

Université de Montréal

**ÉTUDE DU MÉCANISME DE FACILITATION DE LA LIBÉRATION
DE DOPAMINE PAR LA NEUROTENSINE**

Par

Charbel Simon Fawaz

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 Sciences neurologiques

Novembre, 2005

© Charbel Simon Fawaz, 2005



W

4

U58

2006

V. 064

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 DU MÉCANISME DE FACILITATION DE LA LIBÉRATION DE
DOPAMINE PAR LA NEUROTENSINE**

Présenté par :
Charbel Simon Fawaz

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Laurent Descarries
Président-rapporteur

Dr Louis-Éric Trudeau
Directeur de recherche

Dr Pierre-Paul Rompré
Membre du jury

RÉSUMÉ

La neurotensine (NT) est un peptide de 13 a.a. retrouvé dans le système nerveux central (SNC) et le tractus digestif. Dans le SNC, la NT est associée à diverses maladies impliquant le système dopaminergique telles que la schizophrénie. En effet, la NT joue un rôle de neuromodulateur dans les voies dopaminergiques nigrostriée et mésolimbique en facilitant la libération de dopamine (DA). Cette facilitation de la libération de DA par la NT se produit par un mécanisme cellulaire et moléculaire en grande partie inconnu. Nous avons donc approfondi nos connaissances de ce mécanisme en testant l'hypothèse que la facilitation de la libération de DA par la NT dans le noyau accumbens (NAcc) passe principalement par une inhibition de la fonction des autorécepteurs DAergiques de type D₂. Nous avons utilisé une approche de voltamétrie cyclique par fibre de carbone afin de mesurer en temps réel la libération axonale de DA dans des tranches de NAcc isolées de cerveaux de rats. La libération de DA a été évoquée par de courtes stimulations électriques (stimulus unique et salve de stimuli) à l'aide d'une électrode bipolaire. Tout d'abord, nous avons déterminé les caractéristiques pharmacologiques des autorécepteurs avec des agonistes et antagonistes sélectifs des récepteurs de la DA. Ensuite, nous avons vérifié l'effet de la stimulation des récepteurs de la NT par l'agoniste NT (8-13), le fragment actif de la NT, et constaté que la NT (8-13) induit une facilitation de la libération de DA. Finalement, nous avons démontré que le blocage des récepteurs D₂ par le sulpiride inhibe la facilitation de la libération de DA générée par la NT. Dans l'ensemble, nos résultats sont compatibles avec l'idée que la NT inhibe la fonction des autorécepteurs DAergiques des terminaisons de la voie mésolimbique, favorisant ainsi la libération de DA.

Mots-clés : neurotensine, dopamine, terminaison synaptique, voltamétrie cyclique, noyau accumbens, tranche de cerveau

ABSTRACT

Neurotensin (NT) is a 13 amino acid peptide located in the central nervous system (CNS) and the digestive tract. In the CNS, NT has been proposed to be implicated in the physiopathology of various diseases closely related to the dopaminergic system such as schizophrenia. Indeed, NT acts as a neuromodulator within the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways, by facilitating dopamine (DA) release. The cellular and molecular mechanism underlying this facilitation of DA release by NT remains elusive. Thus, we looked further into this mechanism and propose that the facilitation of DA release by NT depends in large part on inhibition of the function of presynaptic DA D₂ autoreceptors. We used fast-cyclic voltammetry in order to measure in real time the synaptic release of DA in nucleus accumbens slices isolated from rat brain. DA release was evoked by short electrical stimulations (single-pulse stimulus and train-pulse stimuli), using a bipolar electrode. First, we determined the pharmacological characteristics of the D₂ autoreceptors with selective agonists and antagonists of these receptors. Second, we studied the effect of the stimulation of NT receptors by NT (8-13), the active fragment of NT, and showed that NT (8-13) acts at the terminal level to enhance DA release. Finally, we demonstrated that blockade of D₂ autoreceptors by the antagonist sulpiride inhibits the facilitation of DA release generated by NT. Taken together, our data are compatible with the view that NT acts at the terminal level in the mesolimbic dopaminergic pathway by inhibiting the function of DA autoreceptors, thus disinhibiting DA release.

Keywords : neurotensin, dopamine, axon terminal, fast-cyclic voltammetry, nucleus accumbens, brain slice

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements	xi
Avant-propos.....	xiii
INTRODUCTION.....	1
1. Système neurotensinergique.....	8
1.1 Métabolisme de la neurotensine	8
1.2 Caractéristiques des récepteurs de la NT (NTR ₁ , NTR ₂ et NTR ₃).....	9
1.3 Mécanismes d'action de la NT	17
1.3.1 Modulation par la NT des voies de signalisation intracellulaires.....	17
1.3.2 Internalisation du complexe NT – NTR.....	20
2. Système dopaminergique.....	22
2.1 Métabolisme de la dopamine.....	22
2.2 Principales voies dopaminergiques.....	25
2.3 Récepteurs dopaminergiques.....	27
2.4 Récepteur dopaminergique D ₂	28

3. Interactions neurotensine – dopamine	31
3.1 Système neurotensinergique et schizophrénie.....	31
3.1.1 La schizophrénie.....	31
3.1.2 NT et schizophrénie	33
3.2 Système neurotensinergique et antipsychotiques	35
3.2.1 Les antipsychotiques.....	35
3.2.1.1 Distinction entre antipsychotiques typiques et atypiques	37
3.2.1.2 Effets secondaires des antipsychotiques	40
3.2.2 NT et antipsychotiques.....	43
3.3 Système NTergique et autorécepteur DAergique D ₂	48
4. Objectifs de l'étude	52
ARTICLE.....	53
Accord des coauteurs	54
Page titre.....	55
Acknowledgments.....	55
Abstract	56
Introduction.....	57
Materials and Methods.....	59
Results	64
Discussion.....	69
References	73
Figures legends	80

DISCUSSION	89
5. La voltamétrie cyclique.....	90
5.1 Fabrication des électrodes de fibre de carbone.....	94
5.2 Test des électrodes de fibre de carbone	96
6. Préparation des tranches de cerveau	98
7. Montage expérimental	100
8. Perspectives.....	103
8.1 Mécanismes de la régulation des autorécepteurs D ₂ par la NT.....	103
8.2 Implications thérapeutiques de la NT	104
9. Conclusion.....	107
BIBLIOGRAPHIE.....	109

LISTE DES TABLEAUX**Tableau I :**

Caractéristiques des récepteurs neurotensinergiques NTR ₁ et NTR ₂	15
--	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Récepteurs neurotensinergiques NTR ₁ et NTR ₂ du rat	10
Figure 2 : Voies dopaminergiques mésocorticolimbique (A) et nigrostriée (B).....	25
Figure 3 : Principe de la voltamétrie cyclique	91
Figure 4 : Réponse de l'électrode avec fibre de carbone à différentes [DA].....	96
Figure 5 : Représentation schématique d'une tranche de noyau accumbens en coupe coronale.....	100

Figures de l'article

Figure 1 : Time course of evoked DA overflow in the NAcc in response to single-pulse and train-pulse stimulations	83
Figure 2 : Influence of cell firing and extracellular calcium concentrations on DA overflow following train-pulse stimulation.....	84
Figure 3 : Effect of NT on terminal DA release following single-pulse and train-pulse stimulations	85
Figure 4 : DA release is modulated by agonists and antagonists of D ₂ receptors.....	86
Figure 5 : The enhancement of DA release by NT is dependent on D ₂ receptors	87
Figure 6 : Releasable pools of DA are not depleted in the presence of sulpiride	88

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-MT :	3-méthoxytyramine
AMPC :	adénosine monophosphate cyclique
ATV :	aire tegmentaire ventrale
COMT :	catéchol-O-méthyl transférase
CPu :	noyau caudé/putamen
DAG :	diacylglycérol
DOPAC :	acide 3,4-dihydroxyphényl acétique
FCV :	« fast-cyclic voltammetry » (désignation anglaise pour voltamétrie cyclique)
GIRK :	« G-protein coupled inward rectifying K ⁺ channel »
HVA :	acide homovanillique
IP ₃ :	inositol triphosphate
L-DOPA :	L-dihydroxyphénylalanine
MAO :	monoamine oxydase
NAcc :	noyau accumbens
NN :	neuromédine N
NT :	neurotensine
NTR _{1 à 3} :	récepteurs neurotensinergiques de type 1, 2 et 3
PIP ₂ :	phosphatidylinositol biphosphate
PKC :	protéine kinase C
SNc :	substance noire compacte
TH :	tyrosine hydroxylase
TTX :	térodotoxine
HPLC :	« high-pressure liquid chromatography »

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier Dr Trudeau qui représente la personne la plus significative qui m'a supporté durant ma maîtrise. Il a fait montre de compréhension et de disponibilité sans équivoque surtout que compléter une maîtrise conjointement aux études médicales est un processus assez exigeant. Dr Trudeau parvient à transmettre à ses étudiants un savoir, un savoir-faire et un savoir-être essentiels à la bonne maîtrise de la démarche scientifique. Plus il continuera d'évoluer dans le domaine, j'espère, bien au-delà de ses connaissances scientifiques, qu'il réussira à préserver l'humanisme et le tact qui le caractérisent.

J'aimerais également remercier Marie-Josée Bourque. Sa présence assidue dans le laboratoire ainsi que sa bonne humeur et son enthousiasme rendent les interactions avec elle agréables. Et, quand elle part en vacances, il est important qu'elle sache que sa présence est manquée! D'ailleurs, durant ces périodes, j'ai appris entre autres à commander d'avance mes bonbonnes de carbogène (CO_2/O_2) (ce qu'on prend souvent pour acquis quand elle est au laboratoire). Finalement, je n'oublierai jamais nos discussions académiques et également « philosophiques », c'est toujours un plaisir de converser avec elle.

Aussi, merci aux autres étudiants du laboratoire et, spécialement, à ceux qui m'ont succédé dans l'installation de la technique de voltamétrie cyclique dans notre laboratoire. En fait, dans la technique de voltamétrie cyclique, une des étapes les plus importantes est l'ajustement des paramètres nécessaires à la fabrication d'électrodes de fibre de carbone de

bonne qualité. Cette étape est également assez exigeante et la contribution de chacun de ces étudiants a permis la mise au point d'un protocole permettant l'obtention d'électrodes de très bonne qualité.

Finalement, je remercie ma famille et mes ami(e)s qui m'ont supporté, réconforté et, avouons-le, parfois même enduré! Ma gratitude envers vous est sans limite. Votre appui m'a permis de terminer cette étape importante de ma formation tout en gardant une vie sociale bien remplie et enrichissante.

