récepteurs NK<sub>2</sub> possiblement situés sur les neurones dopaminergiques qui projettent au noyau accumbens. La stimulation du noyau accumbens activerait par la suite le système parasympathique et induirait un effet cardio-dépresseur (Figure 8, p. 123).

Cette hypothèse peut aussi amener une explication à la potentialisation de l'effet presseur et de la tachycardie observés suite à l'administration i.c.v. du SR 48968 lors d'un sevrage à la morphine. Lors d'un sevrage aux opiacés, la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques meso-accumbens de même que les niveaux extracellulaires de dopamine dans le noyau accumbens sont dramatiquement réduits (Acquas et Di Chiara, 1992; Rossetti et al., 1992; Diana et al., 1995). Un blocage des récepteurs NK<sub>2</sub> situés sur les neurones dopaminergiques méso-accumbens dans l'ATV aura pour conséquence une diminution encore plus marquée de la transmission dopaminergique au noyau accumbens et donc favorisera davantage le système sympathique en plus de diminuer l'activité parasympathique via le noyau du faisceau solitaire (Figure 8, p. 123).

**Figure 8:** Hypothèse sur la localisation des récepteurs  $NK_2$  dans la voie neuronale activée lors de la bradycardie induite par l'injection de  $[\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}$  (4-10) dans l'aire tegmentale ventrale (ATV). Abréviations: AM, amygdale; NAC, noyau accumbens; NBST, noyau basal de la strie terminale; NFS, noyau du faisceau solitaire; ↓, diminution; +, activation; -, inhibition.



Pour vérifier l'implication du système parasympathique dans l'effet cardio-dépresseur induit par l'injection de [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) dans l'ATV, nous pourrions tout d'abord faire une injection i.v. d'atropine, afin de voir si en bloquant les récepteurs muscariniques cholinergiques, on peut inhiber la bradycardie. Par la suite, pour confirmer l'implication du noyau accumbens dans l'effet cardio-dépresseur, on pourrait injecter localement un antagoniste dopaminergique non sélectif D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub>. L'inhibition de la bradycardie nous permettrait d'affirmer que la stimulation du système parasympathique passe par l'activation d'une voie dopaminergique de l'ATV vers le noyau accumbens.

#### **4.0 Effets cardiovasculaires et comportementaux induits par l'agoniste NK<sub>3</sub>, senktide dans l'ATV**

L'injection de senktide dans l'ATV induit un effet presseur et une tachycardie accompagnés de plusieurs comportements, notamment d'exploration et de secousses corporelles. En comparaison avec les effets cardiovasculaires et comportementaux induits par les agonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub>, le senktide produit à faible dose des effets plus forts. Les effets cardiovasculaires induits par le senktide ont déjà atteint leur maximum à 1 pmole. La valeur du pD<sub>2</sub> du senktide pour le récepteur NK<sub>3</sub> dans le système nerveux central n'est pas connue. Les études de liaison chez le rat ont toutefois montré que le senktide avait une valeur de K<sub>d</sub> de  $2.8 \pm 1.0$  nM (Dam et al., 1990). Il faut noter que la saturation des récepteurs n'a pas à être complète pour produire un effet physiologique maximum. L'obtention d'une réponse maximale à des valeurs inférieures à celles du K<sub>d</sub> pourrait signifier un meilleur couplage aux protéines G ou le recrutement de plusieurs mécanismes de signalisation. La densité plus grande des récepteurs NK<sub>3</sub> dans

l'ATV comparativement aux récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> pourrait expliquer la différence d'amplitude dans les effets cardiovasculaires et comportementaux observés suite à l'injection des agonistes dans l'ATV (Ding et al., 1996). Un double marquage pour les récepteurs NK<sub>3</sub> et la tyrosine hydroxylase dans la région A10 a permis de montrer que les récepteurs NK<sub>3</sub> dans l'ATV sont situés sur des neurones dopaminergiques (Chen et al., 1998).

La tachycardie induite par l'injection de senktide dans l'ATV est plus importante à faible dose que la réponse pressive. Cependant, des données récentes, non incluses dans ce travail, montrent que l'administration i.v. d'aténolol (5mg/kg), un antagoniste sélectif des récepteurs  $\beta$ -1 adrénergiques, bloque complètement la tachycardie et la réponse pressive induite par l'injection de 25 pmoles de senktide dans l'ATV. Ceci confirme que les effets cardiovasculaires induits par l'activation des récepteurs NK<sub>3</sub> sont dépendants du système nerveux sympathique en périphérie. Toutefois, puisque les réponses cardiovasculaires sur la fréquence cardiaque et la pression artérielle sont complètement abolies avec l'aténolol, la participation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques est exclue. Ainsi, l'augmentation de la pression artérielle ne dépendrait pas d'une augmentation de la résistance périphérique via les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques. Une des explications pourrait être que la tachycardie amène une augmentation du débit cardiaque, ce qui entraînerait une augmentation de la pression artérielle. Cette hypothèse demeure à être vérifiée puisque le débit cardiaque n'a pas été mesuré. Une autre hypothèse est que les récepteurs  $\beta$ -1 adrénergiques sont aussi stimulés sur l'appareil juxta-glomérulaire du rein causant la libération de rénine et la formation subséquente d'angiotensine II. Ceci pourrait expliquer le délais observé dans l'induction de la réponse cardiovasculaire suite à l'injection du senktide dans l'ATV. L'angiotensine II peut induire une

augmentation de la pression artérielle et la libération de vasopressine. Un antagoniste des récepteurs  $V_1$  de la vasopressine bloque la réponse pressive et la tachycardie induite par l'injection dans l'ATV de DiMe-C7, un analogue de la SP qui stimule également les récepteurs  $NK_3$  (Cornish et van den Buuse, 1995). L'administration i.v. d'antagonistes des récepteurs  $V_1$  et  $AT_1$  permettrait de vérifier cette hypothèse.

#### 4.1 Hypothèse du mécanisme central de l'agoniste $NK_3$ , senktide

L'amygdale, une région importante dans le contrôle des émotions et du stress, reçoit une projection dopaminergique importante de l'ATV et est impliquée dans la régulation cardiovasculaire. En effet, une stimulation (avec le glutamate) du noyau central de l'amygdale induit une réponse pressive (Wu et al., 1999). Cette réponse pressive dépend de l'activation d'un système presseur cholinergique impliquant le septum latéral (SL), l'habénula (HB), le locus coeruleus (LC), l'hypothalamus postérieur (HP) et la médulla rostro-ventro-latérale (MRVL) (Li et Ku, 2002). En effet, l'injection d'atropine, un antagoniste des récepteurs cholinergiques muscariniques, dans le noyau de l'habénula, dans le locus coeruleus, dans l'hypothalamus postérieur ou dans la médulla rostro-ventro-latérale, renverse l'effet presseur induit par la stimulation de l'amygdale.

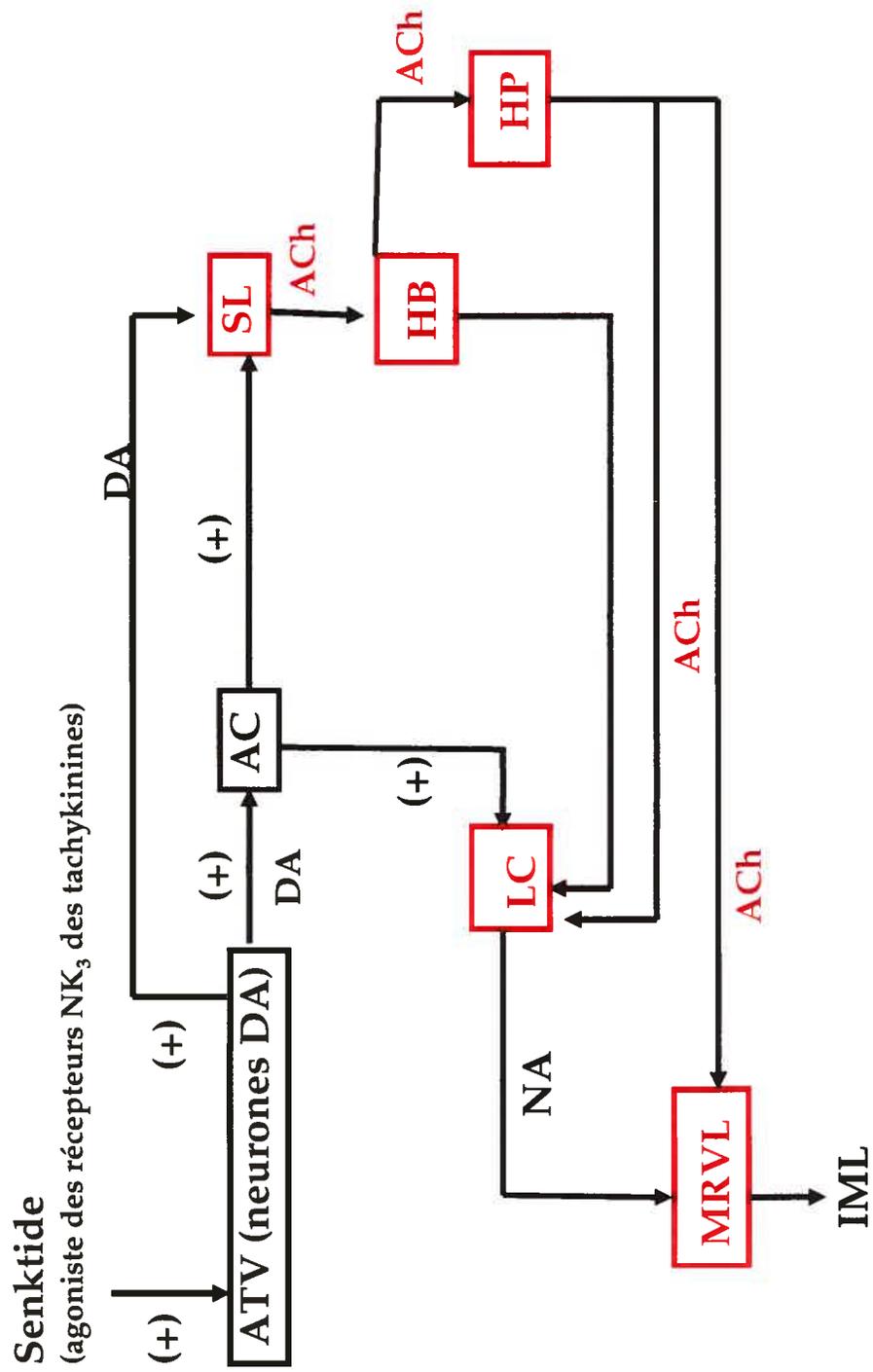
La stimulation des récepteurs  $NK_3$  module l'activité des systèmes centraux dopaminergiques et cholinergiques. L'injection de senktide dans l'ATV et dans la région septale augmente les niveaux extracellulaires de dopamine et d'acétylcholine au niveau de leurs projections respectives (Marco et al., 1998). La stimulation des récepteurs  $NK_3$  situés sur les neurones dopaminergiques de l'ATV pourrait ainsi activer l'amygdale et/ou le septum

latéral, ce qui permettrait l'activation du circuit neuronal cholinergique menant à une stimulation du système cardiovasculaire (Figure 9, p. 128).

L'injection i.v. d'un antagoniste dopaminergique traversant la barrière hémato-encéphalique confirmerait tout d'abord que le senktide active, par le biais des récepteurs NK<sub>3</sub>, les voies de projection dopaminergiques. L'administration périphérique d'un bloqueur cholinergique qui traverse également la barrière hémato-encéphalique permettrait par la suite de vérifier la participation d'un circuit neuronal cholinergique dans l'effet presseur et la tachycardie induits par le senktide. L'injection locale d'un antagoniste dopaminergique permettrait de savoir si l'activation du circuit neuronal cholinergique passe par le noyau central de l'amygdale et/ou le septum latéral. Par la suite, le blocage des récepteurs cholinergiques dans les différents noyaux (HB, HP, LC et MRVL) préciserait les voies d'activation neuronales empruntées.

Chez le rat normotendu, l'injection i.c.v. de carbachol, un agoniste cholinergique (Imai et al., 1989) et de senktide, un agoniste des récepteurs NK<sub>3</sub> (Takano et al., 1990) induit une réponse pressive dépendante de l'activation du système sympathique et de la relâche de vasopressine. La région septale latérale qui reçoit des afférences du mésencéphale est impliquée dans des changements phasiques de pression artérielle liés à l'activité comportementale (Kubo, 1998). L'injection d'ACh dans cette région produit une augmentation de pression artérielle dépendante de l'activation du système sympathique (Kubo, 1998). Enfin, l'hypothalamus est une autre région connue pour son implication dans la régulation cardiovasculaire.

**Figure 9:** Hypothèse sur les voies neuronales activées lors des effets cardiovasculaires induits par l'injection de sentkide dans l'aire tegmentale ventrale. Abréviations: Ach, acétylcholine; AC, noyau central de l'amygdale; DA, dopamine; HB, noyau de l'habénula; HP, hypothalamus postérieur; IML, colonne intermédiaire latérale; LC, locus coeruleus; MRVL, médulla rostro-ventro-latérale; NA, noradrénaline; SL, septum latéral; +, activation, ■ = circuit cholinergique



L'injection de carbachol dans l'hypothalamus postérieur induit une augmentation de pression artérielle chez le rat éveillé et non restreint (Martin, 1992).

Chez le rat spontanément hypertendu (SHR), l'activité du système cholinergique est altérée dans certaines régions du cerveau reliées au contrôle cardiovasculaire (Helke et al., 1980). L'administration intraveineuse d'atropine (Caputi et al., 1980) de même que l'injection d'hémicholinium-3, une drogue qui épuise les réserves d'Ach, dans les ventricules latéraux, dans l'hypothalamus postérieur (Brezenoff et Xiao, 1989) et dans la région septale latérale (Scheucher et al., 1991), diminue la pression artérielle chez le rat SHR. La relâche basale d'ACh dans la médulla rostro-ventro-latérale, un noyau qui projettent aux fibres pré-ganglionnaires sympathiques dans la colonne intermédiolatérale, est deux fois plus grande chez le rat SHR que chez le rat normotendu Wistar Kyoto (WKY) (Kubo et al., 1995). De plus, l'injection bilatérale de scopolamine, un antagoniste des récepteurs muscariniques, dans la médulla rostro-ventro-latérale, induit une diminution importante de pression artérielle chez le rat SHR, mais peu d'effet chez le rat WKY (Kubo et al., 1995). Les fonctions cholinergiques centrales reliées à la régulation de la pression artérielle sont donc augmentées chez les rats SHR.

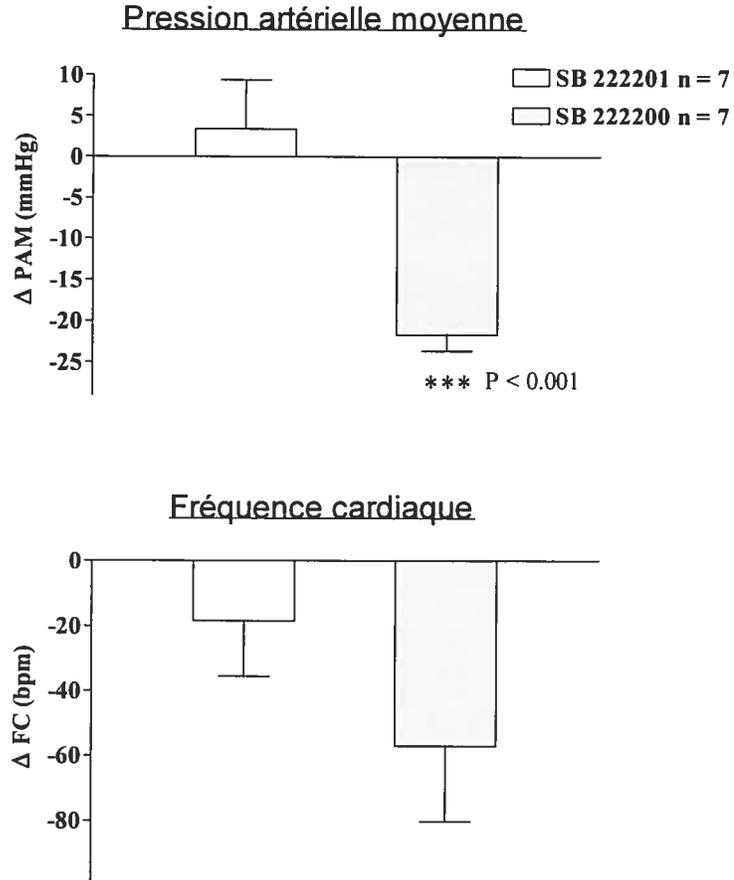
Le blocage des récepteurs NK<sub>3</sub> dans la substance noire ou par voie i.c.v. chez le rat SHR diminue significativement la pression artérielle, sans toutefois altérer la fréquence cardiaque. Cette diminution de pression artérielle représente un effet anti-hypertenseur et non un effet hypotenseur puisqu'il est absent chez le rat WKY (Lessard et Couture, 2003; Lessard et al., en revision, Eur. J. Pharmacol). Ces données suggèrent que les récepteurs NK<sub>3</sub> dans le cerveau et la substance noire sont activés de façon tonique chez

le rat SHR. Dans une étude préliminaire chez le rat SHR, nous avons évalué l'effet cardiovasculaire du blocage des récepteurs NK<sub>3</sub> dans l'ATV avec l'antagoniste SB 222200. Les résultats montrent une diminution significative de la pression artérielle moyenne. Cependant, la diminution de fréquence cardiaque observée n'est pas significative dû à l'écart-type élevé et à la légère bradycardie induite par l'énantiomère inactif, probablement à cause du pourcentage trop élevé de diméthyl sulphoxide (DMSO) dans le véhicule (Figure 10, p. 131). Le blocage des récepteurs NK<sub>3</sub> sur les neurones dopaminergiques de l'ATV préviendrait l'activation de l'amygdale et/ou du septum latéral et donc empêcherait la stimulation du système presseur cholinergique dont l'activité est augmentée chez le rat SHR (Kubo, 1998). Ces données préliminaires avec l'antagoniste NK<sub>3</sub> suggèrent une suractivation des récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines dans l'ATV du rat SHR. Il serait très intéressant de vérifier si l'on peut reproduire la diminution de la pression artérielle observée chez le SHR en injectant localement un antagoniste dopaminergique dans le septum latéral et le noyau central de l'amygdale afin de prévenir également l'activation du système presseur cholinergique.

## 5.0 Maladies neurodégénératives

Dans la présente étude, l'ATV apparaît comme une cible potentielle pour les tachykinines dans la régulation du système cardiovasculaire. En effet, l'injection unilatérale (côté droit) d'agonistes des récepteurs NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> des tachykinines dans l'ATV induit des effets cardiovasculaires se traduisant majoritairement par une réponse pressive et une tachycardie.

**Figure 10 :** Effets cardiovasculaires maximaux induits par l'injection d'un antagoniste NK<sub>3</sub> (SB 222200, 500 pmoles) et de l'énantiomère inactif (SB 222201, 500 pmoles) dans l'ATV chez le SHR



Ainsi, une déafférentation et/ou une dégénérescence des neurones dopaminergiques et non dopaminergiques dans l'ATV préviendraient, du moins en partie, la stimulation de l'ATV par les tachykinines et ceci pourrait se traduire par des dysfonctions cardiovasculaires chez certains patients atteints par des maladies neurodégénératives telles que le Parkinson et l'Alzheimer. Cette hypothèse, qui dépasse le cadre de notre étude, demande à être vérifiée.

Dans plusieurs maladies neurodégénératives, on rapporte une altération des taux de plusieurs neuropeptides dans le système nerveux central. Entre autres, une diminution de la substance P a été rapportée dans plusieurs régions du cerveau chez des patients atteints de la maladie de Parkinson et d'Alzheimer (Sivam, 1991; Fernandez et al., 1992; Ang et Shul, 1995). Les patients atteints de la maladie de Parkinson présentent généralement 4 signes cliniques, soit une instabilité posturale, une rigidité musculaire, une bradykinésie (lenteur des mouvements) et un tremblement au repos (Camicoli, 2002). Une dysfonction du système nerveux autonome incluant une altération des systèmes nerveux sympathique et parasympathique est aussi souvent rapportée à un stade avancé de la maladie de Parkinson (Turkka et al., 1987; van Dijk et al., 1993; Linden et al., 1997; Pursiainen et al., 2002). Cette maladie neurodégénérative est essentiellement caractérisée par une perte de neurones dopaminergiques dans la substance noire. Cependant, de plus en plus d'études montrent aussi une dégénérescence de la région A10 et une déafférentation de l'ATV (Javoy-Agid et Agid, 1980; van Domburg et Ten Donkelaar, 1991; McRitchie et al., 1997; Moore et al., 2001). De plus, on a rapporté que les neurones non dopaminergiques présents dans la région A10 sont affectés de la même façon

que les neurones dopaminergiques chez les patients atteints par cette maladie (McRitchie et al., 1997).

Un enregistrement en continu de la pression artérielle chez des patients atteints de Parkinson montre que la pression artérielle systolique et diastolique est significativement plus basse chez ces patients en comparaison aux sujets témoins (Brevetti et al., 1990). Au stade précoce de la maladie, on observe une perte unilatérale des neurones dopaminergiques de la voie striée (Chouza et a., 1984). Or, une lésion unilatérale droite des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte chez le rat diminue la pression artérielle moyenne, la fréquence cardiaque et les niveaux plasmatiques de norépinéphrine (Turgut et al., 1998). Il est intéressant de souligner que les neurones de la partie médiane du noyau para-branchial de l'ATV sont en continuité avec ceux dans la partie dorsale de la substance noire compacte (Fallon et Loughlin, 1995). Ainsi, la lésion de la substance noire compacte induite par l'injection de 6-OHDA (volume d'injection de 4 µl) dans l'étude de Turgut et al. (1998) pourrait aussi affecter les neurones dopaminergiques de la région para-branchiale de l'ATV.

La maladie d'Alzheimer est définie par une altération progressive des fonctions cognitives à un âge plus ou moins avancé chez l'homme. Cette maladie est généralement corrélée avec une dégénérescence des neurones cholinergiques et une diminution de plusieurs marqueurs cholinergiques (activité de la choline acétyltransférase, récepteurs nicotiniques et muscariniques) dans les ganglions de la base et les cortex temporaux et frontaux (Araujo et al., 1988; Auld et al., 2002). Cette maladie est aussi associée à une altération du système dopaminergique. En effet, on a rapporté une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire et

de l'ATV chez des patients atteints d'Alzheimer (Gibb et al., 1989; Kastner et al., 1993). De plus, comme dans la maladie de Parkinson, les patients atteints d'Alzheimer ont une pression artérielle diminuée, notamment à un stade avancé de la maladie (Burke et al., 1994).

## 6.0 Limitations de l'étude et perspectives d'avenir

Cette étude pharmacologique *in vivo* met en évidence le rôle important des tachykinines dans la régulation centrale du système cardiovasculaire et de l'activité comportementale dans l'ATV chez le rat. Toutefois, la méthode utilisée comporte certaines limitations. Par exemple, aucune canule n'a été implantée en dehors de l'ATV et donc aucune injection d'agonistes n'a pu être effectuée à l'extérieur du site d'injection. Malgré les arguments amenés en faveur d'une non diffusion des agonistes injectés, il aurait été approprié d'injecter volontairement chez quelques rats les agonistes des tachykinines à l'extérieur de l'ATV et de vérifier, s'il y a lieu, les effets cardiovasculaires et comportementaux induits. L'implantation d'électrodes dans l'ATV aurait permis d'avoir des volumes d'injection encore plus petits et de faire une distinction entre les effets induits par les agonistes dans la région para-nigrale et dans la région para-branchiale. Cependant, les électrodes sont trop fragiles pour être utilisées chez le rat éveillé et non restreint, donc nous devons nous limiter à l'implantation de canules en métal.

Pour l'instant, nous nous sommes limités à la caractérisation pharmacologique des trois récepteurs des tachykinines dans l'ATV, sans explorer les mécanismes d'action. Les prochaines expériences viseront à appuyer expérimentalement les différentes hypothèses avancées dans cette étude. Par exemple, l'injection i.v. d'antagonistes D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> de la dopamine

permettra de valider l'implication des voies dopaminergiques dans les effets cardiovasculaires et comportementaux induits par les tachykinines. De plus, l'usage d'antagonistes  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergiques et  $V_1$  de la vasopressine nous éclairera sur la participation du système nerveux sympathique et/ou d'un système hormonal dans les effets presseurs et les tachycardies induits par les agonistes des tachykinines. La participation du système nerveux parasympathique dans les bradycardies observées suite à l'injection de l'agoniste  $NK_2$  dans l'ATV sera évaluée par l'injection i.v. d'atropine. Les différents traitements pharmacologiques qui seront utilisés permettront par ailleurs de dissocier, s'il y a lieu, la réponse cardiovasculaire et comportementale. Le potentiel thérapeutique des antagonistes  $NK_3$  dans le traitement de l'hypertension artérielle motive la poursuite des expériences dans différents modèles d'hypertension chez le rat avec comme objectif l'identification du site et du mécanisme d'action de ces composés dans le cerveau.

## Conclusion

L'injection de doses physiologiques d'agonistes des récepteurs NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> des tachykinines dans l'aire tegmentale ventrale, induit des effets cardiovasculaires et comportementaux. Ces effets sont bloqués de manière sélective et réversible par des antagonistes non peptidiques. Cette caractérisation pharmacologique suggère la présence des trois récepteurs des tachykinines dans l'aire tegmentale ventrale où ils participeraient aux mécanismes centraux de régulation cardiovasculaire. Ainsi, en plus de son rôle bien connu dans le contrôle de l'activité comportementale, l'ATV serait un centre de régulation cardiovasculaire chez le rat.