AVANT-PROPOS

Au lecteur,

Le but de la recherche sur le système neurotensinergique et l'interaction neurotensine – dopamine est bien entendu une meilleure compréhension de l'anatomie et de la physiologie de la circuiterie neuronale impliquée dans cette interaction. Cependant, cette recherche vise également de mieux élucider la physiopathologie de maladies neurologiques et psychiatriques dévastatrices (schizophrénie, maladie de Parkinson, etc.) afin de développer des médicaments efficaces pour le traitement de ces maladies. Cette meilleure compréhension de la circuiterie neuronale au niveau cellulaire et moléculaire retrouve donc tout son sens lorsqu'elle nous permet de mieux répondre aux besoins des patients schizophrènes par exemple par l'utilisation d'antipsychotiques qui contrôlent adéquatement les symptômes de la maladie tout en générant le moins d'effets secondaires possible.

Au cours de cet ouvrage, nous ferons des rapprochements, lorsqu'appropriés, entre les découvertes au niveau cellulaire et moléculaire et leurs répercussions cliniques.

Charbel Simon Fawaz

INTRODUCTION

Avant l'invention du microscope, le système nerveux était considéré comme une glande produisant du liquide sécrété par le cerveau et la moelle épinière et acheminé par les nerfs vers la périphérie. Il a fallu attendre la fin du XVIII^e siècle pour que Camillo Golgi puisse observer sous microscope la structure du neurone tel que nous la connaissons actuellement. Utilisant des sels d'argent, il a développé une technique lui permettant de marquer les neurones pour les étudier en microscopie. Cette technique lui a permis d'identifier les corps cellulaires des neurones ainsi que deux types de projections : les dendrites d'un côté et un long prolongement de l'autre côté – l'axone. Golgi a ainsi été considéré comme l'un des fondateurs de la « doctrine du neurone » selon laquelle le neurone est considéré comme l'élément élémentaire de transmission de l'information dans le système nerveux.

Malgré cette découverte importante à l'échelon cellulaire en neuroscience, le lien entre les concepts biologiques et les comportements humains demeurait obscur. Ainsi, Franz Joseph Gall, un médecin et neuroanatomiste allemand, a énoncé à la fin du XVIII^e siècle une théorie actuellement connue sous le nom de « phrénologie ». En fait, Gall croyait que les traits de caractère émanaient du cerveau et que chaque région particulière du cortex contrôlait un trait spécifique (générosité, spiritualité, destruction, etc.). Chacune de ces régions pouvait se développer avec l'usage, tel un muscle s'hypertrophie avec l'exercice. Gall a proposé que le développement de chacune de ces régions corticales se reflétait sur le crâne créant ainsi des bosses et des crêtes. Ainsi, en étudiant les protubérances crâniennes, Gall croyait pouvoir déterminer les régions cérébrales les plus développées chez un individu, lui permettant donc de déterminer ses traits de personnalité.

Influencé par les travaux de Gall et par l'idée de la spécialisation au sein du système nerveux, le neurologue français Pierre Paul Broca a par la suite développé une nouvelle théorie de la localisation de la fonction dans le cerveau. Son approche pour étudier ce phénomène différait cependant de celle de Gall. Il croyait que l'étude des différentes fonctions cérébrales devait se faire en examinant les circonvolutions cérébrales plutôt que les protubérances crâniennes et que la meilleure méthode pour comprendre la localisation d'une fonction particulière s'accomplit en examinant le cerveau de patients présentant une atteinte clinique précise. Ainsi, il a effectué des études post-mortem sur le cerveau de plusieurs patients aphasiques. Bien que ces patients semblaient comprendre le langage et obéissaient à la demande, ils éprouvaient une incapacité à s'exprimer par le langage et ne pouvaient produire ni verbalement ni par écrit des phrases grammaticales complètes. L'étude post-mortem du cerveau de ces patients a révélé une atteinte à la région postérieure du lobe frontal gauche actuellement connue comme « l'aire de Broca ». Cette découverte a amené Broca à énoncer un des premiers principes illustrant la spécialisation au sein du cerveau : « Nous parlons avec l'hémisphère gauche! »¹

Jusqu'à récemment, nos connaissances de la spécialisation dans le cerveau provenaient principalement d'expériences effectuées chez des animaux ou d'études post-mortem chez des humains. Il a fallu attendre le XX^e siècle avant que des études chez des humains vivants ne soient réalisées. À cet égard, le neurochirurgien Wilder Penfield (1891-1976) a été un pionnier dans le domaine². Il a été un des premiers à utiliser de façon

¹ Nous savons actuellement que l'hémisphère gauche est prédominant pour le langage chez environ 90% des droitiers et 70% des gauchers.

² Dr Penfield a été diplômé des universités de Princeton, Johns Hopkins et Oxford avant de venir s'installer à Montréal où il a pratiqué la neurochirurgie aux hôpitaux Royal Victoria et Montreal General Hospital. Il a également fondé le Montreal Neurological Institute (MNI) dont il a assumé la direction de 1934 à 1960.

systematique la stimulation électrique directe dans le cerveau de patients éveillés (sous anesthésie locale). Ainsi, lors de neurochirurgies pour le traitement de l'épilepsie, Penfield utilisait de petites électrodes pour stimuler différentes régions du cerveau en demandant au patient de nommer différents objets. La stimulation électrique dans les régions responsables du langage a bloqué la capacité du patient à nommer les objets. Il a ainsi confirmé chez des patients vivants ce que Broca et Wernicke avaient décrit grâce aux études post-mortem. Finalement, durant les deux dernières décennies, mentionnons que des avancées technologiques importantes en imagerie cérébrale ont permis une approche « non invasive » chez des patients vivants afin d'étudier l'organisation fonctionnelle du cerveau. Ces nouvelles technologies sont principalement représentées par l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) et la tomographie par émission de positons (TEP-Scan). L'IRMf est basée sur l'IRM traditionnelle (ou anatomique)³ et consiste à réaliser des images par IRM en des temps suffisamment brefs pour surveiller certains aspects du métabolisme cérébral. En réalité, les activités mentales précises (lire, écrire, parler, etc.) se traduisent par une augmentation du débit sanguin local dans les régions cérébrales concernées. L'IRMf permet d'obtenir des images du changement du débit sanguin dans ces régions avec une précision anatomique (1mm) et temporelle (1/10^e de seconde) remarquables. Par ailleurs, le TEP-Scan consiste à administrer au patient (par voie intraveineuse le plus souvent) une molécule marquée par un isotope radioactif afin de suivre, par détection externe, le fonctionnement normal ou pathologique d'un organe. Ainsi, selon le traceur radioactif injecté, nous pouvons mesurer des phénomènes

³ L'IRM anatomique consiste à observer, sous l'effet d'un champ magnétique intense, la résonance des noyaux hydrogène présents à des concentrations différentes dans le tissu nerveux, les liquides corporels, les graisses des tissus biologiques, les muscles et les os, permettant donc de visualiser avec une très haute précision la structure anatomique d'un organe.

biologiques précis tels que le débit sanguin local dans certaines régions cérébrales ou la densité des récepteurs d'un neurotransmetteur.

Actuellement, nous disposons d'une meilleure compréhension de la spécialisation au sein du cerveau et de la circuiterie neuronale sous-jacente. Les développements de la biologie cellulaire et moléculaire nous ont également permis de mieux comprendre la pathogenèse de plusieurs maladies affectant le système nerveux. À titre d'exemple, nous pouvons noter que l'intérêt porté au système cholinergique a amélioré nos connaissances de pathologies redoutables telle que la myasthénie grave et a permis le développement de plusieurs médicaments tels que les curares utilisés surtout en anesthésie ou les médicaments pro-cholinergiques (inhibiteurs de la cholinestérase empêchant ainsi la dégradation de l'acétylcholine) utilisés dans certaines formes de démence comme la maladie d'Alzheimer. Par ailleurs, la recherche effectuée sur le système GABAergique a permis la découverte des benzodiazépines couramment utilisés dans le traitement des troubles anxieux tels que l'anxiété généralisée, le trouble panique avec ou sans agoraphobie, la phobie sociale, etc.⁴ Finalement, mentionnons le système dopaminergique qui a fait l'objet de beaucoup d'attention aux cours des dernières décennies. La dopamine (DA) est un neurotransmetteur catécholaminergique qui régule plusieurs fonctions incluant la locomotion, la sécrétion hormonale, l'intégration visuelle, la motivation, l'attention et les émotions. De plus, cette catécholamine joue un rôle important en périphérie où elle module les fonctions rénale et cardiovasculaire, la sécrétion hormonale et la motilité gastrointestinale. Ainsi, les perturbations du fonctionnement du système dopaminergique donnent lieu à des maladies

⁴ Voir *Synopsis of Psychiatry* par Kaplan et Sadock (des éditions Williams and Wilkins) pour une description plus détaillée de la présentation clinique des troubles anxieux.

psychiatriques et neurologiques dévastatrices telles que la schizophrénie, la dépendance aux drogues, la maladie de Parkinson et le syndrome de Gilles de la Tourette.

En plus des neurotransmetteurs à petite molécule comme la DA ou l'acétylcholine, les neurones libèrent aussi de nombreux peptides qui agissent comme d'importants régulateurs de la fonction neuronale. À titre d'exemple, la neurotensine (NT) a suscité beaucoup d'intérêt durant les 25 dernières années principalement dû à son interaction avec le système dopaminergique. Nos connaissances sur les neuropeptides comme la NT sont cependant beaucoup moins élaborées que celles sur la DA et plusieurs mécanismes d'action neurotensinergiques demeurent à clarifier. La NT est un peptide de 13 acides aminés présent dans le système nerveux central et le tractus digestif. Isolée pour la première fois par Carraway et Leeman en 1973, elle a été découverte lors de la purification de la substance P. Ces derniers ont observé la présence d'un composé peptidique autre que la substance P suite au passage d'un tissu hypothalamique dans une colonne chromatographique. Ce peptide a ensuite été nommé « neurotensine » étant donné sa présence dans le SNC et son effet hypotenseur accompagné de vasodilatation périphérique après son administration locale chez le rat.

Le présent ouvrage se concentre tout d'abord sur le système neurotensinergique afin de dégager nos connaissances actuelles des principaux mécanismes cellulaires et moléculaires sollicités par la NT et les récepteurs neurotensinergiques. Ensuite, nous présentons brièvement le système dopaminergique étant donné l'étroite relation entre la NT et ce dernier. Enfin, le troisième chapitre de l'introduction de ce mémoire traite de l'interaction entre la NT et le système dopaminergique et soulève l'hypothèse d'une

implication de ce neuropeptide dans la physiopathologie de maladies importantes telles que la schizophrénie. Cette revue de la littérature sur la NT et son interaction avec la DA devrait nous permettre de faire ressortir l'importance de la réalisation de ce projet. Nous présentons ensuite nos résultats sous forme d'article qui sera prochainement soumis pour publication. Par la suite, nous discutons de la portée de nos résultats ainsi que des avantages et des limites du modèle expérimental et de la technique (la voltamétrie cyclique) utilisés pour les obtenir. Finalement, avant de conclure, nous traitons des perspectives et des voies de recherche à suivre afin de souligner le potentiel des agonistes et/ou antagonistes neurotensinergiques dans le traitement de patients présentant des troubles psychotiques.

1. SYSTÈME NEUROTENSINERGIQUE

1.1 Métabolisme de la NT

Le gène encodant la NT a d'abord été isolé et séquencé chez le rat et le chien (Dobner et al., 1987; Kislauskis et al., 1988). Des études subséquentes chez l'humain ont démontré une haute conservation de ce gène entre espèces suggérant ainsi son implication dans des processus biologiques de base importants chez les mammifères (Bean et al., 1992; Evers et al., 1995). Ce dernier encode une pro-protéine d'environ 170 a.a., un précurseur du tridécapéptide NT (pGlu¹-Leu²-Tyr³-Glu⁴-Asn⁵-Lys⁶-Pro⁷-Arg⁸-Arg⁹-Pro¹⁰-Tyr¹¹-Ile¹²-Leu¹³-OH) dont les acides aminés 8 à 13 se sont avérés essentiels à l'activité biologique (Lambert et al., 1995). De plus, cette pro-protéine est également le précurseur de la neuromédine N (NN), un hexapéptide (H-Lys-Ile-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH) apparenté à la NT. En effet, les 4 a.a. au pôle carboxy-terminal de la NT et la NN sont identiques. Bien que les propriétés pharmacologiques de la NN soient moins étudiées que celles de la NT, la NN se lie aux récepteurs neurotensinergiques (décrits en détail dans la section 1.2) et semble exercer un effet biologique similaire à la NT (Carraway et al., 1992).

Dans le SNC, la transmission neurotensinergique est principalement interrompue par suite d'un clivage de la NT par plusieurs peptidases. Ainsi, la demi-vie rapportée de la NT dans le SNC est d'environ 15 minutes (Checler et al., 1986a). Les principales peptidases impliquées dans la dégradation de la NT sont : les métalloendopeptidases 24.15 et 24.16 (Checler et al., 1986b; Orłowski et al., 1983), l'enzyme de conversion de l'angiotensine

(Skidgel et al., 1984), ainsi que l'endopeptidase 24.11 (Almenoff et al., 1981). Les sites principaux de coupure enzymatique de ces protéases se situent aux liens peptidiques suivants : Arg⁸-Arg⁹, Pro¹⁰-Tyr¹¹ et Tyr¹¹-Ile¹². Il en résulte les fragments peptidiques N-terminaux NT (1-8), NT (1-10) et NT (1-11), alors qu'en C-terminal, seul le fragment NT (9-13) a été détecté. Ce dernier s'est révélé biologiquement actif, mais se trouve rapidement dégradé, libérant la tyrosine en position 11, qui peut ensuite être recyclée dans la synthèse des protéines. Par ailleurs, les fragments peptidiques NT (1-8) et NT (1-11) sont inactifs dans les préparations biologiques, tandis que le fragment NT (1-10) est rapidement métabolisé en NT (1-8) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

1.2 Caractéristiques des récepteurs de la NT

Actuellement, trois récepteurs de la NT sont identifiés dans le SNC : deux récepteurs membranaires (NTR₁ et NTR₂) et un récepteur intracellulaire (NTR₃). La majorité des effets observés lors de l'administration de la NT résulte cependant de l'interaction entre la NT et les récepteurs membranaires. Le premier de ceux-ci, NTR₁, lie la NT avec une haute affinité ($K_d = 0,1-0,3$ nM) et est insensible à la levocabastine, un antagoniste du récepteur histaminergique H₁ (Tanaka et al., 1990; Vita et al., 1993). Quant au récepteur neurotensinergique NTR₂, il lie la NT avec une plus faible affinité ($K_d = 3-5$ nM) et se trouve sensible à la levocabastine. Finalement, un troisième récepteur liant la NT a été plus récemment découvert et nommé NTR₃ (Mazella et al., 1998).

Récepteur NTR_1

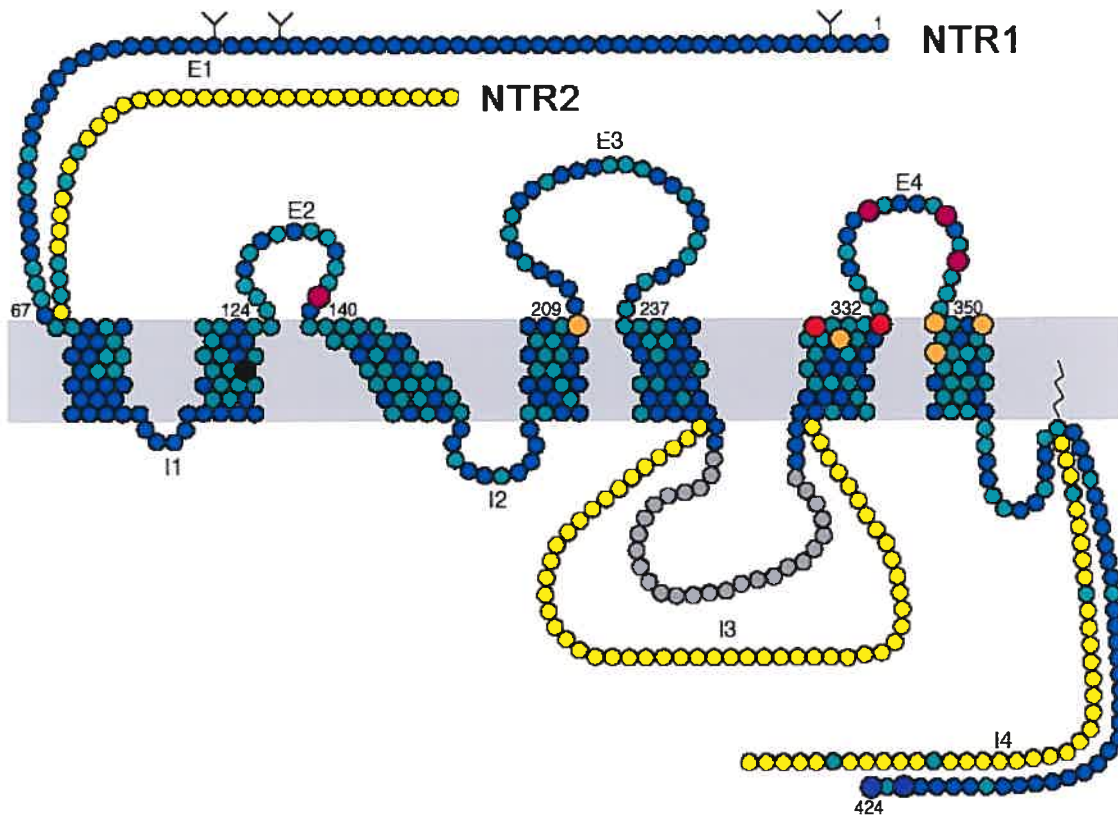


Figure 1 : Récepteurs neurotensinergiques NTR_1 (bleu et vert) et NTR_2 (bleu, vert et jaune) du rat. Noter les 7 domaines transmembranaires de ces récepteurs reliés par des boucles intra et extracellulaires. Les régions préservées entre ces deux récepteurs sont représentées en vert (principalement les domaines transmembranaires), alors que les régions présentant des variations importantes sont représentées en jaune (E1, I3 et I4) (tiré de Vincent et al., 1999).

Le récepteur NTR_1 a d'abord été caractérisé en 1977, grâce à des expériences de radioliation utilisant la NT tritiée et la NT iodée (Kitabgi et al., 1977; Lazarus et al., 1977). Par la suite, des études de liaison utilisant les différents fragments de la NT, ainsi que des peptides modifiés, ont démontré que l'affinité de la NT à son récepteur réside uniquement dans les acides aminés 8 à 13 de son pôle carboxy-terminal. Ainsi, de nos jours, plusieurs laboratoires étudiant l'effet de la NT utilisent le fragment NT (8-13) comme agoniste neurotensinergique. Bien que caractérisé en 1977, l'identification moléculaire du récepteur

NTR₁ n'a été accomplie qu'en 1990, par Tanaka et al. (figure 1). Le récepteur a alors été cloné chez le rat et classé comme membre de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G, avec sept domaines transmembranaires liés par des boucles intra et extracellulaires. Par la suite, le récepteur NTR₁ a été caractérisé chez l'humain (418 a.a.). Ce dernier partage une homologie de 84% avec le récepteur identifié chez le rat (424 a.a.) (Vita et al., 1993; Watson et al., 1993).

Le récepteur NTR₁ est exprimé dans le cerveau et dans le système digestif du rat et de l'humain (Tanaka et al., 1990; Vita et al., 1993). Dans le cerveau, il est localisé dans les neurones de la bande diagonale de Broca, du noyau suprachiasmatique, du noyau basal magnocellulaire, de la région supramammillaire, ainsi que de la substance noire et de l'aire tegmentaire ventrale du mésencéphale (Elde et al., 1990; Zhang et al., 1995). Cette localisation anatomique est surtout le résultat d'études par hybridation *in situ* recherchant l'expression de l'ARN messager du récepteur NTR₁. De plus, l'autoradiographie (Moyses et al., 1987) et l'immunohistochimie (Boudin et al., 1996) démontrent que le récepteur NTR₁ est également présent dans le striatum, probablement en partie sur les terminaisons des neurones dopaminergiques.

Plusieurs agonistes et antagonistes du récepteur NTR₁ sont actuellement connus. Les principaux agonistes identifiés sont : la NT et la NN (Minamino et al., 1984), le fragment NT (8-13) (Kitabgi et al., 1977) et l'acétylneurotensine (8-13) (Gilbert et al., 1989). Par ailleurs, deux antagonistes du récepteur NTR₁ ont été caractérisés : le SR142948A et le SR48692. Ces deux bloqueurs se lient au récepteur avec une affinité de l'ordre du nanomolaire, bien que le SR142948A (IC₅₀ = 1nM) possède une affinité plus élevée que le

SR48692 ($IC_{50} = 10nM$) pour le récepteur NTR_1 (Gully et al., 1993, 1997). Durant la dernière décennie, la découverte de ces deux antagonistes s'est avérée un outil précieux contribuant grandement à une meilleure compréhension de la transmission neurotensinergique dans le cerveau.

Récepteur NTR_2

Le récepteur NTR_2 a été identifié dans les années 80 (Mazella et al., 1985, 1988, 1989; Schotte et al., 1988; Schotte and Leysen, 1989). Ce site de liaison a d'abord été classé comme un site « accepteur » reconnaissant la NT mais dépourvu de fonction physiologique particulière (Schotte et al., 1988). Cependant, des études plus récentes ont démontré que ce site de liaison, liant la NT avec une faible affinité et sensible à la levocabastine, est effectivement doté d'une activité biologique et possède toutes les caractéristiques requises pour être classé comme un véritable récepteur (Dubuc et al., 1994; Labbé-Jullié et al., 1994; Le et al., 1996). La composition moléculaire du récepteur NTR_2 a ensuite été révélée, grâce à son clonage, d'abord chez le rat et la souris (416 a.a.) (Chalon et al., 1996; Mazella et al., 1996) puis chez l'humain (410 a.a.) (Vita et al., 1997). Ce récepteur possède une homologie en acides aminés de 64% avec le récepteur NTR_1 et, tout comme ce dernier, appartient à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G avec sept domaines transmembranaires (figure 1).