Les données de la littérature suggèrent aussi que les tachykinines et leurs récepteurs jouent un rôle, via le système dopaminergique mésocorticolimbique, dans l'intégration des réponses cardiovasculaires et comportementales en situation de stress, pendant la réaction de défense ou lors d'un sevrage aux opiacés. D'autres études effectuées chez le rat SHR suggèrent aussi que les tachykinines et les récepteurs NK<sub>3</sub> de la substance noire et de l'ATV sont impliqués dans l'hypertension artérielle.

## Bibliographie

ABERCROMBIE, E.D., KEEFE, K.A., DIFRISCHIA, D.S. & ZIGMOND, M.J. (1989). *Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex*. J Neurochem, **52**, 1655-8.

ACKLEY, M.A., ASGHAR, A.U., WORSLEY, M.A. & KING, A.E. (2001). *Peripheral inflammation reduces the response of spinal dorsal horn neurons to an NK3 receptor agonist*. Neurosci Lett, **308**, 13-6.

ACQUAS, E. & DI CHIARA, G. (1992). *Depression of mesolimbic dopamine transmission and sensitization to morphine during opiate abstinence*. J Neurochem, **58**, 1620-5.

ADVENIER, C., NALINE, E., TOTY, L., BAKDACH, H., EMONDS-ALT, X., VILAIN, P., BRELIERE, J.C. & LE FUR, G. (1992a). *Effects on the isolated human bronchus of SR 48968, a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurokinin A (NK2) receptors*. Am Rev Respir Dis, **146**, 1177-81.

ADVENIER, C., ROUISSI, N., NGUYEN, Q.T., EMONDS-ALT, X., BRELIERE, J.C., NELIAT, G., NALINE, E. & REGOLI, D. (1992b). *Neurokinin A (NK2) receptor revisited with SR 48968, a potent non-peptide antagonist*. Biochem Biophys Res Commun, **184**, 1418-24.

ALTIER, N. & STEWART, J. (1999). *The tachykinin NK-1 receptor antagonist, RP-67580, infused into the ventral tegmental area prevents stress-induced analgesia in the formalin test*. Physiol Behav, **66**, 717-21.

ANDERSON, W.A., BRUNI, J.E. & KAUFMANN, A. (1990). *Afferent connections of the rat's supraoptic nucleus*. Brain Res Bull, **24**, 191-200.

- ANG, L.C. & SHUL, D.D. (1995). *Peptidergic neurons of subcortical white matter in aging and Alzheimer's brain*. Brain Res, **674**, 329-35.
- APPEL, S.B., LIU, Z., McELVAIN, M.A. & BRODIE, M.S. (2003). *Ethanol excitation of dopaminergic ventral tegmental area neurons is blocked by quinidine*. J Pharmacol Exp Ther, **306**, 437-46.
- APPENRODT, E., PHAROW, L. & BRATTSTROM, A. (1993). *Effects of central substance P on baroreflex regulation*. Neuropeptides, **25**, 77-81.
- ARAUJO, D.M., LAPCHAK, P.A., ROBITAILLE, Y., GAUTHIER, S. & QUIRION, R. (1988). *Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease*. J Neurochem, **50**, 1914-23.
- AULD, D.S., KORNECOOK, T.J., BASTIANETTO, S. & QUIRION, R. (2002). *Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies*. Prog Neurobiol, **68**, 209-45.
- BALL, D. J., BERESFORD, I. J. M., WREN, G. P. A., PENDRY, Y. D., SHELDRIK, R. L. G., WALSH, D. M., TURPIN, M. P., HAGAN, R. M. & COLEMAN, R. A. (1994). *In vitro and in vivo pharmacology of the non peptide antagonist at tachykinin NK<sub>2</sub> receptors, GR 159,897*. Br J Pharmacol, **112**, 48p.
- BANNON, M.J., LEE, J.M., GIRAUD, P., YOUNG, A., AFFOLTER, H.U. & BONNER, T.I. (1986). *Dopamine antagonist haloperidol decreases substance P, substance K, and preprotachykinin mRNAs in rat striatonigral neurons*. J Biol Chem, **261**, 6640-2.

BAO, X.M., SHU, S.Y., BAO, R. & ZHANG, K.H. (2002). *Distribution of substance P and its receptor in the marginal division of rat striatum and its association with the function of learning and memory*. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, **22**, 102-6.

BARR, A.J. & WATSON, S.P. (1994). *Protein kinase C mediates delayed inhibitory feedback regulation of human neurokinin type 1 receptor activation of phospholipase C in UC11 astrocytoma cells*. *Mol Pharmacol*, **46**, 266-73.

BEAUJOUAN, J.C., SAFFROY, M., TORRENS, Y. & GLOWINSKI, J. (2000). *Different subtypes of tachykinin NK(1) receptor binding sites are present in the rat brain*. *J Neurochem*, **75**, 1015-26.

BEAUJOUAN, J.C., SAFFROY, M., TORRENS, Y., SAGAN, S. & GLOWINSKI, J. (1999). *Pharmacological characterization of tachykinin septide-sensitive binding sites in the rat submaxillary gland*. *Peptides*, **20**, 1347-52.

BEAUJOUAN, J.C., SAFFROY, M., TORRENS, Y. & GLOWINSKI, J. (1997). *Potency and selectivity of the tachykinin NK3 receptor antagonist SR 142801*. *Eur J Pharmacol*, **319**, 307-16.

BENNETT, V.J., PERRINE, S.A. & SIMMONS, M.A. (2002). *A novel mechanism of neurokinin-1 receptor resensitization*. *J Pharmacol Exp Ther*, **303**, 1155-62.

BERESFORD, I.J., SHELDRIK, R.L., BALL, D.I., TURPIN, M.P., WALSH, D.M., HAWCOCK, A.B., COLEMAN, R.A., HAGAN, R.M. & TYERS, M.B. (1995). *GR159897, a potent non-peptide antagonist at tachykinin NK2 receptors*. *Eur J Pharmacol*, **272**, 241-8.

BERGEVIN, A., GIRARDOT, D., BOURQUE, M.J. & TRUDEAU, L.E. (2002). *Presynaptic mu-opioid receptors regulate a late step of the secretory process*

*in rat ventral tegmental area GABAergic neurons.* Neuropharmacology, **42**, 1065-78.

BLOUNT, P. & KRAUSE, J.E. (1993). *Functional nonequivalence of structurally homologous domains of neurokinin-1 and neurokinin-2 type tachykinin receptors.* J Biol Chem, **268**, 16388-95.

BONNER, T.I., AFFOLTER, H.U., YOUNG, A.C. & YOUNG, W.S., 3RD (1987). *A cDNA encoding the precursor of the rat neuropeptide, neurokinin B.* Brain Res, **388**, 243-9.

BOUTHENET, M.L., MARTRES, M.P., SALES, N. & SCHWARTZ, J.C. (1987). *A detailed mapping of dopamine D-2 receptors in rat central nervous system by autoradiography with [125I]iodosulpride.* Neuroscience, **20**, 117-55.

BREVETTI, G., BONADUCE, D., BREGGIO, R., PERNA, S., SIMONELLI, P., MARCONI, R. & CAMPANELLA, G. (1990). *Parkinson's disease and hypotension: 24-hour blood pressure recording in ambulant patients.* Clin Cardiol, **13**, 474-8.

BREZENOFF, H.E. & XIAO, Y.F. (1989). *Acetylcholine in the posterior hypothalamic nucleus is involved in the elevated blood pressure in the spontaneously hypertensive rat.* Life Sci, **45**, 1163-70.

BROWN, E.R., HARLAN, R.E. & KRAUSE, J.E. (1990). *Gonadal steroid regulation of substance P (SP) and SP-encoding messenger ribonucleic acids in the rat anterior pituitary and hypothalamus.* Endocrinology, **126**, 330-40.

BROWNSTEIN, M.J., MROZ, E.A., KIZER, J.S., PALKOVITS, M. & LEEMAN, S.E. (1976). *Regional distribution of substance P in the brain of the rat.* Brain Res, **116**, 299-305.

BURKE, W.J., CORONADO, P.G., SCHMITT, C.A., GILLESPIE, K.M. & CHUNG, H.D. (1994). *Blood pressure regulation in Alzheimer's disease*. *J Auton Nerv Syst*, **48**, 65-71.

BURNS, L.H. & KELLEY, A.E. (1988). *Neurokinin-alpha injected into the ventral tegmental area elicits a dopamine-dependent behavioral activation in the rat*. *Pharmacol Biochem Behav*, **31**, 255-63.

CABERLOTTO, L., HURD, Y.L., MURDOCK, P., WAHLIN, J.P., MELOTTO, S., CORSI, M. & CARLETTI, R. (2003). *Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain*. *Eur J Neurosci*, **17**, 1736-46.

CADOR, M., RIVET, J.M., KELLEY, A.E., LE MOAL, M. & STINUS, L. (1989). *Substance P, neurotensin and enkephalin injections into the ventral tegmental area: comparative study on dopamine turnover in several forebrain structures*. *Brain Res*, **486**, 357-63.

CAMICOLI, R. (2002). *Identification of parkinsonism and Parkinson's disease*. *Drugs Today (Barc)*, **38**, 677-86.

CANDENAS, M.L., CINTADO, C.G., PENNEFATHER, J.N., PEREDA, M.T., LOIZAGA, J.M., MAGGI, C.A. & PINTO, F.M. (2002). *Identification of a tachykinin NK(2) receptor splice variant and its expression in human and rat tissues*. *Life Sci*, **72**, 269-77.

CAPUTI, A.P., CAMILLERI, B.H. & BREZENOFF, H.E. (1980). *Age-related hypotensive effect of atropine in unanesthetized spontaneously hypertensive rats*. *Eur J Pharmacol*, **66**, 103-9.

CARR, D.B. & SESACK, S.R. (2000). *GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex*. *Synapse*, **38**, 114-23.

- CARTER, M.S. & KRAUSE, J.E. (1990). *Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma*. J Neurosci, **10**, 2203-14.
- CASSELL, M.D. & GRAY, T.S. (1989). *The amygdala directly innervates adrenergic (C1) neurons in the ventrolateral medulla in the rat*. Neurosci Lett, **97**, 163-8.
- CATALIOTO, R.M., CUCCHI, P., RENZETTI, A.R., CRISCUOLI, M. & MAGGI, C.A. (1998). *Independent coupling of the human tachykinin NK2 receptor to phospholipases C and A2 in transfected Chinese hamster ovary cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, **358**, 395-403.
- CELLIER, E., BARBOT, L., IYENGAR, S. & COUTURE, R. (1999). *Characterization of central and peripheral effects of septide with the use of five tachykinin NK1 receptor antagonists in the rat*. Br J Pharmacol, **127**, 717-28.
- CELLIER, E., BARBOT, L., REGOLI, D. & COUTURE, R. (1997). *Cardiovascular and behavioural effects of intracerebroventricularly administered tachykinin NK3 receptor antagonists in the conscious rat*. Br J Pharmacol, **122**, 643-54.
- CELLIER, E & COUTURE, R. (1997) *Mechanism of cardiovascular and behavioural responses to central NK-3 receptor activation in conscious rat*. In International Tachykinin Conference: Tachykinins in Health and Disease, Cairns (Australia), September 7 – 11, Abstract book p.40.
- CHAN, J.Y., BARNES, C.D. & CHAN, S.H. (1990). *Tonic enhancement of the sensitivity of baroreceptor reflex response by endogenous substance P in the rat*. Regul Pept, **29**, 199-213.

CHAN, O.H., SCHMID, H.L., KUO, B.S., WRIGHT, D.S., HOWSON, W. & STEWART, B.H. (1996). *Absorption of Cam-2445, and NK1 neurokinin receptor antagonist: in vivo, in situ, and in vitro evaluations.* J Pharm Sci, **85**, 253-7.

CHANG, M.M. & LEEMAN, S.E. (1970). *Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P.* J Biol Chem, **245**, 4784-90.

CHANG, M.M., LEEMAN, S.E. & NIALL, H.D. (1971). *Amino-acid sequence of substance P.* Nat New Biol, **232**, 86-7.

CHARLTON, C.G. & HELKE, C.J. (1985). *Autoradiographic localization and characterization of spinal cord substance P binding sites: high densities in sensory, autonomic, phrenic, and Onuf's motor nuclei.* J Neurosci, **5**, 1653-61.

CHASSAING, G., LAVIELLE, S., LOEUILLET, D., ROBILLIARD, P., CARRUETTE, A., GARRET, C., BEAUJOUAN, J.C., SAFFROY, M., PETITET, F., TORRENS, Y. & ET AL. (1991). *Selective agonists of NK-2 binding sites highly active on rat portal vein (NK-3 bioassay).* Neuropeptides, **19**, 91-5.

CHEN, L.W., GUAN, Z.L. & DING, Y.Q. (1998). *Mesencephalic dopaminergic neurons expressing neuromedin K receptor (NK3): a double immunocytochemical study in the rat.* Brain Res, **780**, 150-4.

CHEN, N.N. & PAN, W.H. (2000). *Regulatory effects of D2 receptors in the ventral tegmental area on the mesocorticolimbic dopaminergic pathway.* J Neurochem, **74**, 2576-82.