Le récepteur neurotensinergique NTR_2 diffère du récepteur NTR_1 par sa distribution tissulaire et cellulaire ainsi que son ontogenèse. Contrairement au récepteur NTR_1 qui est localisé dans le cerveau et dans le système digestif, le récepteur NTR_2 est principalement

exprimé dans le cerveau. Au sein même du cerveau, la distribution du récepteur NTR₂ diffère de celle du récepteur NTR₁. Les études par hybridation *in situ* ont ainsi démontré que le récepteur NTR₂ est principalement exprimé dans l'hippocampe, le système olfactif, le cortex cérébral, le cortex cérébelleux et, dans une plus faible proportion, dans la bande diagonale de Broca, le noyau septal médial ainsi que le noyau supraoptique (Sarret et al., 1998; Walker et al., 1998). *In vivo*, les études chez le rat ont démontré que le récepteur NTR₂ est également exprimé dans la substance noire, une région associée à une forte activité dopaminergique. Dans cette région, à l'échelon cellulaire, le récepteur NTR₂ semble principalement localisé dans les cellules gliales, alors que le récepteur NTR₁ est exprimé surtout par les neurones (Boudin et al., 1998). Il existe toutefois des données suggérant une localisation du récepteur NTR₁ dans les cellules gliales (voir Trudeau, 2000, pour une description de l'action de la NT sur les astrocytes via le récepteur NTR₁), ainsi qu'une localisation du récepteur NTR₂ dans les neurones. Grâce à la technique de Western Blot et de l'immunocytochimie, une étude récente de Sarret et al. (2005) suggère en effet la présence du récepteur NTR₂ dans les neurones des voies nociceptives de la moelle épinière et des ganglions rachidiens postérieurs chez le rat. Par ailleurs, l'ontogenèse des récepteurs NTR₁ et NTR₂ semble très différente. Chez la souris, l'ARNm du récepteur NTR₂ est détecté seulement au 14^e jour postnatal et atteint des concentrations adultes au 30^e jour (Sarret et al., 1998). En revanche, l'ARNm du récepteur NTR₁ est exprimé dès la naissance, puis atteint transitoirement un pic vers la première semaine de vie avant de diminuer progressivement pour arriver à des niveaux adultes vers le 30^e jour postnatal (Sato et al., 1991,1992; Hermans et al., 1993).

Du point de vue pharmacologique, le récepteur NTR₂ possède les mêmes agonistes que le récepteur NTR₁, dont les principaux sont la NT, le fragment NT (8-13) et la neuromédine N. De plus, le récepteur NTR₂ lie la levocabastine qui agit comme un agoniste partiel (Chalon et al., 1996; Mazella et al., 1996; Gully et al., 1997). Par ailleurs, le récepteur NTR₂ possède un antagoniste principal : le SR142948A. Ce dernier bloque le récepteur NTR₂ avec une haute affinité (1-4 nM) chez le rat et la souris, contrairement au SR48692 qui ne bloque le récepteur NTR₂ qu'à des doses beaucoup plus élevées, avec des K_d respectifs de 82 et 300 nM chez le rat (Chalon et al., 1996) et la souris (Mazella et al., 1996). Ainsi, le SR142948A est souvent décrit comme un antagoniste non-spécifique bloquant l'effet des deux récepteurs NTR₁ et NTR₂ contrairement au bloqueur SR48692 qui est plutôt un antagoniste spécifique au récepteur NTR₁ et qui n'agit sur le récepteur NTR₂ qu'à des doses plus élevées.

Le tableau I compare les principales caractéristiques des deux récepteurs neurotensinergiques NTR₁ et NTR₂.

Tableau I : Caractéristiques des récepteurs neurotensinergiques NTR₁ et NTR₂

Caractéristiques du récepteur	Type de récepteur	
	NTR ₁	NTR ₂
Clonage		
Souris	-	Mazella et al., 1996
Rat	Tanaka et al., 1990	Chalon et al., 1996
Humain	Vita et al., 1993 Watson et al., 1993	Vita et al., 1997
Taille		
Souris	-	416 a.a.
Rat	424 a.a.	416 a.a.
Humain	418 a.a.	410 a.a.
Classification	Couplé aux protéines G avec 7 domaines TM	Couplé aux protéines G avec 7 domaines TM
Localisation	Membrane plasmique Principalement les neurones Également dans les cellules gliales	Membrane plasmique Principalement dans les cellules gliales Également dans les neurones
Principaux agonistes	NT Fragment NT (8-13) Acétylneurotensine (8-13) Neuroméline N (NN)	NT Fragment NT (8-13) Neuroméline N (NN)
Principaux antagonistes	SR142948A SR48692	SR142948A

Récepteur NTR₃

Le récepteur NTR₃ a été récemment identifié et caractérisé. Déjà cloné auparavant chez l'humain, on le connaît également sous le nom de « gp95/sortilin » (Mazella et al., 1998; Zsürger et al., 1994). Ce récepteur est synthétisé comme un peptide précurseur de 100 kDa, qui est clivé par la furine, une prohormone convertase, générant ainsi une protéine de 95 kDa possédant un seul domaine transmembranaire et liant la NT avec une haute affinité (0,1-0,3 nM).

Le récepteur NTR₃/gp95/sortilin est principalement exprimé dans des vésicules intracellulaires des neurones, des cellules gliales et des adipocytes (Chabry et al., 1993; Peterson et al., 1997; Morris et al., 1998). Dans les adipocytes, il est localisé dans des vésicules contenant le transporteur du glucose GLUT4 et se trouve rapidement déplacé vers la membrane cellulaire en réponse à l'insuline. Dans les neurones, le récepteur NTR₃ est également localisé dans le compartiment intracellulaire et l'exposition du neurone à la NT engendre son déplacement vers la membrane plasmique (Chabry et al., 1993). Même si la localisation cellulaire du récepteur NTR₃ est bien documentée, les données sur sa fonction physiologique restent rares et plusieurs hypothèses concernant son rôle biologique ont été avancées. Il a été proposé que le récepteur NTR₃ soit impliqué dans la recapture et la dégradation de la NT, modulant ainsi la cinétique du signal neurotensinergique (Mazella et al., 1998; Mazella, 2001; Navarro et al., 2001). De plus, au niveau intracellulaire, on croit que le récepteur NTR₃ peut agir comme un récepteur de « triage des protéines » servant ainsi au transport protéique entre l'appareil de Golgi et le compartiment endosomal (Peterson et al., 1997), ainsi qu'au transport de certains peptides des vésicules

intracellulaires jusqu'à la membrane plasmique, comme c'est le cas pour le transporteur du glucose GLUT4 dans les adipocytes.

1.3 Mécanismes d'action de la NT

Depuis sa découverte en 1973, la NT a fait l'objet de plusieurs études neurochimiques et électrophysiologiques visant à élucider son mécanisme d'action cellulaire. Étant donné l'étroite relation de la NT avec le système dopaminergique, les données sur les mécanismes d'action neurotensinergiques proviennent principalement d'études sur l'effet de la NT sur les systèmes dopaminergiques nigrostriés et mésocorticolimbiques. Deux principaux mécanismes d'action de la NT sont actuellement proposés : 1) la modulation par la NT des voies de signalisation intracellulaires impliquant des seconds messagers chimiques; et 2) l'internalisation du complexe NT – NTR.

1.3.1 Modulation par la NT des voies de signalisation intracellulaires

Les principales voies de signalisation reliées au système neurotensinergique ont été décrites à partir d'expériences étudiant l'effet de l'activation du récepteur NTR_1 surtout, mais également du récepteur NTR_2 . Comme nous l'avons vu, NTR_1 et NTR_2 sont des récepteurs de type « métabotrope » faisant partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ainsi, en théorie, la NT peut exercer son effet par l'activation de l'une ou l'autre des voies de signalisation associées aux récepteurs couplés aux protéines G : 1) la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) médiée par l'enzyme adénylyl cyclase; 2) la voie du diacylglycérol (DAG) – inositol triphosphate (IP_3) médiée par

l'enzyme phospholipase C, l'IP₃ engendrant une mobilisation du calcium intracellulaire pouvant mener à la production d'oxyde nitrique (NO) et de GMP cyclique (voir ci-bas pour plus de détails); 3) la voie de l'acide arachidonique médiée par l'enzyme phospholipase A₂; et 4) la modification directe de conductances ioniques soit par la protéine G ou par ses seconds messagers. Cependant, les études ont démontré que la NT privilégie surtout deux mécanismes principaux : 1) l'activation de la voie médiée par la phospholipase C et 2) l'activation de canaux cationiques et des canaux de type GIRK (« G-protein coupled inward rectifying K⁺ channels »).

Premièrement, le récepteur NTR₁ est couplé à la phospholipase C (Hermans et al., 1992; Chabry et al., 1994), une enzyme effectrice des protéines G hydrolysant le phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) pour générer les seconds messagers IP₃ et DAG. La production d'IP₃ a été détectée par suite de l'application de NT dans des tranches de cerveau de rat, ainsi que dans différentes lignées cellulaires où les récepteurs neurotensinergiques sont exprimés (Goedbert et al., 1984; Snider et al., 1986; Watson et al., 1992; Hermans et al., 1994). Cette production d'IP₃ est connue pour engendrer la mobilisation des stocks de calcium intracellulaire, et une augmentation des concentrations de calcium intracellulaire est en effet observée lors de l'application de NT (Memo et al., 1986; Snider et al., 1986; Bozou et al., 1989a, b; Trudeau, 2000). Cette augmentation de calcium intracellulaire suivant l'administration de NT semble activer une cascade biochimique menant à la production du second messenger gazeux NO, par l'intermédiaire de la NO synthase (Marsault and Frelin, 1992; Slusher et al., 1994). Le NO formé active ensuite l'enzyme guanylyl cyclase entraînant ainsi une production de GMP cyclique. Le GMP cyclique est en réalité un des premiers messagers intracellulaires ayant été reliés à

l'activation des récepteurs neurotensinergiques, d'abord, dans des études de la lignée cellulaire neuroblastique N1E115 (Gilbert and Richelson, 1984) puis, plus récemment, dans des expériences de transfection cellulaire (Slusher et al., 1994). Par ailleurs, la phospholipase C génère également le second messenger DAG qui active à son tour la protéine kinase C (PKC). L'implication de la PKC dans la réponse à la NT a également été suggérée. En effet, une action bien connue de la NT est une facilitation de la libération de DA par les neurones dopaminergiques du mésencéphale. Or, cette facilitation de la libération de dopamine induite par la NT est diminuée par suite d'une régulation à la baisse de l'activité de la PKC après une incubation prolongée au phorbol ester de cultures de neurones dopaminergiques mésencéphaliques (Brouard et al., 1994).