CHOUZA, C., ROMERO, S., LAGUARDIA, G., POU, G., LORENZO, J., FLORES, M., WOZNIAK, A., FERES, S., CAAMANO, J.L. & SCHROEDER, A. (1984). *Hemi-*

*parkinsonism: clinical, neuropsychological, and tomographical studies. Adv Neurol*, **40**, 415-25.

CHUNG, F.Z., WU, L.H., TIAN, Y., VARTANIAN, M.A., LEE, H., BIKKER, J., HUMBLET, C., PRITCHARD, M.C., RAPHY, J., SUMAN-CHAUHAN, N. & ET AL. (1995). *Two classes of structurally different antagonists display similar species preference for the human tachykinin neurokinin3 receptor. Mol Pharmacol*, **48**, 711-6.

CHURCHILL, L., DILTS, R.P. & KALIVAS, P.W. (1992). *Autoradiographic localization of gamma-aminobutyric acidA receptors within the ventral tegmental area. Neurochem Res*, **17**, 101-6.

CORNISH, J.L. & VAN DEN BUUSE, M. (1995). *Stimulation of the rat mesolimbic dopaminergic system produces a pressor response which is mediated by dopamine D-1 and D-2 receptor activation and the release of vasopressin. Brain Res*, **701**, 28-38.

CORNISH, J.L. & VAN DEN BUUSE, M. (1994). *Pressor responses to electrical and chemical stimulation of the rat brain A10 dopaminergic system. Neurosci Lett*, **176**, 142-6.

COUTURE, R., TOMA, N. & BARBOT, L. (2000). *SR142801 behaves as a tachykinin NK-3 receptor agonist on a spinal nociceptive reflex in the rat. Life Sci*, **66**, 51-65.

COUTURE, R., PICARD, P., POULAT, P. & PRAT, A. (1995). *Characterization of the tachykinin receptors involved in spinal and supraspinal cardiovascular regulation. Can J Physiol Pharmacol*, **73**, 892-902.

COUTURE, R., LANEUVILLE, O., GUIMOND, C., DRAPEAU, G. & REGOLI, D. (1989). *Characterization of the peripheral action of neurokinins and neurokinin*

- receptor selective agonists on the rat cardiovascular system.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, **340**, 547-57.
- COUTURE, R. & CUELLO, A.C. (1984). *Studies on the trigeminal antidromic vasodilatation and plasma extravasation in the rat.* J Physiol, **346**, 273-85.
- COUTURE, R. & REGOLI, D. (1981). *Inactivation of substance P and its C-terminal fragments in rat plasma and its inhibition by Captopril.* Can J Physiol Pharmacol, **59**, 621-5.
- CUELLO, A.C., EMSON, P.C., PAXINOS, G. & JESSELL, T. (1978). *Substance P containing and cholinergic projections from the habenula.* Brain Res, **149**, 413-29.
- CULMAN, J. & UNGER, T. (1995). *Central tachykinins: mediators of defence reaction and stress reactions.* Can J Physiol Pharmacol, **73**, 885-91.
- DAM, T.V., ESCHER, E. & QUIRION, R. (1990). *Visualization of neurokinin-3 receptor sites in rat brain using the highly selective ligand [3H] senktide.* Brain Res, **506**, 175-9.
- DEUTCH, A.Y., MAGGIO, J.E., BANNON, M.J., KALIVAS, P.W., TAM, S.Y., GOLDSTEIN, M. & ROTH, R.H. (1985). *Substance K and substance P differentially modulate mesolimbic and mesocortical systems.* Peptides, **6 Suppl 2**, 113-22.
- DI CHIARA, G. & IMPERATO, A. (1988). *Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats.* Proc Natl Acad Sci U S A, **85**, 5274-8.

DIANA, M., PISTIS, M., MUNTONI, A. & GESSA, G. (1995). *Profound decrease of mesolimbic dopaminergic neuronal activity in morphine withdrawn rats.* J Pharmacol Exp Ther, **272**, 781-5.

DING, Y.Q., SHIGEMOTO, R., TAKADA, M., OHISHI, H., NAKANISHI, S. & MIZUNO, N. (1996). *Localization of the neuromedin K receptor (NK3) in the central nervous system of the rat.* J Comp Neurol, **364**, 290-310.

DOHERTY, M.D. & PICKEL, V.M. (2000). *Ultrastructural localization of the serotonin 2A receptor in dopaminergic neurons in the ventral tegmental area.* Brain Res, **864**, 176-85.

DONALDSON, L.F., HASKELL, C.A. & HANLEY, M.R. (2001). *Messenger RNA localization and further characterisation of the putative tachykinin receptor NK4 (NK3B).* Receptors Channels, **7**, 259-72.

DONALDSON, L.F., HASKELL, C.A. & HANLEY, M.R. (1996). *Functional characterization by heterologous expression of a novel cloned tachykinin peptide receptor.* Biochem J, **320 ( Pt 1)**, 1-5.

DONNERER, J., STARK, U., TRITTHART, H.A. & LEMBECK, F. (1992). *CP-96,345, a non-peptide antagonist of substance P. III. Cardiovascular effects in mammals unrelated to actions on substance P receptors.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, **346**, 328-32.

DOUGLAS, F.L., PALKOVITS, M. & BROWNSTEIN, M.J. (1982). *Regional distribution of substance P-like immunoreactivity in the lower brainstem of the rat.* Brain Res, **245**, 376-8.

DRAPEAU, G., ROUISSI, N., NANTEL, F., RHALEB, N.E., TOUSIGNANT, C. & REGOLI, D. (1990). *Antagonists for the neurokinin NK-3 receptor evaluated in selective receptor systems*. Regul Pept, **31**, 125-35.

DRAPEAU, G., D'ORLEANS-JUSTE, P., DION, S., RHALEB, N.E. & REGOLI, D. (1987a). *Specific agonists for neurokinin B receptors*. Eur J Pharmacol, **136**, 401-3.

DRAPEAU, G., D'ORLEANS-JUSTE, P., DION, S., RHALEB, N.E., ROUISSI, N.E. & REGOLI, D. (1987b). *Selective agonists for substance P and neurokinin receptors*. Neuropeptides, **10**, 43-54.

DUBOIS, A., SAVASTA, M., CURET, O. & SCATTON, B. (1986). *Autoradiographic distribution of the D1 agonist [3H]SKF 38393, in the rat brain and spinal cord. Comparison with the distribution of D2 dopamine receptors*. Neuroscience, **19**, 125-37.

DUMARS, L.A., RODGER, L.D. & KALIVAS, P.W. (1988). *Behavioral cross-sensitization between cocaine and enkephalin in the A10 dopamine region*. Behav Brain Res, **27**, 87-91.

EISON, A.S., EISON, M.S. & IVERSEN, S.D. (1982). *The behavioural effects of a novel substance P analogue following infusion into the ventral tegmental area or substantia nigra of rat brain*. Brain Res, **238**, 137-52.

ELLIOTT, P.J., MASON, G.S., GRAHAM, E.A., TURPIN, M.P. & HAGAN, R.M. (1992). *Modulation of the rat mesolimbic dopamine pathway by neurokinins*. Behav Brain Res, **51**, 77-82.

ELLIOTT, P.J., ALPERT, J.E., BANNON, M.J. & IVERSEN, S.D. (1986). *Selective activation of mesolimbic and mesocortical dopamine metabolism in rat brain*

*by infusion of a stable substance P analogue into the ventral tegmental area.* Brain Res, **363**, 145-7.

EMONDS-ALT, X., VILAIN, P., GOULAOUIC, P., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., ADVENIER, C., NALINE, E., NELIAT, G., LE FUR, G. & BRELIERE, J.C. (1992). *A potent and selective non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK2) receptor.* Life Sci, **50**, 101-6.

ERSPAMER, V., MELCHIORRI, P., BROCCARDO, M., ERSPAMER, G.F., FALASCHI, P., IMPROOTA, G., NEGRI, L. & RENDA, T. (1981). *The brain-gut-skin triangle: new peptides.* Peptides, **2 Suppl 2**, 7-16.

FALLON, J. & LOUGHLIN, S. (1995). *Substantia Nigra.* In The Rat Nervous System, Second edition. ed Paxinos, G. pp. 215-237.

FAN, Y.P. & ZHANG, R.B. (1995). *The role of accumbens nucleus in the inhibitory effect of somatic afferent inputs on the defence cardiovascular response and its mechanism.* Sheng Li Xue Bao, **47**, 149-54.

FELDMAN, P.D. (1995). *Neurokinin1 receptor mediation of the vasodepressor effects of substance P in the nucleus of the tractus solitarius.* J Pharmacol Exp Ther, **273**, 617-23.

FERNANDEZ, A., DE CEBALLOS, M.L., JENNER, P. & MARSDEN, C.D. (1992). *Striatal neuropeptide levels in Parkinson's disease patients.* Neurosci Lett, **145**, 171-4.

FINK, J.S. & SMITH, G.P. (1980). *Mesolimbocortical dopamine terminal fields are necessary for normal locomotor and investigatory exploration in rats.* Brain Res, **199**, 359-84.

FLOOD, J.F., BAKER, M.L., HERNANDEZ, E.N. & MORLEY, J.E. (1990). *Modulation of memory retention by neuropeptide K*. Brain Res, **520**, 284-90.

FONG, T.M., ANDERSON, S.A., YU, H., HUANG, R.R. & STRADER, C.D. (1992). *Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor*. Mol Pharmacol, **41**, 24-30.

FUJII, T., MURAI, M., MORIMOTO, H., MAEDA, Y., YAMAOKA, M., HAGIWARA, D., MIYAKE, H., IKARI, N. & MATSUO, M. (1992). *Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK1 receptor antagonist, FK888*. Br J Pharmacol, **107**, 785-9.

GARCIA, M., SAKAMOTO, K., SHIGEKAWA, M., NAKANISHI, S. & ITO, S. (1994). *Multiple mechanisms of arachidonic acid release in Chinese hamster ovary cells transfected with cDNA of substance P receptor*. Biochem Pharmacol, **48**, 1735-41.

GARRET, C., CARRUETTE, A., FARDIN, V., MOUSSAOUI, S., PEYRONEL, J.F., BLANCHARD, J.C. & LADURON, P.M. (1991). *Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, **88**, 10208-12.

GAVIOLI, E.C., CANTERAS, N.S. & DE LIMA, T.C. (2002). *The role of lateral septal NK1 receptors in mediating anxiogenic effects induced by intracerebroventricular injection of substance P*. Behav Brain Res, **134**, 411-5.

GERARD, N.P., BAO, L., XIAO-PING, H. & GERARD, C. (1993). *Molecular aspects of the tachykinin receptors*. Regul Pept, **43**, 21-35.

GERVAIS, J. & ROUILLARD, C. (2000). *Dorsal raphe stimulation differentially modulates dopaminergic neurons in the ventral tegmental area and substantia nigra*. *Synapse*, **35**, 281-91.

GIBB, W.R., MOUNTJOY, C.Q., MANN, D.M. & LEES, A.J. (1989). *The substantia nigra and ventral tegmental area in Alzheimer's disease and Down's syndrome*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **52**, 193-200.

GITTER, B. D., BRUNS, R. F., HOWBERT, J. J., WATERS, D. C., THRELKELD, P. G., COX, L. M., NIXON, J. A., LOBB, K. L., MASON, N. R. & STENGEL, P. W. (1995) *Pharmacological characterization of LY 303870: a novel, potent and selective nonpeptide substance P (neurokinin-1) receptor antagonist*. *J Pharmacol Exp Ther*, **275**, 737-44.

GRADY, E.F., GARLAND, A.M., GAMP, P.D., LOVETT, M., PAYAN, D.G. & BUNNETT, N.W. (1995). *Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven-transmembrane domain NK1 receptor*. *Mol Biol Cell*, **6**, 509-24.

GROENEWEGEN, H.J. & RUSSCHEN, F.T. (1984). *Organization of the efferent projections of the nucleus accumbens to pallidal, hypothalamic, and mesencephalic structures: a tracing and immunohistochemical study in the cat*. *J Comp Neurol*, **223**, 347-67.

GUARD, S., HORWELL, D. C., HOWSON, W., HUGHES, J., PRITCHARD, M. C., ROBERTS, E., REES, D., WATLING, K. J. & WOODRUFF, G. N. (1993). *Rational design of high affinity NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> tachykinin receptor ligands*. *Br J Pharmacol*, **110**, 56p.

GYSLING, K. & WANG, R.Y. (1983). *Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat*. *Brain Res*, **277**, 119-27.

HAGAN, R.M., IRELAND, S.J., JORDAN, C.C., BERESFORD, I.J., DEAL, M.J. & WARD, P. (1991). *Receptor-selective, peptidase-resistant agonists at neurokinin NK-1 and NK-2 receptors: new tools for investigating neurokinin function*. *Neuropeptides*, **19**, 127-35.

HALLIDAY, G. & TORK, I. (1988). *Substance P-like immunoreactive fibres in the ventromedial mesencephalic tegmentum of rat*. *Brain Res Bull*, **21**, 659-70.

HALLIDAY, G.M. & TORK, I. (1986). *Comparative anatomy of the ventromedial mesencephalic tegmentum in the rat, cat, monkey and human*. *J Comp Neurol*, **252**, 423-45.