Deuxièmement, bien que le mécanisme d'action principal de la NT semble dépendre des voies médiées par la phospholipase C, la NT possède également la capacité d'induire l'ouverture de canaux cationiques et engendre un effet exciteur direct sur les neurones dopaminergiques (Farkas et al., 1996, 1997). Une autre voie de signalisation a aussi été décrite : la voie impliquant les canaux GIRK. En réalité, la DA est connue pour réguler sa propre libération par l'activation d'autorécepteurs. Les autorécepteurs dopaminergiques de type D₂ sont ainsi localisés sur les neurones dopaminergiques au niveau somatodendritique et terminal. Leur activation entraîne une inhibition de la libération de DA. Au niveau somatodendritique, ces récepteurs agissent principalement en augmentant la conductance des canaux GIRK. À l'inverse, la NT diminue la conductance des canaux GIRK, facilitant donc la libération de DA en s'opposant à l'autoinhibition des neurones dopaminergiques générée par l'activation des récepteurs D₂ (Farkas et al., 1997). Ainsi, en plus de moduler l'activité de messagers intracellulaires mobilisés lors de l'activation des récepteurs

neurotensinergiques, la NT peut également moduler la libération dopaminergique par une interaction en aval entre les voies de signalisation des récepteurs neurotensinergiques et dopaminergiques, c'est-à-dire au niveau du canal GIRK.

1.3.2 Internalisation du complexe NT – NTR

Plusieurs études sur les effets de la NT ont démontré une désensibilisation de la réponse à la NT caractérisée par une absence d'effet par suite d'application répétée de ce peptide, ainsi que par un effet transitoire lors de l'application soutenue de la NT (Carraway and Leeman, 1973; Audinat et al., 1989; DiPaola and Richelson, 1990; Trudeau, 2000). Cette désensibilisation a été découverte dans la toute première étude sur la NT, où l'hypotension générée par l'administration de NT a démontré une tachyphylaxie importante. De plus, l'application subséquente du peptide n'a généré aucune réponse pendant environ 60 minutes suivant la première dose administrée et il a fallu attendre quelques heures avant que la réponse à la NT ne soit complètement restaurée (Carraway and Leeman, 1973).

La désensibilisation de la réponse à la NT est due à l'internalisation du complexe NT – récepteur neurotensinergique. Cette internalisation a été observée au niveau somatodendritique (neurones dopaminergiques du mésencéphale) et terminal (noyau caudé/putamen et striatum) (Castel et al., 1991; Beaudet et al., 1994; Faure et al., 1995). Une fois internalisé, le complexe NT – NTR se dissocie et le récepteur neurotensinergique peut alors être recyclé vers la membrane cellulaire ou dégradé dans l'appareil lysosomal (Boudin et al., 1998; Souazé, 2001). Par ailleurs, la NT internalisée peut être acheminée de

la terminaison synaptique vers le corps cellulaire par transport axonal rétrograde (Laduron, 1995). Ainsi, l'injection de NT marquée à l'iode dans le striatum de rats permet une détection subséquente de radioactivité dans la substance noire ipsilatérale (Castel et al., 1990, 1991), imputable à un transport rétrograde de la NT marquée dans les axones de la voie dopaminergique nigrostriée, du niveau terminal (striatum) au niveau somatique (substance noire). Ce transport rétrograde de NT est saturable. Ainsi, la détection de radioactivité dans la substance noire est inhibée lorsqu'on injecte avec la NT radioactive dans le striatum des concentrations importantes de ligands des récepteurs neurotensinergiques non-marqués (Castel et al., 1992a). Finalement, mentionnons au passage l'hypothèse soulevée par certaines études selon laquelle la NT, une fois dans le corps cellulaire, pourrait être impliquée dans la régulation de l'expression génique (Burgevin et al., 1992; Laduron 1994, 1995). Les études de microscopie électronique ont d'ailleurs démontré un marquage accru dans la région périnucléaire par suite du transport rétrograde de la NT radioactive du striatum vers la substance noire (Castel et al., 1992a, b). Toutefois, bien que l'internalisation de la NT et du complexe NT – NTR soit un phénomène actuellement bien documenté, les données supportant la régulation de l'expression génique par la NT internalisée restent minces et le rôle de la NT, une fois dans le corps cellulaire, demeure à clarifier.

2. SYSTÈME DOPAMINERGIQUE

2.1 Métabolisme de la dopamine

La DA appartient au groupe des neurotransmetteurs catécholaminergiques qui comprend également la norépinéphrine et l'épinéphrine. La DA constitue toutefois près de 80% du contenu en catécholamines du cerveau. Cette molécule est dérivée de l'acide aminé tyrosine. Deux réactions biochimiques servent à transformer la tyrosine en DA auxquelles participent deux enzymes principales : la tyrosine hydroxylase (TH) et la L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) décarboxylase. La TH sert à convertir la tyrosine en L-DOPA. La TH est présente dans toutes les cellules produisant des catécholamines et représente l'étape limitante de synthèse de dopamine. La présence de cette enzyme est également utilisée comme marqueur immunocytochimique des compartiments somatodendritique (ATV, substance noire) et axonal (NAcc, striatum) des neurones dopaminergiques. La L-DOPA décarboxylase permet la conversion de la L-DOPA en dopamine. Cette enzyme se retrouve dans le SNC ainsi qu'en périphérie. Sa présence à l'extérieur du SNC requiert une attention particulière lors du traitement de la maladie de Parkinson. En effet, la L-DOPA est un des traitements de choix dans cette maladie puisque, contrairement à la dopamine, elle traverse la barrière hémato-encéphalique. Cependant, lorsque la L-DOPA est administrée seule, chez les patients parkinsoniens, elle est rapidement transformée en dopamine par la L-DOPA décarboxylase périphérique et ne peut donc atteindre le SNC pour accomplir son action thérapeutique. La présence de cette enzyme en périphérie fait en sorte que seulement 1 à 3% de la L-DOPA administrée au

patient parkinsonien traverse la barrière hémato-encéphalique, alors que le reste est converti en dopamine. C'est pourquoi, afin de limiter la conversion périphérique de L-DOPA en dopamine, on utilise la carbidopa, un inhibiteur de la L-DOPA décarboxylase qui ne pénètre pas la barrière hémato-encéphalique, en combinaison avec la L-DOPA. Ainsi, la carbidopa limite la conversion périphérique de la L-DOPA en dopamine, sans affecter sa transformation dans le SNC. La combinaison carbidopa et L-DOPA permet d'augmenter la biodisponibilité de cette dernière à 10% dans le SNC. Ainsi, la combinaison de carbidopa et L-DOPA⁵ permet une diminution de la dose de L-DOPA requise pour contrôler les symptômes de la maladie.

Une fois synthétisée, la DA est stockée dans le neurone dopaminergique à l'intérieur de vésicules via le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT2), puis est libérée dans l'espace extra-cellulaire par un mécanisme calcium-dépendant. Ensuite, la transmission dopaminergique est interrompue principalement suite au transport de la DA de l'extérieur de la cellule vers l'espace intracellulaire. Cette recapture de la DA est accomplie par le transporteur membranaire de la dopamine (DAT). L'activité du DAT est sensible aux variations thermiques du milieu environnant. Ainsi, une diminution de la température ambiante diminue l'activité du DAT. Cette caractéristique est avantageusement utilisée dans certains protocoles expérimentaux tels que la mesure de la libération de DA par voltamétrie cyclique dans des tranches de cerveau, où ces dernières sont souvent maintenues à des températures inférieures à la température corporelle (~35°C). Ces basses températures inhibent l'activité du DAT et favorisent une augmentation des concentrations

⁵ Le Sinemet® est actuellement le médicament le plus couramment utilisé dans le traitement de la maladie de Parkinson. Il contient une préparation de carbidopa/levodopa dans une proportion fixe de 1:4 (carbidopa

de DA extracellulaire, facilitant ainsi sa détection. Bien que la recapture joue un rôle majeur dans la régulation des concentrations de DA dans la fente synaptique, sa dégradation contribue également à la terminaison du signal dopaminergique. Deux enzymes sont principalement responsables du métabolisme de la DA : la monoamine oxydase (MAO) et la catéchol-O-méthyl transférase (COMT). Ainsi, une fois internalisée dans le neurone, la dopamine est convertie en acide 3,4-dihydroxyphényl acétique (DOPAC) par l'enzyme MAO. Le DOPAC peut alors diffuser à l'extérieur du neurone pour être soit éliminé du SNC soit métabolisé en acide homovanillique (HVA) par l'enzyme COMT. La COMT sert également à convertir la DA extracellulaire en 3-méthoxytyramine (3-MT). Ces trois métabolites de la dopamine (DOPAC, HVA et 3-MT) sont détectés par des techniques expérimentales telles que l'HPLC et la voltamétrie cyclique (voir le chapitre 5 pour une description plus détaillée de ces deux techniques) et peuvent donc servir à l'étude de la transmission dopaminergique ainsi que du métabolisme de la dopamine.

2.2 Principales voies dopaminergiques

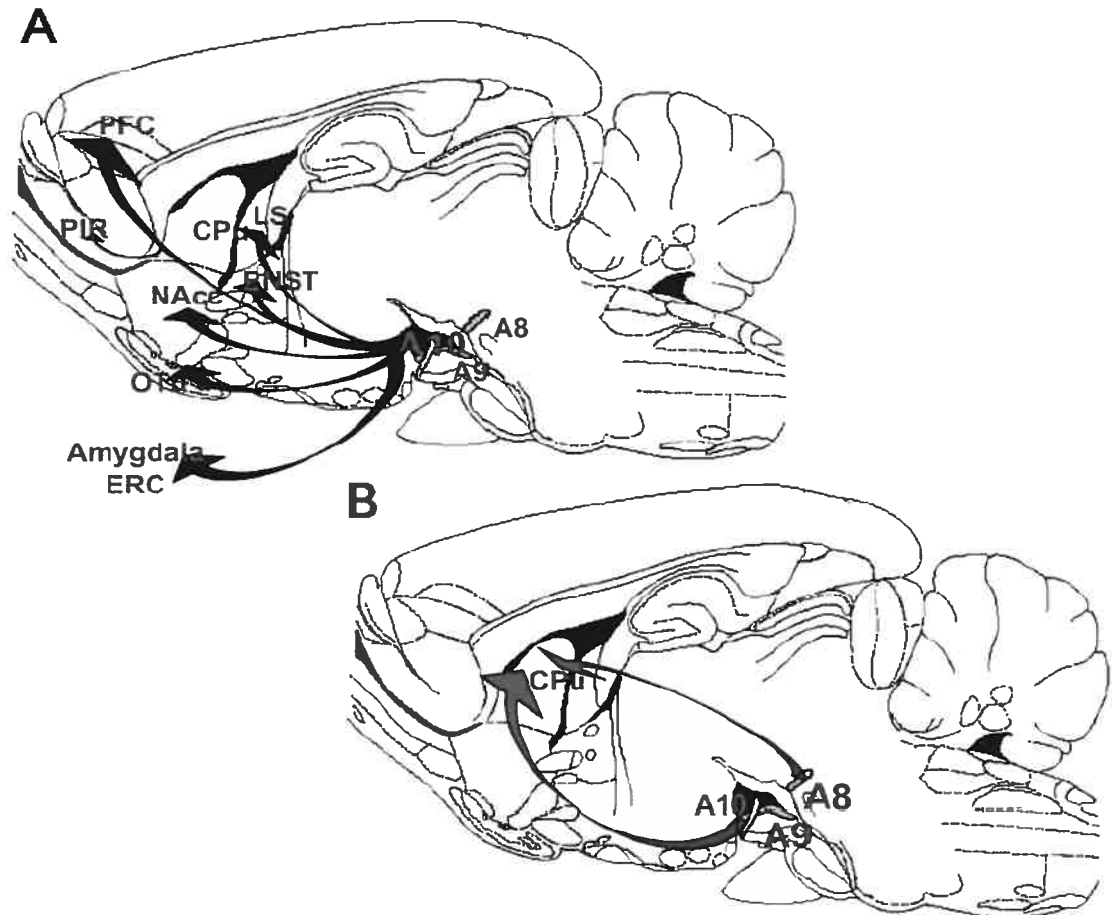


Figure 2 : Voies dopaminergiques mésocorticolimbique (A) et nigrostriée (B). Parmi les régions dopaminergiques terminales, nous constatons le noyau accumbens (NAcc), le striatum dorsal (noyau caudé/putamen; CPU), le tubercule olfactif (OTu) ainsi que les cortex préfrontal (PFC), piriforme (PIR) et entorhinal (ERC) (tiré de Binder et al., 2001).