HARRISON, S. & GEPPETTI, P. (2001). *Substance p*. *Int J Biochem Cell Biol*, **33**, 555-76.

HASENOHRL, R.U., SOUZA-SILVA, M.A., NIKOLAUS, S., TOMAZ, C., BRANDAO, M.L., SCHWARTING, R.K. & HUSTON, J.P. (2000). *Substance P and its role in neural mechanisms governing learning, anxiety and functional recovery*. *Neuropeptides*, **34**, 272-80.

HASSESIAN, H., COUTURE, R. & DE CHAMPLAIN, J. (1990). *Sympathoadrenal mechanisms underlying cardiovascular responses to intrathecal substance P in conscious rats*. *J Cardiovasc Pharmacol*, **15**, 736-44.

HAUSER, G.J., DAYAO, E.K. & ZUKOWSKA-GROJEC, Z. (1995). *Effect of pentobarbital anesthesia on the pressor response to agonists in vivo in normal and endotoxemic rats*. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, **90**, 289-300.

HAVERSTICK, D.M. & BANNON, M.J. (1989a). *Evidence for dual mechanisms involved in methamphetamine-induced increases in striatal preprotachykinin mRNA*. *J Biol Chem*, **264**, 13140-4.

HAVERSTICK, D.M., RUBENSTEIN, A. & BANNON, M.J. (1989b). *Striatal tachykinin gene expression regulated by interaction of D-1 and D-2 dopamine receptors*. J Pharmacol Exp Ther, **248**, 858-62.

HAY, D.W., GIARDINA, G.A., GRISWOLD, D.E., UNDERWOOD, D.C., KOTZER, C.J., BUSH, B., POTTS, W., SANDHU, P., LUNDBERG, D., FOLEY, J.J., SCHMIDT, D.B., MARTIN, L.D., KILIAN, D., LEGOS, J.J., BARONE, F.C., LUTTMANN, M.A., GRUGNI, M., RAVEGLIA, L.F. & SARAU, H.M. (2002). *Nonpeptide tachykinin receptor antagonists. III. SB 235375, a low central nervous system-penetrant, potent and selective neurokinin-3 receptor antagonist, inhibits citric acid-induced cough and airways hyper-reactivity in guinea pigs*. J Pharmacol Exp Ther, **300**, 314-23.

HEFFNER, T.G., HELLER, A., MILLER, F.E., KOTAKE, C. & SEIDEN, L.S. (1983). *Locomotor hyperactivity in neonatal rats following electrolytic lesions of mesocortical dopamine neurons*. Brain Res, **285**, 29-37.

HEIMER, L., ZAHM, D.S., CHURCHILL, L., KALIVAS, P.W. & WOHLTMANN, C. (1991). *Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat*. Neuroscience, **41**, 89-125.

HELKE, C.J., KRAUSE, J.E., MANTYH, P.W., COUTURE, R. & BANNON, M.J. (1990). *Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms*. Faseb J, **4**, 1606-15.

HELKE, C.J., SHULTS, C.W., CHASE, T.N. & O'DONOHUE, T.L. (1984). *Autoradiographic localization of substance P receptors in rat medulla: effect of vagotomy and nodose ganglionectomy*. Neuroscience, **12**, 215-23.

HELKE, C.J., MUTH, E.A. & JACOBOWITZ, D.M. (1980). *Changes in central cholinergic neurons in the spontaneously hypertensive rat*. Brain Res, **188**, 425-36.

HELKE, C.J., O'DONOHUE, T.L. & JACOBOWITZ, D.M. (1980). *Substance P as a baro- and chemoreceptor afferent neurotransmitter: immunocytochemical and neurochemical evidence in the rat*. Peptides, **1**, 1-9.

HENRY, J.L. (1987), *Discussion of nomenclature for tachykinins and tachykinin receptors*. In Substance P and Neurokinins (Henry, J.L. et al., eds). P. xvii, Springer-Verlag.

HERVE, D., PICKEL, V.M., JOH, T.H. & BEAUDET, A. (1987). *Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat: fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons*. Brain Res, **435**, 71-83.

HOKFELT, T., LJUNGAHL, A., STEINBUSCH, H., VERHOFSTAD, A., NILSSON, G., BRODIN, E., PERNOW, B. & GOLDSTEIN, M. (1978). *Immunohistochemical evidence of substance P-like immunoreactivity in some 5-hydroxytryptamine-containing neurons in the rat central nervous system*. Neuroscience, **3**, 517-38.

HUA, X., LUNDBERG, J.M., THEODORSSON-NORHEIM, E. & BRODIN, E. (1984). *Comparison of cardiovascular and bronchoconstrictor effects of substance P, substance K and other tachykinins*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, **328**, 196-201.

HULEUX, C., BERTHIER, A., ROSSIGNOL, B. & DREUX, C. (1998). *A "septide-sensitive" receptor is not involved in tachykinin-mediated secretory and inositol phosphate responses in rat parotid gland: are several transduction*

*pathways involved after the stimulation of the NK1 receptor?* J Neurochem, **70**, 858-64.

HUSTON, J.P., HASENOHRL, R.U., BOIX, F., GERHARDT, P. & SCHWARTING, R.K. (1993). *Sequence-specific effects of neurokinin substance P on memory, reinforcement, and brain dopamine activity.* Psychopharmacology (Berl), **112**, 147-62.

IGWE, O.J., KIM, D.C., SEYBOLD, V.S., LARSON, A.A. (1990). *Specific binding of substance P aminoterminal heptapeptide [SP (1-7)] to mouse brain and spinal cord membranes.* J Neurosci, **10**, 3653-63.

IMAI, Y., ABE, K., SASAKI, S., MINAMI, N., MUNAKATA, M., YUMITA, S., NOBUNAGA, T., SEKINO, H. & YOSHINAGA, K. (1989). *Role of vasopressin in cardiovascular response to central cholinergic stimulation in rats.* Hypertension, **13**, 549-57.

ITOI, K., JOST, N., CULMAN, J., TSCHOPE, C. & UNGER, T. (1994). *Further localization of cardiovascular and behavioral actions of substance P in the rat brain.* Brain Res, **668**, 100-6.

ITOI, K., TSCHOPE, C., JOST, N., CULMAN, J., LEBRUN, C., STAUSS, B. & UNGER, T. (1992). *Identification of the central tachykinin receptor subclass involved in substance P-induced cardiovascular and behavioral responses in conscious rats.* Eur J Pharmacol, **219**, 435-44.

ITOI, K., JOST, N., BADOER, E., TSCHOPE, C., CULMAN, J. & UNGER, T. (1991). *Localization of the substance P-induced cardiovascular responses in the rat hypothalamus.* Brain Res, **558**, 123-6.

IYENGAR, S., HIPSKIND, P.A., GEHLERT, D.R., SCHOBBER, D., LOBB, K.L., NIXON, J.A., HELTON, D.R., KALLMAN, M.J., BOUCHER, S., COUTURE, R., LI, D.L. & SIMMONS, R.M. (1997). *LY303870, a centrally active neurokinin-1 antagonist with a long duration of action*. *J Pharmacol Exp Ther*, **280**, 774-85.

JACQUES, L., COUTURE, R., DRAPEAU, G. & REGOLI, D. (1989). *Capillary permeability induced by intravenous neurokinins. Receptor characterization and mechanism of action*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **340**, 170-9.

JAVOY-AGID, F. & AGID, Y. (1980). *Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson disease?* *Neurology*, **30**, 1326-30.

JESSEN, K.R., SAFFREY, M.J., VAN NOORDEN, S., BLOOM, S.R., POLAK, J.M. & BURNSTOCK, G. (1980). *Immunohistochemical studies of the enteric nervous system in tissue culture and in situ: localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP), substance-P and enkephalin immunoreactive nerves in the guinea-pig gut*. *Neuroscience*, **5**, 1717-35.

JOHNSON, S.W. & NORTH, R.A. (1992). *Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons*. *J Neurosci*, **12**, 483-8.

KAGE, R., LEEMAN, S.E. & BOYD, N.D. (1993). *Biochemical characterization of two different forms of the substance P receptor in rat submaxillary gland*. *J Neurochem*, **60**, 347-51.

KAGE, R., MCGREGOR, G.P., THIM, L. & CONLON, J.M. (1988). *Neuropeptide-gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin*. *J Neurochem*, **50**, 1412-7.

KALIVAS, P.W. (1993). *Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area*. *Brain Res Brain Res Rev*, **18**, 75-113.

KALIVAS, P.W., CHURCHILL, L. & KLITENICK, M.A. (1993). *GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area*. *Neuroscience*, **57**, 1047-60.

KALIVAS, P.W., SORG, B.A. & HOOKS, M.S. (1993). *The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants*. *Behav Pharmacol*, **4**, 315-334.

KALIVAS, P.W. & STEWART, J. (1991). *Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity*. *Brain Res Brain Res Rev*, **16**, 223-44.

KALIVAS, P.W., DEUTCH, A.Y., MAGGIO, J.E., MANTYH, P.W. & ROTH, R.H. (1985). *Substance K and substance P in the ventral tegmental area*. *Neurosci Lett*, **57**, 241-6.

KALIVAS, P.W., TAYLOR, S. & MILLER, J.S. (1985). *Sensitization to repeated enkephalin administration into the ventral tegmental area of the rat. I. Behavioral characterization*. *J Pharmacol Exp Ther*, **235**, 537-43.

KANGAWA, K., MINAMINO, N., FUKUDA, A. & MATSUO, H. (1983). *Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord*. *Biochem Biophys Res Commun*, **114**, 533-40.

KASTNER, A., HIRSCH, E.C., HERRERO, M.T., JAVOY-AGID, F. & AGID, Y. (1993). *Immunocytochemical quantification of tyrosine hydroxylase at a cellular level in the mesencephalon of control subjects and patients with Parkinson's and Alzheimer's disease*. *J Neurochem*, **61**, 1024-34.

KELLEY, A.E., STINUS, L. & IVERSEN, S.D. (1979). *Behavioural activation induced in the rat by substance P infusion into ventral tegmental area: implication of dopaminergic A10 neurones*. *Neurosci Lett*, **11**, 335-9.

KIMURA, S., GOTO, K., OGAWA, T., SUGITA, Y. & KANAZAWA, I. (1984). *Pharmacological characterization of novel mammalian tachykinins, neurokinin alpha and neurokinin beta*. *Neurosci Res*, **2**, 97-104.

KIROUAC, G.J. & CIRIELLO, J. (1997). *Cardiovascular afferent inputs to ventral tegmental area*. *Am J Physiol*, **272**, R1998-2003.

KIROUAC, G.J. & CIRIELLO, J. (1997). *Medullary inputs to nucleus accumbens neurons*. *Am J Physiol*, **273**, R2080-8

KIROUAC, G.J. & GANGULY, P.K. (1993). *Up-regulation of dopamine receptors in the brain of the spontaneously hypertensive rat: an autoradiographic analysis*. *Neuroscience*, **52**, 135-41.

KLINK, R., DE KERCHOVE D'EXAERDE, A., ZOLI, M. & CHANGEUX, J.P. (2001). *Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei*. *J Neurosci*, **21**, 1452-63.

KRAMER, M.S., CUTLER, N., FEIGNER, J., SHRIVASTAVA, R., CARMAN, J., SRAMEK, J.J., REINES, S.A., LIU, G., SNAVELY, D., WYATT-KNOWLES, E., HALE, J.J., MILLS, S.G., MACCOSS, M., SWAIN, C.J., HARRISON, T., HILL, R.G., HEFTI, F., SCOLNICK, E.M., CASCIERI, M.A., CHICCHI, G.G., SADOWSKI, S., WILLIAMS, A.R., HEWSON, L., SMITH, D., RUPNIAK, N.M. & ET AL. (1998). *Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors*. *Science*, **281**, 1640-5.

KRAUSE, J.E., MACDONALD, M.R. & TAKEDA, Y. (1989). *The polyprotein nature of substance P precursors*. *Bioessays*, **10**, 62-9.

KUBO, T. (1998). *Cholinergic mechanism and blood pressure regulation in the central nervous system*. *Brain Res Bull*, **46**, 475-81.

KUBO, T., ISHIZUKA, T., FUKUMORI, R., ASARI, T. & HAGIWARA, Y. (1995). *Enhanced release of acetylcholine in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats*. *Brain Res*, **686**, 1-9.

KUBO, T. & KIHARA, M. (1987). *Blood pressure modulation by substance P in the rat nucleus tractus solitarius*. *Brain Res*, **413**, 379-83.

KUWAHARA, A. & COOKE, H.J. (1990). *Tachykinin-induced anion secretion in guinea pig distal colon: role of neural and inflammatory mediators*. *J Pharmacol Exp Ther*, **252**, 1-7.

LANEUVILLE, O., DORAIS, J. & COUTURE, R. (1988). *Characterization of the effects produced by neurokinins and three agonists selective for neurokinin receptor subtypes in a spinal nociceptive reflex of the rat*. *Life Sci*, **42**, 1295-305.