Dans le cerveau, les corps cellulaires des neurones contenant la DA se retrouvent dans le mésencéphale (A8-A10), le diencéphale (A11-A14), le bulbe olfactif (A16) ainsi que dans la rétine (A17) (Björklund and Lindvall, 1984). Près de 90% des neurones dopaminergiques sont localisés dans le mésencéphale au sein de trois noyaux : le noyau rétrosubstantiel (A8), la substance noire compacte (SNc; A9) et l'aire tegmentaire ventrale

(ATV; A10). Deux voies de projections dopaminergiques majeures originent de ces groupes de neurones, soit la voie nigrostriée et la voie mésocorticolimbique (figure 2). La voie dopaminergique nigrostriée relie les corps cellulaires du noyau rétrosubstantiel (A8) et de la SNc (A9) au striatum dorsal (noyau caudé et putamen). Le système nigrostrié est impliqué dans la régulation de l'activité motrice et sa dégénérescence est associée à l'apparition des symptômes de la maladie de Parkinson. Par ailleurs, la voie dopaminergique mésocorticolimbique origine de l'ATV (A10) et projette vers le NAcc, le tubercule olfactif, l'amygdale et certaines régions corticales telles que le cortex préfrontal, cingulaire et entorhinal (Ungerstedt, 1971; Fallon, 1988). La voie mésocorticolimbique est impliquée dans l'apprentissage, la mémoire, la motivation, et son dysfonctionnement est associé à des troubles psychiatriques tels que la schizophrénie et la dépendance aux drogues. Cette distinction traditionnelle entre les deux voies dopaminergiques d'origine mésencéphalique est partiellement valable puisqu'il existe un chevauchement entre les deux systèmes. Ainsi, les neurones de la SNc (A9) projettent aussi en partie vers les régions limbiques et corticales telles que l'amygdale et le cortex cingulaire antérieur, alors que les neurones du noyau rétrosubstantiel (A8) projettent aussi en partie vers l'amygdale et le cortex entorhinal. De plus, les neurones de l'ATV contribuent à l'innervation du striatum dorsal (Fallon and Moore, 1978; Arsenault et al., 1988; Fallon, 1988; Parent and Lavoie, 1993). Finalement, parmi les autres régions dopaminergiques, mentionnons le système tubéroinfundibulaire (A12) qui origine du noyau arqué et s'étend à l'éminence médiane et à l'hypophyse (lobe intermédiaire et neurohypophyse). Ce système possède une fonction endocrinienne et sert au contrôle de la sécrétion de prolactine par l'antéhypophyse.

2.3 Récepteurs dopaminergiques

La DA agit en se liant à des récepteurs membranaires de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, comportant sept domaines transmembranaires liés par des boucles intracellulaires et extracellulaires. Cinq récepteurs dopaminergiques ont été identifiés (D_1 à D_5) et sont classiquement divisés en deux familles : la famille des récepteurs de type D_1 , comprenant D_1 et D_5 , et celle des récepteurs de type D_2 , comprenant D_2 , D_3 , et D_4 . Cette division en deux types des récepteurs dopaminergiques a été initialement proposée à la fin des années 1970, alors que seulement deux récepteurs dopaminergiques étaient connus (D_1 et D_2). Elle est fondée sur l'effet de ces récepteurs sur l'activité de l'adénylyl cyclase (AC) (Spano et al., 1978; Keabian and Calne, 1979). L'activation du récepteur D_1 stimule l'activité de l'AC via une protéine G de type G_s , alors que l'activation du récepteur D_2 inhibe l'activité de l'AC via une protéine G de type G_i . Par la suite, l'introduction des études génétiques et des procédés de clonage ont mené à l'identification, au début des années 1990, de trois nouveaux récepteurs dopaminergiques : le récepteur D_3 (Sokoloff et al., 1990), le récepteur D_4 (Van Tol et al., 1991) et le récepteur D_5 (Sunahara et al., 1991). Une étude détaillée de la structure de ces récepteurs a révélé une homologie importante entre les domaines transmembranaires des récepteurs D_3 et D_4 et ceux du récepteur D_2 , ainsi qu'entre les domaines transmembranaires du récepteur D_5 et ceux du récepteur D_1 . En effet, les domaines transmembranaires des récepteurs D_2 et D_3 partagent une homologie de 75%, alors que ceux des récepteurs D_2 et D_4 sont identiques à 53%. Par ailleurs, les domaines transmembranaires des récepteurs D_1 et D_5 partagent 80% d'homologie. Ainsi, le récepteur D_5 a été inclu dans la famille des récepteurs de type D_1 , alors que les récepteurs D_3 et D_4 ont été classifiés dans la famille des récepteurs de type D_2 . Toutefois, nous savons

actuellement que cette classification des récepteurs dopaminergiques en deux familles est plutôt artificielle, puisque les récepteurs dopaminergiques peuvent agir sur d'autres types de protéines G que les protéines G_s et G_i (protéines G de type G_0 par exemple) et mobiliser plusieurs autres seconds messagers intracellulaires. Une étude détaillée des voies de signalisation intracellulaires des différents récepteurs dopaminergiques dépasse le cadre de ce travail. Nous nous intéresserons cependant tout particulièrement au récepteur dopaminergique D_2 , dont nous avons étudié l'interaction avec le système neurotensinergique.

2.4 Récepteur dopaminergique D_2

La séquence d'ADN encodant le récepteur D_2 a d'abord été identifiée chez le rat, en 1988, par Bunzow et al. Cette séquence de 1245 nucléotides produit une protéine de 415 a.a. Chez l'humain le gène encodant le récepteur D_2 a été caractérisé l'année suivante (Grandy et al., 1989a,b). Ce gène est localisé sur le segment chromosomique 11q22-23 et comprend huit exons séparés par sept introns. L'exon 6 est d'une taille de 87 paires de bases et encode une séquence de 29 a.a. située dans la troisième boucle intracellulaire du récepteur D_2 . Cette séquence d'acides aminés peut être exclue du récepteur D_2 par un phénomène d'épissage de l'exon 6 du gène encodant le récepteur D_2 (Dal Toso et al., 1989; Giros et al., 1989; Monsma et al., 1989). Ainsi, deux isoformes de ce récepteur sont obtenues, soit le D_2 court (ou « short », en anglais) (D_{2s} ; 415 a.a. chez le rat et 414 a.a. chez l'humain) et le D_2 long (D_{2l} ; 444 a.a. chez le rat et 443 a.a. chez l'humain). Puisque la troisième boucle intracellulaire du récepteur D_2 est impliquée dans le couplage aux

protéines G, l'existence d'un épissage dans cette région du récepteur D₂ a soulevé l'hypothèse d'une potentielle diversité fonctionnelle entre les deux isoformes. À ce jour, cependant, peu de différences ont été mises en évidence autant dans la distribution cellulaire et tissulaire que le profil pharmacologique des deux isoformes. Ainsi, dans les prochains paragraphes, nous nous concentrerons sur l'activité du récepteur D₂ en général, sans distinction entre les deux isoformes.

Le récepteur D₂ est exprimé dans plusieurs régions cérébrales. Il se retrouve, entre autres, dans le noyau accumbens, le striatum, le tubercule olfactif, l'ATV et la substance noire compacte. L'ARNm encodant ce récepteur est également présent dans les cortex préfrontal, cingulaire, entorhinal et temporal, ainsi que dans l'amygdale et l'hypothalamus (Meador-Woodruff et al., 1989; Weiner et al., 1991). À l'échelon cellulaire, le récepteur D₂ est localisé sur les neurones DAergiques (autorécepteur D₂), ainsi que sur plusieurs populations neuronales non DAergiques incluant certains neurones cholinergiques, sérotoninergiques, GABAergiques, glutamatergiques et peptidergiques (Jaber et al., 1996). Dans les neurones DAergiques, l'autorécepteur D₂ se retrouve dans les compartiments somatodendritique et terminal. L'activation de ce récepteur inhibe la libération de DA et constitue ainsi un mécanisme de régulation majeur de la transmission DAergique.

Tout comme les récepteurs NTergiques NTR₁ et NTR₂, le récepteur D₂ est un récepteur couplé aux protéines G à 7 domaines transmembranaires. Ainsi, en théorie, le récepteur D₂ peut exercer son effet en agissant sur l'une ou l'autre des voies de signalisation associées aux récepteurs couplés aux protéines G. Les études ont démontré que le récepteur D₂ privilégie la voie de l'adénylyl cyclase (AC) en inhibant cette dernière

(Spano et al., 1978; Keabian and Calne, 1979). De plus, contrairement aux récepteurs NTergiques qui diminuent la conductance des canaux GIRK (« G-protein coupled inward rectifying K⁺ channels »), le récepteur D₂ augmente la conductance des canaux GIRK au niveau somatodendritique (Farkas et al., 1997). Finalement, le récepteur D₂ permet aussi la mobilisation d'autres voies intracellulaires telles que celle des MAP kinases.

Au plan pharmacologique, plusieurs agonistes et antagonistes lient le récepteur D₂. Les principaux agonistes connus à ce jour incluent le quinpirole (K_i ~ 5-500nM), la dopamine (K_i ~ 3-500nM), l'apomorphine (K_i ~ 1-25nM), la bromocriptine (K_i ~ 5-15nM) et la 7-hydroxy-N-N-di-n-propyl-2-aminotétraline (7-OH-DPAT; K_i ~ 10-100nM). Les antagonistes du récepteur D₂ sont nombreux et représentent une classe importante de médicaments. Ils sont utilisés comme antipsychotiques (voir chapitre 3 pour une description détaillée des antipsychotiques) dans le traitement de maladies psychiatriques graves telles que la schizophrénie. Parmi les principaux antagonistes du récepteur D₂, mentionnons le sulpiride (K_i ~ 2,5-70nM), la chlorpromazine (K_i ~ 0,5-5nM), l'halopéridol (K_i ~ 0,5-1nM) et la clozapine (K_i ~ 50-250nM). Finalement, tout comme leur affinité, précisons que la sélectivité de ces agonistes et antagonistes pour le récepteur D₂ varie également.

3. INTERACTIONS NEUROTENSINE - DOPAMINE

3.1 Système neurotensinergique et schizophrénie

3.1.1 La schizophrénie

La schizophrénie est une pathologie psychiatrique dévastatrice dont la prévalence mondiale est de l'ordre de 1% (Carpenter and Buchanan, 1994). Elle se caractérise par l'apparition de plusieurs signes et symptômes cliniques traditionnellement séparés en deux grandes catégories : les symptômes positifs (délires, hallucinations, désorganisation du discours, désorganisation du comportement) et les symptômes négatifs (émoussement affectif, anhédonie, perte de volonté et retrait social)⁶. La schizophrénie est divisée en cinq types selon la symptomatologie prédominante du patient : les types paranoïde, désorganisé, catatonique, indifférencié et résiduel. Dans la schizophrénie paranoïde, des préoccupations par une ou plusieurs idées délirantes ou par des hallucinations auditives fréquentes se retrouvent au premier plan. Dans la schizophrénie de type désorganisé, le discours et les comportements désorganisés ainsi qu'un affect abasé ou inapproprié sont prépondérants. La schizophrénie catatonique est plutôt caractérisée par : 1) une immobilité motrice ou une activité motrice excessive (souvent stérile et non influencée par des stimuli extérieurs); 2) des particularités des mouvements volontaires se manifestant par des mouvements stéréotypés, des maniérismes ou des grimaces, des positions catatoniques (maintien volontaire d'une position inappropriée ou bizarre); 3) négativisme extrême ou mutisme; et

4) écholalie ou échopraxie. La schizophrénie de type indifférencié est retrouvée chez les patients présentant les symptômes positifs et/ou négatifs de la schizophrénie décrits ci-haut sans toutefois accuser un pattern de symptômes précis (paranoïde, désorganisé ou catatonique). Finalement, la schizophrénie de type résiduel est caractérisée par la persistance de certains éléments de la maladie (symptômes négatifs, croyances bizarres, perceptions inhabituelles) sans la présence d'idées délirantes manifestes, d'hallucinations, de discours ou de comportement franchement désorganisé. La schizophrénie apparaît habituellement chez le jeune adulte et persiste tout au long de la vie des patients. Les hommes sont plus précocement touchés par cette maladie que les femmes, avec un début entre 18 et 25 ans chez les jeunes hommes et 24 à 35 ans chez les jeunes femmes. Par ailleurs, on observe un pic de l'incidence de la schizophrénie chez les femmes ménopausées (potentiellement dû à la cessation de la sécrétion d'oestrogènes qui semblent avoir un effet antidopaminergique protecteur). Ainsi, le risque à vie d'être atteint de la schizophrénie devient égal entre les deux sexes.

Durant les dernières décennies, les études sur la schizophrénie ont scrupuleusement examiné le système dopaminergique. L'intérêt manifesté envers ce système découle principalement de la découverte de l'action des antipsychotiques sur les récepteurs de la dopamine. En fait, le système dopaminergique et plus précisément la voie mésocorticolimbique ont été considérés par Carlsson (1988)⁷ comme jouant un rôle central dans la physiopathologie de la schizophrénie. De nos jours, il est toutefois de plus en plus

⁶ Voir *PSYCHIATRIE CLINIQUE, une approche bio-psycho-sociale*, tome I, par Lalonde et al., pour une revue plus détaillée de la présentation clinique de la schizophrénie.

⁷ A. Carlsson est un des pionniers du domaine de la recherche sur la dopamine. Son apport à l'avancement des connaissances sur le rôle de la dopamine dans les troubles psychotiques lui a valu le Prix Nobel de médecine, en 2001.

clair que la schizophrénie ne résulte pas uniquement de la dysfonction du système dopaminergique, mais plutôt d'une altération de l'équilibre entre plusieurs systèmes de circuiterie neuronale, incluant entre autres les systèmes dopaminergique, cholinergique, sérotoninergique, GABAergique et glutamatergique (Joyce, 1993; Weinberger and Lipska, 1995; Bachus and Kleinman, 1996). Outre ce dérèglement multisystémique des neurotransmetteurs classiques, plusieurs systèmes de transmission peptidique ont également été impliqués dans la physiopathologie de la schizophrénie dont le principal serait le système neurotensinergique.

3.1.2 NT et schizophrénie

La NT est intimement liée aux circuits neuronaux perturbés dans la schizophrénie. Dans plusieurs régions cérébrales, ce peptide possède la capacité de moduler les systèmes de neurotransmetteurs atteints dans cette maladie. Ainsi, l'étude de la transmission neurotensinergique constitue une piste de recherche intéressante en vue d'une meilleure compréhension de la schizophrénie et du développement d'antipsychotiques plus efficaces, générant moins d'effets secondaires extrapyramidaux. Deux types d'études ont été effectués chez l'humain pour mieux comprendre l'altération de la transmission neurotensinergique dans la schizophrénie : 1) des études post-mortem visant à mesurer les concentrations tissulaires de NT, l'expression d'ARNm encodant la NT, ainsi que la densité des récepteurs neurotensinergiques dans le cerveau de patients schizophrènes; et 2) les mesures de la concentration de NT dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients schizophrènes, avant et après traitement avec des antipsychotiques.

Les études post-mortem n'ont pas réussi à démontrer clairement des changements des concentrations tissulaires de NT, tant au niveau cortical, striatal, hypothalamique qu'au niveau du système limbique, chez les patients schizophrènes comparativement à des sujets non-schizophrènes (Biggins et al., 1983; Nemeroff et al., 1983a,b; Roberts et al., 1983; Zech et al., 1986). De plus, ces études n'ont pas démontré de changement significatif dans le nombre de neurones dopaminergiques de l'aire tegmentaire ventrale (ATV) exprimant l'ARNm de la NT (Bean et al., 1992). Par ailleurs, des études visant à mesurer les sites de liaison de la NT marquée à ses récepteurs ont permis d'observer une augmentation de la densité des récepteurs neurotensinergiques dans la substance noire de patients sous traitement antipsychotique (Uhl et Kuhar, 1984), ainsi qu'une diminution du nombre des récepteurs de la NT dans le cortex préfrontal, le gyrus cingulaire (système limbique) et le noyau caudé par suite de l'arrêt des antipsychotiques chez des patients schizophrènes ayant subi un traitement de longue durée avec ces médicaments (Lahti et al., 1998).

La mesure des concentrations de NT dans le LCR de patients schizophrènes a suscité beaucoup d'intérêt, puisqu'elle permettait d'obtenir une évaluation non-invasive de l'état du système neurotensinergique chez des sujets humains vivants. En fait, bien que la NT soit retrouvée dans le SNC et le tractus gastro-intestinal en concentration mesurable dans le LCR et le plasma, il s'agit d'un peptide qui ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique et qui n'est donc pas filtré de la circulation sanguine par les plexus choroïdes pour se retrouver dans le LCR. Ainsi, les concentrations de NT mesurées dans le LCR reflètent la production de NT par le SNC et ne sont pas faussées par la NT présente dans la circulation systémique. Les analyses méticuleuses du groupe de Charles Nemeroff ont démontré la présence d'une concentration diminuée de NT dans le LCR d'un sous-groupe de patients

schizophrènes comparativement à un groupe de sujets non-schizophrènes (Widerlöv et al., 1982; Lindström et al., 1988; Nemeroff et al., 1989; Garver et al., 1991; Breslin et al., 1994; Sharma et al., 1997). La baisse de concentration de NT dans le LCR semble en relation avec une présentation clinique plus sévère de la schizophrénie, surtout pour ce qui est des délires et des hallucinations (Garver et al., 1991; Breslin et al., 1994; Sharma et al., 1997). Les concentrations de NT intrathécales des patients schizophrènes se normalisent par suite d'un traitement antipsychotique cliniquement efficace (Garver et al., 1991; Sharma et al., 1997). De plus, l'altération du système neurotensinergique semble relativement spécifique aux troubles psychotiques, puisque les concentrations intrathécales de NT ne sont pas perturbées dans d'autres pathologies neurologiques et psychiatriques comme la maladie d'Alzheimer, la dépression majeure et les troubles alimentaires (Nemeroff et al., 1989). Il faut retenir néanmoins que, pour l'instant, les données associant une perturbation des niveaux de NT dans le cerveau avec la schizophrénie ne sont que de nature corrélative.

3.2 Système neurotensinergique et antipsychotiques

3.2.1 Les antipsychotiques

Le début de la psychopharmacologie moderne a été marqué par la découverte, au début des années 1950, de deux molécules agissant comme antipsychotiques : la réserpine et la chlorpromazine. La réserpine provient d'un arbrisseau, le *Rauwolfia*, retrouvé en Inde ainsi que dans certaines régions de l'Afrique et de l'Amérique du Sud. Contrairement à la chlorpromazine, la réserpine n'est pas un antagoniste des récepteurs dopaminergiques, mais

agit plutôt par déplétion pré-synaptique des stocks d'amines biogènes et plus particulièrement ceux de la dopamine. La réserpine a été utilisée en clinique dans les années 1950, alors que l'approche pharmacologique des troubles psychotiques restait encore très limitée. De nos jours, avec le redoutable arsenal thérapeutique dont on dispose pour traiter les psychoses, la réserpine ne conserve qu'un intérêt historique étant donné ses effets secondaires (dépressions majeures, suicides) imputables à la déplétion généralisée en amines biogènes.

La chlorpromazine est une phénothiazine qui agit comme antagoniste des récepteurs dopaminergiques D₂. Cette molécule a été le premier antipsychotique à être synthétisé et à être largement utilisé dans le traitement des psychoses. Elle est considérée comme le précurseur des antipsychotiques classiques ou typiques. Depuis la découverte de la chlorpromazine, les efforts soutenus des chercheurs et des cliniciens ont permis le développement de plusieurs autres antipsychotiques. Ces médicaments sont couramment utilisés de nos jours dans le traitement des troubles psychotiques incluant la schizophrénie, le trouble schizophréniforme, le trouble psychotique bref, le trouble délirant, le trouble schizo-affectif, les épisodes de manie et de dépression majeure accompagnés de symptômes psychotiques, les psychoses secondaires (abus de substance, tumeur cérébrale ou démence de type Alzheimer), ainsi que les agitations sévères et les comportements violents⁸.