LANGLOIS, X., WINTMOLDERS, C., TE RIELE, P., LEYSEN, J.E. & JURZAK, M. (2001). *Detailed distribution of Neurokinin 3 receptors in the rat, guinea pig and gerbil brain: a comparative autoradiographic study*. *Neuropharmacology*, **40**, 242-53.

LE FUR, G., GUILLOUX, F., KABOUCHE, M., MITRANI, N., FERRIS, O. & UZAN, A. (1981). *Central dopaminergic neurons during development of genetic and DOCA-salt hypertension in the rat*. *Brain Res*, **227**, 153-63.

LE NOVERE, N., ZOLI, M. & CHANGEUX, J.P. (1996). *Neuronal nicotinic receptor alpha 6 subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain*. Eur J Neurosci, **8**, 2428-39.

LEE, C.M., CAMPBELL, N.J., WILLIAMS, B.J. & IVERSEN, L.L. (1986). *Multiple tachykinin binding sites in peripheral tissues and in brain*. Eur J Pharmacol, **130**, 209-17.

LEGAULT, M., CONGAR, P., MICHEL, F.J. & TRUDEAU, L.E. (2002). *Presynaptic action of neurotensin on cultured ventral tegmental area dopaminergic neurones*. Neuroscience, **111**, 177-87.

LEJEUNE, F., GOBERT, A. & MILLAN, M.J. (2002). *The selective neurokinin (NK)(1) antagonist, GR205,171, stereospecifically enhances mesocortical dopaminergic transmission in the rat: a combined dialysis and electrophysiological study*. Brain Res, **935**, 134-9.

LE MOAL, M. & SIMON, H. (1991). *Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles*. Physiol Rev, **71**, 155-234.

LENARD, L. & KERTES, E. (2002). *Influence of passive avoidance learning by substance P in the basolateral amygdala*. Acta Biol Hung, **53**, 95-104.

LEONE, P., POCOCK, D. & WISE, R.A. (1991). *Morphine-dopamine interaction: ventral tegmental morphine increases nucleus accumbens dopamine release*. Pharmacol Biochem Behav, **39**, 469-72.

LESSARD, A., LAURIN, M., YAMAGUCHI, N. & COUTURE, R. (2004). *Central anti-hypertensive effect of tachykinin NK<sub>3</sub> receptor antagonists in rat*. Eur J Pharmacol, **486**, 75-83.

LESSARD, A., CAMPOS, M.M., NEUGEBAUER, W. & COUTURE, R. (2003). *Implication of nigral tachykinin NK3 receptors in the maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats: a pharmacologic and autoradiographic study*. Br J Pharmacol, **138**, 554-63.

LESSARD, A. & COUTURE, R. (2001). *Modulation of cardiac activity by tachykinins in the rat substantia nigra*. Br J Pharmacol, **134**, 1749-59.

LI, H., LEEMAN, S.E., SLACK, B.E., HAUSER, G., SALTSMAN, W.S., KRAUSE, J.E., BLUSZTAJN, J.K. & BOYD, N.D. (1997). *A substance P (neurokinin-1) receptor mutant carboxyl-terminally truncated to resemble a naturally occurring receptor isoform displays enhanced responsiveness and resistance to desensitization*. Proc Natl Acad Sci U S A, **94**, 9475-80.

LI, Y.H. & KU, Y.H. (2002). *Involvement of rat lateral septum-acetylcholine pressor system in central amygdaloid nucleus-emotional pressor circuit*. Neurosci Lett, **323**, 60-4.

LINDEN, D.R. & SEYBOLD, V.S. (1999). *Spinal neurokinin3 receptors mediate thermal but not mechanical hyperalgesia via nitric oxide*. Pain, **80**, 309-17.

LINDEN, D., DIEHL, R.R. & BERLIT, P. (1997). *Sympathetic cardiovascular dysfunction in long-standing idiopathic Parkinson's disease*. Clin Auton Res, **7**, 311-4.

LINDSAY, R.M. & HARMAR, A.J. (1989). *Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons*. Nature, **337**, 362-4.

LU, X.Y., GHASEMZADEH, M.B. & KALIVAS, P.W. (1999). *Regional distribution and cellular localization of gamma-aminobutyric acid subtype 1 receptor mRNA in the rat brain*. J Comp Neurol, **407**, 166-82.

LU, X.Y., GHASEMZADEH, M.B. & KALIVAS, P.W. (1998). *Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in the neurons projecting from the nucleus accumbens*. Neuroscience, **82**, 767-80.

MAGGI, C.A. (2000). *The troubled story of tachykinins and neurokinins*. Trends Pharmacol Sci, **21**, 173-5.

MAGGI, C.A. & SCHWARTZ, T.W. (1997). *The dual nature of the tachykinin NK1 receptor*. Trends Pharmacol Sci, **18**, 351-5.

MAGGI, C.A. (1995). *The mammalian tachykinin receptors*. Gen Pharmacol, **26**, 911-44.

MAGGI, C.A., ASTOLFI, M., GIULIANI, S., GOSO, C., MANZINI, S., MEINI, S., PATACCHINI, R., PAVONE, V., PEDONE, C., QUARTARA, L. & ET AL. (1994). *MEN 10,627, a novel polycyclic peptide antagonist of tachykinin NK2 receptors*. J Pharmacol Exp Ther, **271**, 1489-500.

MAGGIO, J.E. (1985). *"Kassinin" in mammals: the newest tachykinins*. Peptides, **6 Suppl 3**, 237-43.

MARCO, N., THIRION, A., MONS, G., BOUGAULT, I., LE FUR, G., SOUBRIE, P. & STEINBERG, R. (1998). *Activation of dopaminergic and cholinergic neurotransmission by tachykinin NK3 receptor stimulation: an in vivo microdialysis approach in guinea pig*. Neuropeptides, **32**, 481-8.

MARKSTEINER, J., SPERK, G. & KRAUSE, J.E. (1992). *Distribution of neurons expressing neurokinin B in the rat brain: immunohistochemistry and in situ hybridization*. J Comp Neurol, **317**, 341-56.

MARTIN, J.R. (1992). *Pressor response to posterior hypothalamic administration of carbachol is mediated by muscarinic M3 receptor*. Eur J Pharmacol, **215**, 83-91.

MARTNER, J. & BIBER, B. (1982). *Anaesthesia and cardiovascular regulation*. Acta Anaesthesiol Scand Suppl, **76**, 20-31.

MASON, G.S. & ELLIOTT, P.J. (1992). *Behavioural consequences following infusion of selective neurokinin agonists into the median raphe nucleus of the rat*. Neuropharmacology, **31**, 757-60.

MASSI, M., POLIDORI, C., PERFUMI, M., GENTILI, L. & DE CARO, G. (1991). *Tachykinin receptor subtypes involved in the central effects of tachykinins on water and salt intake*. Brain Res Bull, **26**, 155-60.

MASSI, M., GENTILI, L., PERFUMI, M., DE CARO, G. & SCHULKIN, J. (1990). *Inhibition of salt appetite in the rat following injection of tachykinins into the medial amygdala*. Brain Res, **513**, 1-7.

MASSI, M., POLIDORI, C., GENTILI, L., PERFUMI, M., DE CARO, G. & MAGGI, C.A. (1988). *The tachykinin NH<sub>2</sub>-senktide, a selective neurokinin B receptor agonist, is a very potent inhibitor of salt appetite in the rat*. Neurosci Lett, **92**, 341-6.

MATTHEWS, R.T. & GERMAN, D.C. (1984). *Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine*. Neuroscience, **11**, 617-25.

McKNIGHT, A. T., MAGUIRE, J. J., WILLIAMS, B. J., FOSTER, A. C., TRIDGETT, R. & IVERSEN, L. L. (1988). *Pharmacological specificity of synthetic peptide antagonists at tachykinin receptors*. Regul Pept, **22**, 127.

McRITCHIE, D.A., CARTWRIGHT, H.R. & HALLIDAY, G.M. (1997). *Specific A10 dopaminergic nuclei in the midbrain degenerate in Parkinson's disease*. Exp Neurol, **144**, 202-13.

MERCHENTHALER, I., MADERDRUT, J.L., O'HARTE, F. & CONLON, J.M. (1992). *Localization of neurokinin B in the central nervous system of the rat*. Peptides, **13**, 815-29.

MICHAUD, N. & COUTURE, R. (2003). *Cardiovascular and behavioural effects induced by naloxone-precipitated morphine withdrawal in rat: characterization with tachykinin antagonists*. Neuropeptides, **article in press**.

MINAMINO, N., KANGAWA, K., FUKUDA, A. & MATSUO, H. (1984). *Neuromedin L: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord*. Neuropeptides, **4**, 157-66.

MITSUHASHI, M., OHASHI, Y., SHICHIJO, S., CHRISTIAN, C., SUDDUTH-KLINGER, J., HARROWE, G. & PAYAN, D.G. (1992). *Multiple intracellular signaling pathways of the neuropeptide substance P receptor*. J Neurosci Res, **32**, 437-43.

MOORE, A.E., CICHETTI, F., HENNEN, J. & ISACSON, O. (2001). *Parkinsonian motor deficits are reflected by proportional A9/A10 dopamine neuron degeneration in the rat*. Exp Neurol, **172**, 363-76.

MURTRA, P., SHEASBY, A.M., HUNT, S.P. & DE FELIPE, C. (2000). *Rewarding effects of opiates are absent in mice lacking the receptor for substance P*. Nature, **405**, 180-3.

MUSSAP, C.J., GERAGHTY, D.P. & BURCHER, E. (1993). *Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective*. J Neurochem, **60**, 1987-2009.

NAGASHIMA, A., TAKANO, Y., TATEISHI, K., MATSUOKA, Y., HAMAOKA, T. & KAMIYA, H. (1989). *Central pressor actions of neurokinin B: increases in neurokinin B contents in discrete nuclei in spontaneously hypertensive rats*. Brain Res, **499**, 198-203.

NAKAJIMA, Y., TSUCHIDA, K., NEGISHI, M., ITO, S. & NAKANISHI, S. (1992). *Direct linkage of three tachykinin receptors to stimulation of both phosphatidylinositol hydrolysis and cyclic AMP cascades in transfected Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, **267**, 2437-42.

NAKAJIMA, Y., NAKAJIMA, S. & INOUE, M. (1988). *Pertussis toxin-insensitive G protein mediates substance P-induced inhibition of potassium channels in brain neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, **85**, 3643-7.

NAKAMURA, T. & HAYASHIDA, Y. (1990). *Cardiovascular responses to some stressors in conscious rats*. Kurume Med J, **37 Suppl**, S117-22.

NAU, R., SCHAFER, G., DEACON, C.F., COLE, T., AGOSTON, D.V. & CONLON, J.M. (1986). *Proteolytic inactivation of substance P and neurokinin A in the longitudinal muscle layer of guinea pig small intestine*. J Neurochem, **47**, 856-64.

NAWA, H., KOTANI, H. & NAKANISHI, S. (1984). *Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing*. Nature, **312**, 729-34.

NAWA, H., HIROSE, T., TAKASHIMA, H., INAYAMA, S. & NAKANISHI, S. (1983). *Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor*. *Nature*, **306**, 32-6.

NICOLAU, M., SIROIS, M.G., BUI, M., PLANTE, G.E., SIROIS, P. & REGOLI, D. (1993). *Plasma extravasation induced by neurokinins in conscious rats: receptor characterization with agonists and antagonists*. *Can J Physiol Pharmacol*, **71**, 217-21.

NIMMO, A.J., CARSTAIRS, J.R., MAGGI, C.A., MORRISON, J.F.B. (1992). *Evidence for the co-existence of multiple NK-2 tachykinin receptor subtypes in rat bladder*. *Neuropeptides*, **22**, 48.

NOGUCHI, K., MORITA, Y., KIYAMA, H., ONO, K. & TOHYAMA, M. (1988). *A noxious stimulus induces the preprotachykinin-A gene expression in the rat dorsal root ganglion: a quantitative study using in situ hybridization histochemistry*. *Brain Res*, **464**, 31-5.

OADES, R.D. & HALLIDAY, G.M. (1987). *Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity*. *Brain Res*, **434**, 117-65.

OAKMAN, S. A., FARIS, P. L., KERR, P.E., COZZARI, C., & HARTMAN, B. K. (1995) *Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area*. *J Neurosci.*, **15**, 5859-69.

O'BRIEN, D.P. & WHITE, F.J. (1987). *Inhibition of non-dopamine cells in the ventral tegmental area by benzodiazepines: relationship to A10 dopamine cell activity*. *Eur J Pharmacol*, **142**, 343-54.

OH, E.J., GOVER, T.D., CORDOBA-RODRIGUEZ, R. & WEINREICH, D. (2003). *Substance P evokes cation currents through TRP channels in HEK293 cells.* J Neurophysiol, **90**, 2069-73.

OHKUBO, H. & NAKANISHI, S. (1991). *Molecular characterization of the three tachykinin receptors.* Ann N Y Acad Sci, **632**, 53-62.

OTSUKA, M. & YOSHIOKA, K. (1993). *Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins.* Physiol Rev, **73**, 229-308.

OVERTON, P., ELLIOTT, P.J., HAGAN, R.M. & CLARK, D. (1992). *Neurokinin agonists differentially affect A9 and A10 dopamine cells in the rat.* Eur J Pharmacol, **213**, 165-6.

OWENS, N.C., SARTOR, D.M. & VERBERNE, A.J. (1999). *Medial prefrontal cortex depressor response: role of the solitary tract nucleus in the rat.* Neuroscience, **89**, 1331-46.

PAGE, N.M. & BELL, N.J. (2002). *The human tachykinin NK1 (short form) and tachykinin NK4 receptor: a reappraisal.* Eur J Pharmacol, **437**, 27-30.

PATACCHINI, R., BARTHO, L., HOLZER, P. & MAGGI, C.A. (1995). *Activity of SR 142801 at peripheral tachykinin receptors.* Eur J Pharmacol, **278**, 17-25.

PATACCHINI, R. & MAGGI, C.A. (1995). *Tachykinin receptors and receptor subtypes.* Arch Int Pharmacodyn Ther, **329**, 161-84.

PAXINOS, G., WATSON, C., THE RAT BRAIN IN STEREOTAXIC COORDINATES & NEW YORK: ACADEMIC PRESS, S.B., 1998.

PERFUMI, M., POLIDORI, C., MASSI, M. & DE CARO, G. (1988). *Neurokinin A selectively inhibits water intake in the rat*. *Neuropharmacology*, **27**, 909-14.

PETITET, F., BEAUJOUAN, J.C., SAFFROY, M., TORRENS, Y. & GLOWINSKI, J. (1993). *The nonpeptide NK-2 antagonist SR 48968 is also a NK-3 antagonist in the guinea but not in the rat*. *Biochem Biophys Res Commun*, **191**, 180-7.

PHILLIPSON, O.T. (1979). *Afferent projections to the ventral tegmental area of Tsai and interfascicular nucleus: a horseradish peroxidase study in the rat*. *J Comp Neurol*, **187**, 117-43.

PICARD, P., REGOLI, D. & COUTURE, R. (1994). *Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered tachykinins in the rat: characterization of receptors with selective antagonists*. *Br J Pharmacol*, **112**, 240-9.

PICARD, P., BOUCHER, S., REGOLI, D., GITTER, B.D., HOWBERT, J.J. & COUTURE, R. (1993). *Use of non-peptide tachykinin receptor antagonists to substantiate the involvement of NK1 and NK2 receptors in a spinal nociceptive reflex in the rat*. *Eur J Pharmacol*, **232**, 255-61.

PICKEL, V.M., CHAN, J. & NIRENBERG, M.J. (2002). *Region-specific targeting of dopamine D2-receptors and somatodendritic vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) within ventral tegmental area subdivisions*. *Synapse*, **45**, 113-24.

POLIDORI, C., STAFFINATI, G., PERFUMI, M.C., DE CARO, G. & MASSI, M. (1995). *Neuropeptide gamma: a mammalian tachykinin endowed with potent antidipsogenic action in rats*. *Physiol Behav*, **58**, 595-602.

POLIDORI, C., SAIJA, A., PERFUMI, M., COSTA, G., DE CARO, G. & MASSI, M. (1989). *Vasopressin release induced by intracranial injection of tachykinins is due to activation of central neurokinin-3 receptors*. *Neurosci Lett*, **103**, 320-5.

POMPEI, P., TAYEBATY, S.J., DE CARO, G., SCHULKIN, J. & MASSI, M. (1991). *Bed nucleus of the stria terminalis: site for the antinatriorexig action of tachykinins in the rat*. *Pharmacol Biochem Behav*, **40**, 977-81.

PRADIER, L., MENAGER, J., LE GUERN, J., BOCK, M.D., HEUILLET, E., FARDIN, V., GARRET, C., DOBLE, A. & MAYAUX, J.F. (1994). *Septide: an agonist for the NK1 receptor acting at a site distinct from substance P*. *Mol Pharmacol*, **45**, 287-93.

PURSIAINEN, V., HAAPANIEMI, T.H., KORPELAINEN, J.T., HUIKURI, H.V., SOTANIEMI, K.A. & MYLLYLA, V.V. (2002). *Circadian heart rate variability in Parkinson's disease*. *J Neurol*, **249**, 1535-40.

QUARTARA, L. & MAGGI, C.A. (1997). *The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation*. *Neuropeptides*, **31**, 537-63.

RANALDI, R. & WISE, R.A. (2001). *Blockade of D1 dopamine receptors in the ventral tegmental area decreases cocaine reward: possible role for dendritically released dopamine*. *J Neurosci*, **21**, 5841-6.

REGOLI, D., BOUDON, A. & FAUCHERE, J.L. (1994). *Receptors and antagonists for substance P and related peptides*. *Pharmacol Rev*, **46**, 551-99.

REGOLI, D., DRAPEAU, G., DION, S. & COUTURE, R. (1988). *New selective agonists for neurokinin receptors: pharmacological tools for receptor characterization*. *Trends Pharmacol Sci*, **9**, 290-5.

RODRIGUEZ, J.J., DOHERTY, M.D. & PICKEL, V.M. (2000). *N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the ventral tegmental area: subcellular distribution and colocalization with 5-hydroxytryptamine(2A) receptors*. *J Neurosci Res*, **60**, 202-11.

ROSEN, A., BRODIN, K., ENEROTH, P. & BRODIN, E. (1992). *Short-term restraint stress and s.c. saline injection alter the tissue levels of substance P and cholecystokinin in the peri-aqueductal grey and limbic regions of rat brain.* Acta Physiol Scand, **146**, 341-8.

ROSSETTI, Z.L., HMAIDAN, Y. & GESSA, G.L. (1992). *Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats.* Eur J Pharmacol, **221**, 227-34.

ROUISSI, N., NANTEL, F., DRAPEAU, G., RHALEB, N.E., DION, S. & REGOLI, D. (1990). *Inhibitors of peptidases: how they influence the biological activities of substance P, neurokinins, kinins and angiotensins in isolated vessels.* Pharmacology, **40**, 185-95.

ROVERO, P., PESTELLINI, V., PATACCHINI, R., GIULIANI, S., SANTICIOLI, P., MAGGI, C.A., MELI, A. & GIACHETTI, A. (1989). *A potent and selective agonist for NK-2 tachykinin receptor.* Peptides, **10**, 593-5.

RUPNIAK, N.M., BOYCE, S., WILLIAMS, A.R., COOK, G., LONGMORE, J., SEABROOK, G.R., CAESER, M., IVERSEN, S.D. & HILL, R.G. (1993). *Antinociceptive activity of NK1 receptor antagonists: non-specific effects of racemic RP67580.* Br J Pharmacol, **110**, 1607-13.

SAKATA, M., SEI, H., TOIDA, K., FUJIHARA, H., URUSHIHARA, R. & MORITA, Y. (2002). *Mesolimbic dopaminergic system is involved in diurnal blood pressure regulation.* Brain Res, **928**, 194-201.

SAKURADA, T., TAN-NO, K., YAMADA, T., SAKURADA, S. & KISARA, K. (1990). *Phosphoramidon potentiates mammalian tachykinin-induced biting, licking and scratching behaviour in mice.* Pharmacol Biochem Behav, **37**, 779-83.

SALES, N., MARTRES, M.P., BOUTHENET, M.L. & SCHWARTZ, J.C. (1989). *Ontogeny of dopaminergic D-2 receptors in the rat nervous system: characterization and detailed autoradiographic mapping with [125I]iodosulpride*. *Neuroscience*, **28**, 673-700.

SAPER, C.B. (1995). *Central autonomic system*. In *The Rat Nervous System* Second Edition. ed Paxinos, G. pp. 107-135.

SARAU, H.M., GRISWOLD, D.E., BUSH, B., POTTS, W., SANDHU, P., LUNDBERG, D., FOLEY, J.J., SCHMIDT, D.B., WEBB, E.F., MARTIN, L.D., LEGOS, J.J., WHITMORE, R.G., BARONE, F.C., MEDHURST, A.D., LUTTMANN, M.A., GIARDINA, G.A. & HAY, D.W. (2000). *Nonpeptide tachykinin receptor antagonists. II. Pharmacological and pharmacokinetic profile of SB-222200, a central nervous system penetrant, potent and selective NK-3 receptor antagonist*. *J Pharmacol Exp Ther*, **295**, 373-81.

SARAU, H.M., MOONEY, J.L., SCHMIDT, D.B., FOLEY, J.J., BUCKLEY, P.T., GIARDINA, G.A., WANG, D.Y., LEE, J.A. & HAY, D.W. (2000). *Evidence that the proposed novel human "neurokinin-4" receptor is pharmacologically similar to the human neurokinin-3 receptor but is not of human origin*. *Mol Pharmacol*, **58**, 552-9.

SAROSI, G.A., JR., KIMBALL, B.C., BARNHART, D.C., ZHANG, W. & MULHOLLAND, M.W. (1998). *Tachykinin neuropeptide-evoked intracellular calcium transients in cultured guinea pig myenteric neurons*. *Peptides*, **19**, 75-84.

SASAKAWA, N., SHARIF, M. & HANLEY, M.R. (1994). *Attenuation of agonist-induced desensitization of the rat substance P receptor by progressive truncation of the C-terminus*. *FEBS Lett*, **347**, 181-4.

SCHEUCHER, A., ALVAREZ, A.L., TORRES, N., DABSYS, S.M., FINKIELMAN, S., NAHMOD, V.E. & PIROLA, C.J. (1991). *Cholinergic hyperactivity in the lateral septal area of spontaneously hypertensive rats: depressor effect of hemicholinium-3 and pirenzepine*. *Neuropharmacology*, **30**, 391-7.

SEABROOK, G.R., BOWERY, B.J. & HILL, R.G. (1995). *Pharmacology of tachykinin receptors on neurones in the ventral tegmental area of rat brain slices*. *Eur J Pharmacol*, **273**, 113-9.

SEI, H., IKEMOTO, K., ARAI, R. & MORITA, Y. (1999). *Injection of 6-hydroxydopamine into the ventral tegmental area suppresses the increase in arterial pressure during REM sleep in the rat*. *Sleep Res Online*, **2**, 1-6.

SEROOGY, K., CECCATELLI, S., SCHALLING, M., HOKFELT, T., FREY, P., WALSH, J., DOCKRAY, G., BROWN, J., BUCHAN, A. & GOLDSTEIN, M. (1988). *A subpopulation of dopaminergic neurons in rat ventral mesencephalon contains both neurotensin and cholecystokinin*. *Brain Res*, **455**, 88-98.

SEROOGY, K.B., MEHTA, A. & FALLON, J.H. (1987). *Neurotensin and cholecystokinin coexistence within neurons of the ventral mesencephalon: projections to forebrain*. *Exp Brain Res*, **68**, 277-89.

SESACK, S.R. & PICKEL, V.M. (1992a). *Dual ultrastructural localization of enkephalin and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the rat ventral tegmental area: multiple substrates for opiate-dopamine interactions*. *J Neurosci*, **12**, 1335-50.

SESACK, S.R. & PICKEL, V.M. (1992b). *Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area*. *J Comp Neurol*, **320**, 145-60.

SEVERINI, C., IMPROTA, G., FALCONIERI-ERSPAMER, G., SALVADORI, S. & ERSPAMER, V. (2002). *The tachykinin peptide family*. *Pharmacol Rev*, **54**, 285-322.

SEYBOLD, V.S., GRKOVIC, I., PORTBURY, A.L., DING, Y.Q., SHIGEMOTO, R., MIZUNO, N., FURNESS, J.B. & SOUTHWELL, B.R. (1997). *Relationship of NK3 receptor-immunoreactivity to subpopulations of neurons in rat spinal cord*. *J Comp Neurol*, **381**, 439-48.

SHEN, R.Y. (2003). *Ethanol withdrawal reduces the number of spontaneously active ventral tegmental area dopamine neurons in conscious animals*. *J Pharmacol Exp Ther*, **307**, 566-72.

SHEN, S., ZHU, S.M. & YUAN, X.R. (1993). *Role of nucleus accumbens in cardiovascular activities and its relationship with opioid peptides in rats*. *Sheng Li Xue Bao*, **45**, 375-81.

SHIGEMOTO, R., YOKOTA, Y., TSUCHIDA, K. & NAKANISHI, S. (1990). *Cloning and expression of a rat neuromedin K receptor cDNA*. *J Biol Chem*, **265**, 623-8.

SHORE, S.A. & DRAZEN, J.M. (1989). *Degradative enzymes modulate airway responses to intravenous neurokinins A and B*. *J Appl Physiol*, **67**, 2504-11.

SIEGEL, R.A., DUKER, E.M., PAHNKE, U. & WUTTKE, W. (1987). *Stress-induced changes in cholecystokinin and substance P concentrations in discrete regions of the rat hypothalamus*. *Neuroendocrinology*, **46**, 75-81.

SIVAM, S.P. (1991). *Dopamine dependent decrease in enkephalin and substance P levels in basal ganglia regions of postmortem parkinsonian brains*. *Neuropeptides*, **18**, 201-7.

SMITH, M.E. & FLYNN, F.W. (2000). *Distribution of Fos-like immunoreactivity within the rat brain following intraventricular injection of the selective NK(3) receptor agonist senktide*. J Comp Neurol, **426**, 413-28.

SMITH, Y., CHARARA, A. & PARENT, A. (1996). *Synaptic innervation of midbrain dopaminergic neurons by glutamate-enriched terminals in the squirrel monkey*. J Comp Neurol, **364**, 231-53.

SNIDER, R.M., CONSTANTINE, J.W., LOWE, J.A., 3RD, LONGO, K.P., LABEL, W.S., WOODY, H.A., DROZDA, S.E., DESAI, M.C., VINICK, F.J., SPENCER, R.W. & ET AL. (1991). *A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK1) receptor*. Science, **251**, 435-7.

STEFFENSEN, S.C., SVINGOS, A.L., PICKEL, V.M. & HENRIKSEN, S.J. (1998). *Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area*. J Neurosci, **18**, 8003-15.

STEWART, J.M., HALL, M.E., HARKINS, J., FREDERICKSON, R.C., TERENIUS, L., HOKFELT, T. & KRIVOVY, W.A. (1982). *A fragment of substance P with specific central activity: SP(1-7)*. Peptides, **3**, 851-7.

STOESSL, A.J. (1994). *Localization of striatal and nigral tachykinin receptors in the rat*. Brain Res, **646**, 13-8.

STOESSL, A.J., SZCZUTKOWSKI, E., GLENN, B. & WATSON, I. (1991). *Behavioural effects of selective tachykinin agonists in midbrain dopamine regions*. Brain Res, **565**, 254-62.

STOESSL, A.J., DOURISH, C.T. & IVERSEN, S.D. (1990). *Pharmacological characterization of the behavioural syndrome induced by the NK-3 tachykinin*

*agonist senktide in rodents: evidence for mediation by endogenous 5-HT.* Brain Res, **517**, 111-6.

STOESSL, A.J., DOURISH, C.T. & IVERSEN, S.D. (1988). *The NK-3 tachykinin receptor agonist senktide elicits 5-HT-mediated behaviour following central or peripheral administration in mice and rats.* Br J Pharmacol, **94**, 285-7.

SUN, X.P., SUPPLISSON, S. & MAYER, E. (1993). *Chloride channels in myocytes from rabbit colon are regulated by a pertussis toxin-sensitive G protein.* Am J Physiol, **264**, G774-85.

SVENSSON, T.H., MATHE, J.M., ANDERSSON, J.L., NOMIKOS, G.G., HILDEBRAND, B.E. & MARCUS, M. (1995). *Mode of action of atypical neuroleptics in relation to the phencyclidine model of schizophrenia: role of 5-HT<sub>2</sub> receptor and alpha 1-adrenoceptor antagonism.* J Clin Psychopharmacol, **15**, 11S-18S.

SWANSON, C.J. & KALIVAS, P.W. (2000). *Regulation of locomotor activity by metabotropic glutamate receptors in the nucleus accumbens and ventral tegmental area.* J Pharmacol Exp Ther, **292**, 406-14.

SWANSON, L.W. (1982). *The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat.* Brain Res Bull, **9**, 321-53.

SZIGETHY, E. & BEAUDET, A. (1989). *Correspondence between high affinity <sup>125</sup>I-neurotensin binding sites and dopaminergic neurons in the rat substantia nigra and ventral tegmental area: a combined radioautographic and immunohistochemical light microscopic study.* J Comp Neurol, **279**, 128-37.

TAKANO, Y., NAGASHIMA, A., HAGIO, T., TATEISHI, K. & KAMIYA, H. (1990). *Role of central tachykinin peptides in cardiovascular regulation in rats*. Brain Res, **528**, 231-7.

TAKANO, Y., TAKEDA, Y., YAMADA, K. & KAMIYA, H. (1985). *Substance K, a novel tachykinin injected bilaterally into the ventral tegmental area of rats increases behavioral response*. Life Sci, **37**, 2507-14.

TAKAYAMA, H., OTA, Z. & OGAWA, N. (1986). *Effect of immobilization stress on neuropeptides and their receptors in rat central nervous system*. Regul Pept, **15**, 239-48.

TAMIYA, R., HANADA, M., KAWAI, Y., INAGAKI, S. & TAKAGI, H. (1990). *Substance P afferents have synaptic contacts with dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the rat*. Neurosci Lett, **110**, 11-5.

TATEISHI, K., KISHIMOTO, S., KOBAYASHI, H., KOBUKE, K. & MATSUOKA, Y. (1990). *Distribution and localization of neurokinin A-like immunoreactivity and neurokinin B-like immunoreactivity in rat peripheral tissue*. Regul Pept, **30**, 193-200.

TATEMOTO, K., LUNDBERG, J.M., JORNVALL, H. & MUTT, V. (1985). *Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin*. Biochem Biophys Res Commun, **128**, 947-53.

TOMAZ, C. & NOGUEIRA, P.J. (1997). *Facilitation of memory by peripheral administration of substance P*. Behav Brain Res, **83**, 143-5.

TOO, H.P., CORDOVA, J.L. & MAGGIO, J.E. (1989). *A novel radioimmunoassay for neuromedin K. I. Absence of neuromedin K-like immunoreactivity in*

guinea pig ileum and urinary bladder. II. Heterogeneity of tachykinins in guinea pig tissues. *Regul Pept*, **26**, 93-105.

TORRENS, Y., BEAUJOUAN, J.C., SAFFROY, M. & GLOWINSKI, J. (2000). *Further evidence for the presence of "septide-sensitive" tachykinin binding sites in tissues possessing solely NK(1) tachykinin receptors*. *Biochem Biophys Res Commun*, **270**, 668-72.

TORRENS, Y., SAFFROY, M., GLOWINSKI, J. & BEAUJOUAN, J.C. (1997). *Substance P(6-11) and natural tachykinins interact with septide-sensitive tachykinin receptors coupled to a phospholipase C in the rat urinary bladder*. *Neuropeptides*, **31**, 243-51.

TSCHÖPE, C., PICARD, P., CULMANN, J., PRAT, A., ITOI, K., REGOLI, D., UNGER, T. & COUTURE, R. (1992). *Use of selective antagonists to dissociate the central cardiovascular and behavioural effects of tachykinins on NK1 and NK2 receptors in the rat*. *Br J Pharmacol*, **107**, 750-5.

TURGUT, M. (1998). *Asymmetry of sympathetic activity in a rat model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine: haemodynamic, electrocardiographic and biochemical changes*. *Res Exp Med (Berl)*, **197**, 281-92.

TURKKA, J.T., TOLONEN, U. & MYLLYLÄ, V.V. (1987). *Cardiovascular reflexes in Parkinson's disease*. *Eur Neurol*, **26**, 104-12.

UGEDO, L., GRENHOFF, J. & SVENSSON, T.H. (1989). *Ritanserin, a 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist, activates midbrain dopamine neurons by blocking serotonergic inhibition*. *Psychopharmacology (Berl)*, **98**, 45-50.

UNGER, T., CAROLUS, S., DEMMERT, G., GANTEN, D., LANG, R.E., MASER-GLUTH, C., STEINBERG, H. & VEELKEN, R. (1988). *Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization.* *Circ Res*, **63**, 812-20.

UNGER, T., RASCHER, W., SCHUSTER, C., PAVLOVITCH, R., SCHOMIG, A., DIETZ, R. & GANTEN, D. (1981). *Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II: role of the sympathetic nervous system and vasopressin.* *Eur J Pharmacol*, **71**, 33-42.

VAN BOCKSTAELE, E.J. & PICKEL, V.M. (1995). *GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain.* *Brain Res*, **682**, 215-21.

VAN BOCKSTAELE, E.J., CESTARI, D.M. & PICKEL, V.M. (1994). *Synaptic structure and connectivity of serotonin terminals in the ventral tegmental area: potential sites for modulation of mesolimbic dopamine neurons.* *Brain Res*, **647**, 307-22.

VAN DEN BUUSE, M. (1998). Role of the mesolimbic dopamine system in cardiovascular homeostasis. Stimulation of the ventral tegmental area modulates the effect of vasopressin on blood pressure in conscious rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **25**, 661-8.

VAN DEN BUUSE, M., VERSTEEQ, D.H. & DE JONG, W. (1986). *Brain noradrenaline and the development of hypertension: the effect of treatment with central 6-hydroxydopamine or DSP-4.* *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **13**, 469-76.

VAN DER KOOY, D., KODA, L.Y., MCGINTY, J.F., GERFEN, C.R. & BLOOM, F.E. (1984). *The organization of projections from the cortex, amygdala, and*

*hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat.* J Comp Neurol, **224**, 1-24.

VAN DIJK, J.G., HAAN, J., ZWINDERMAN, K., KREMER, B., VAN HILTEN, B.J. & ROOS, R.A. (1993). *Autonomic nervous system dysfunction in Parkinson's disease: relationships with age, medication, duration, and severity.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, **56**, 1090-5.

VAN DOMBURG, P.H. & TEN DONKELAAR, H.J. (1991). *The human substantia nigra and ventral tegmental area. A neuroanatomical study with notes on aging and aging diseases.* Adv Anat Embryol Cell Biol, **121**, 1-132.

VAUGHAN, C.E., VAN DEN BUUSE, M. & ROLAND, B.L. (1999). *Brain dopamine D2 receptor mRNA levels are elevated in young spontaneously hypertensive rats.* Neurosci Res, **34**, 199-205.

VERBERNE, A.J. (1996). *Medullary sympathoexcitatory neurons are inhibited by activation of the medial prefrontal cortex in the rat.* Am J Physiol, **270**, R713-9.

VINCENT, S.R., SATOH, K., ARMSTRONG, D.M., PANULA, P., VALE, W. & FIBIGER, H.C. (1986). *Neuropeptides and NADPH-diaphorase activity in the ascending cholinergic reticular system of the rat.* Neuroscience, **17**, 167-82.

VON EULER, U.S. & GADDUM, J.H. (1931) *An unidentified depressor substance in certain tissue extracts.* Journal of Physiology, **72**, 74-87.

WALLACE, D.M., MAGNUSON, D.J. & GRAY, T.S. (1992). *Organization of amygdaloid projections to brainstem dopaminergic, noradrenergic, and adrenergic cell groups in the rat.* Brain Res Bull, **28**, 447-54.

WALLING, M.W., BRASITUS, T.A. & KIMBERG, D.V. (1977). *Effects of calcitonin and substance P on the transport of Ca, Na and Cl across rat ileum in vitro*. *Gastroenterology*, **73**, 89-94.

WANG, L.H., AHMAD, S., BENTER, I.F., CHOW, A., MIZUTANI, S. & WARD, P.E. (1991). *Differential processing of substance P and neurokinin A by plasma dipeptidyl(amino)peptidase IV, aminopeptidase M and angiotensin converting enzyme*. *Peptides*, **12**, 1357-64.

WANG, Z.Y. & HAKANSON, R. (1992). *(+/-)-CP-96,345, a selective tachykinin NK1 receptor antagonist, has non-specific actions on neurotransmission*. *Br J Pharmacol*, **107**, 762-5.

WARDEN, M.K. & YOUNG, W.S., 3RD (1988). *Distribution of cells containing mRNAs encoding substance P and neurokinin B in the rat central nervous system*. *J Comp Neurol*, **272**, 90-113.

WHITTY, C.J., WALKER, P.D., GOEBEL, D.J., POOSCH, M.S. & BANNON, M.J. (1995). *Quantitation, cellular localization and regulation of neurokinin receptor gene expression within the rat substantia nigra*. *Neuroscience*, **64**, 419-25.

WISE, R.A. (1996). *Neurobiology of addiction*. *Curr Opin Neurobiol*, **6**, 243-51.

WORMSER, U., LAUFER, R., HART, Y., CHOREV, M., GILON, C. & SELINGER, Z. (1986). *Highly selective agonists for substance P receptor subtypes*. *Embo J*, **5**, 2805-8.

WU, J.S., KU, Y.H., LI, L.S., LU, Y.C., DING, X. & WANG, Y.G. (1999). *Corticotropin releasing factor and substance P mediate the nucleus amygdaloideus centralis-nucleus ventromedialis-nucleus dorsomedialis pressor system*. *Brain Res*, **842**, 392-8.

XIE, G.X., MIYAJIMA, A. & GOLDSTEIN, A. (1992). *Expression cloning of cDNA encoding a seven-helix receptor from human placenta with affinity for opioid ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, **89**, 4124-8.

YAMADA, T., ENDOH, T. & SUZUKI, T. (1999). *Inhibition of calcium channels by neurokinin receptor and signal transduction in hamster submandibular ganglion cells*. J Auton Nerv Syst, **76**, 1-8.

ZERARI, F., KARPITSKIY, V., KRAUSE, J., DESCARRIES, L. & COUTURE, R. (1998). *Astroglial distribution of neurokinin-2 receptor immunoreactivity in the rat spinal cord*. Neuroscience, **84**, 1233-46.

ZHENG, F. & JOHNSON, S.W. (2003). *Dual modulation of gabaergic transmission by metabotropic glutamate receptors in rat ventral tegmental area*. Neuroscience, **119**, 453-60.