On regroupe généralement les antipsychotiques en deux grandes catégories : les antipsychotiques classiques ou typiques et les antipsychotiques atypiques. Les

⁸ Pour approfondir la présentation clinique de ces pathologies psychiatriques, consulter le *Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux*, 4^e édition (DSM-IV) édité par Masson, Paris, 1996 (pour la version française).

antipsychotiques typiques comprennent sept classes: 1) les phénothiazines (ex : chlorpromazine, fluphénazine, trifluopérazine, thioridazine); 2) les thioxanthènes (thiothixène); 3) les dibenzoxazépines (loxapine); 4) les dihydroindoles (molindone); 5) les butyrophénones (halopéridol); 6) les diphenylbutyl-pipéridines (pimozide); et 7) les benzamides (sulpiride). Ces antipsychotiques typiques peuvent également être classifiés selon leur efficacité clinique en trois grandes catégories : 1) antipsychotiques typiques de faible puissance (50 à 100 mg = 100 mg de chlorpromazine *per os*), tels que la chlorpromazine, le mésoridazine et le thioridazine; 2) antipsychotiques typiques de puissance modérée (10 mg = 100 mg de chlorpromazine *per os*), tels que la loxapine et la molindone; et 3) antipsychotiques typiques de puissance élevée (1 à 5 mg = 100 mg de chlorpromazine *per os*), tels que l'halopéridol, la fluphénazine et la trifluopérazine. Les antipsychotiques atypiques incluent principalement : la clozapine (une dibenzodiazépine), l'olanzapine (une thienobenzo-diazépine), la quétiapine (une dibenzothiazépine), la rispéridone (une benzisoxazole) et la ziprasidone (une dihydroindolone).

3.2.1.1 Distinction entre antipsychotiques typiques et atypiques

Les antipsychotiques typiques et atypiques se distinguent les uns des autres à plusieurs égards. Deux différences majeures entre ces deux catégories d'antipsychotiques expliquent leurs effets différents lors de leur utilisation en clinique : 1) les antipsychotiques typiques et atypiques n'agissent pas sur les mêmes voies dopaminergiques; et 2) les antipsychotiques typiques et atypiques ne possèdent pas la même affinité pour les différents types de récepteurs auxquels ils se lient.

Premièrement, les antipsychotiques typiques agissent sur les voies dopaminergiques mésocorticolimbique et nigrostriée, tandis que les antipsychotiques atypiques semblent agir préférentiellement sur la voie dopaminergique mésocorticolimbique. Ainsi, une administration chronique d'halopéridol engendre une diminution de l'activité électrophysiologique des neurones dopaminergiques de l'ATV et de la substance noire (White and Wang, 1983b; Grace and Bunney, 1986), alors qu'une administration chronique de clozapine ne cause une inhibition des décharges électriques que dans l'ATV seulement (Chiodo and Bunney, 1983; Hu and Wang, 1989). De plus, une administration aiguë d'antipsychotiques atypiques engendre une augmentation de la décharge électrique des neurones dopaminergiques dans l'ATV et non dans la substance noire (White and Wang, 1983a,b; Hand et al., 1987), ainsi qu'une augmentation de la libération de dopamine dans le NAcc et non dans le striatum (Stamford et al., 1988; O'Connors et al., 1989; Moghaddam and Bunney, 1990). Contrairement à l'administration chronique d'antipsychotiques, qui cause une inhibition de l'activité des neurones dopaminergiques, l'administration aiguë d'antipsychotiques engendre curieusement une augmentation de l'activité de ces neurones. Cette augmentation de la libération de DA est contraire à l'effet souhaité dans le traitement de la schizophrénie puisqu'une hypothèse est que, dans cette pathologie, il y ait une hyperactivité DAergique qu'on désire inhiber par un traitement antipsychotique. Cette différence entre l'administration aiguë et chronique de ces médicaments peut être expliquée par l'hypothèse, actuellement bien acceptée, stipulant que l'administration chronique d'antipsychotiques provoque un « blocage par dépolarisation » des neurones dopaminergiques à la suite d'un blocage prolongé des autorécepteurs dopaminergiques de la famille D₂ menant à une inactivation des canaux sodiques impliqués dans la genèse du potentiel d'action (Bunney and Grace, 1978). Ainsi, bien que le blocage des récepteurs soit

immédiat au début d'un traitement antipsychotique, l'effet antipsychotique désiré n'apparaît complètement qu'au bout de plusieurs semaines de traitement.

Deuxièmement, les antipsychotiques typiques et atypiques diffèrent grandement dans leur affinité respective pour les récepteurs auxquels ils se lient. Il est connu que ces deux classes d'antipsychotiques agissent principalement comme des antagonistes des récepteurs dopaminergiques de type D_2 . Puisque les récepteurs dopaminergiques D_2 sont bloqués par ces deux types d'antipsychotiques, il est raisonnable de supposer que les différences observées entre les effets des antipsychotiques typiques et atypiques proviennent d'une certaine implication d'autres récepteurs que le récepteur D_2 . À cet égard, plusieurs autres récepteurs ont été associés aux différences notées entre l'action des antipsychotiques typiques et atypiques. Ces récepteurs incluent les récepteurs sérotoninergiques $5-HT_{2A}$ (Meltzer et al., 1989), les récepteurs dopaminergiques de type D_4 (VanTol et al., 1991), les récepteurs α -adrénergiques (Svensson et al., 1995) et les récepteurs glutamatergiques (Olney and Farber, 1995). Dans ce contexte, deux hypothèses principales sont actuellement retenues pour expliquer les différences entre les effets des antipsychotiques typiques et atypiques. La première et la mieux acceptée stipule que la différence entre ces deux classes de médicaments découle de leurs différentes constantes de dissociation du récepteur D_2 , les antipsychotiques atypiques ayant une constante de dissociation plus rapide que les typiques. Cette caractéristique résulte en une affinité plus faible pour le récepteur D_2 des antipsychotiques atypiques par rapport aux typiques. Ainsi, les antipsychotiques typiques administrés aux doses thérapeutiques usuelles ont démontré une haute affinité pour les récepteurs D_2 , avec un taux d'occupation de ces récepteurs de plus de 70% (Farde et al., 1988; Kapur et al., 2000), alors que celui des antipsychotiques atypiques serait plutôt de

l'ordre de 50-60% (Kapur et al., 1999). La deuxième hypothèse suppose une affinité plus grande des antipsychotiques atypiques pour le récepteur sérotoninergique 5-HT_{2A}. Avancée par Meltzer et al. en 1989, cette hypothèse est actuellement moins répandue que la première (différence d'affinité des antipsychotiques pour le récepteur D₂). En fait, bien que les antipsychotiques atypiques aient une plus grande affinité pour le récepteur 5-HT_{2A} que pour le récepteur D₂, cette affinité pour le récepteur 5-HT_{2A} ne semble pas être le mécanisme d'action principal qui sous-entend leurs effets. Primo, certains antipsychotiques typiques (ex : loxapine) possèdent également un taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{2A} équivalent à celui des antipsychotiques atypiques (Kapur et al., 1997). Secundo, les antipsychotiques atypiques montrent un haut taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{2A} à des doses sous-thérapeutiques (doses ne générant donc pas un effet antipsychotique adéquat; Kapur et al., 1999). Tertio, certains antipsychotiques atypiques (ex : olanzapine, rispéridone) n'engendrent un effet thérapeutique efficace que lorsque le taux d'occupation des récepteurs D₂ dépasse 65%, confirmant l'importance du blocage de ces récepteurs dans l'activité antipsychotique de ces médicaments. De plus, l'utilisation de la fanansérine, un bloqueur du récepteur 5-HT_{2A}, n'exerce pas d'effet antipsychotique (cette molécule étant dépourvue d'action sur le récepteur D₂; Truffinet et al., 1999).

3.2.1.2 Effets secondaires des antipsychotiques

Le terme neuroleptique, également utilisé pour désigner les antipsychotiques, signifie « qui prend le nerf » et nous rappelle les effets neurologiques et moteurs produits par l'usage de ces médicaments. Les antipsychotiques sont utilisés pour contrôler les symptômes de la schizophrénie, bien qu'ils puissent générer des effets neurologiques

indésirables potentiellement graves. Parmi les effets secondaires usuellement rencontrés, mentionnons le parkinsonisme (tremblements, rigidité musculaire, posture corporelle en flexion, démarche à petits-pas, etc.), les dystonies aiguës, ainsi que l'akathisie (sentiment de gêne musculaire provoquant une agitation, une absence de repos et des passages incessants entre les positions debout et assise). De plus, avec un traitement à long terme, certains patients développent une dyskinésie tardive, qui peut être gravement invalidante et irréversible en raison des mouvements anormaux involontaires de nature choréo-athétosique touchant les muscles des membres et du tronc, ainsi que les muscles de la tête et du visage (mouvements de rotation et de protrusion de la langue, mâchonnements et translation latéro-latérale de la mâchoire, plissement des lèvres et grimaces). L'effet thérapeutique des antipsychotiques semble découler de leur action sur la voie dopaminergique mésocorticolimbique et notamment du blocage des récepteurs dopaminergiques (de type D₂ principalement) au niveau du NAcc et du cortex préfrontal (mécanisme d'action décrit il y a plus de trois décennies déjà; Matthysse, 1973; Snyder et al., 1974a; Seeman et al., 1976). En revanche, les effets secondaires extrapyramidaux résulteraient plutôt du blocage des récepteurs dopaminergiques (de type D₂) de la voie nigrostriée (Snyder et al., 1974a,b). En fait, une action bien connue des neurones dopaminergiques du striatum est l'inhibition de l'activité cholinergique dans cette région. L'usage chronique d'antagonistes des récepteurs dopaminergiques engendre donc une diminution de l'activité DAergique dans cette région et provoque une hyperactivité cholinergique qui semble responsable, au moins en partie, de l'apparition des effets secondaires reliés aux antipsychotiques (Marsden et al., 1975). D'ailleurs, la médication anticholinergique (trihexyphénidyl, benztropine, bipéridène, procyclidine) représente un traitement couramment utilisé pour atténuer les symptômes extrapyramidaux induits par les

antipsychotiques (surtout les antipsychotiques typiques étant donné qu'ils agissent sur la voie nigrostriée principalement reliée à l'apparition des effets secondaires).

Les antipsychotiques atypiques ont été largement utilisés dans les dernières années, étant donné leur tendance à générer moins d'effets secondaires que les antipsychotiques typiques. Toutefois, les antipsychotiques typiques, bien que prescrits moins fréquemment depuis l'arrivée des antipsychotiques atypiques, demeurent le traitement de choix dans certaines situations cliniques telles que les agitations sévères, l'hostilité, l'irritabilité extrême et l'absence de contrôle des impulsions. Ces antipsychotiques typiques sont préférés dans ces situations pour deux raisons : 1) ils possèdent en général des propriétés sédatives plus puissantes que les antipsychotiques atypiques, ce qui représente l'effet escompté dans ces situations particulières; et 2) si les patients refusent le traitement *per os*⁹, les antipsychotiques typiques peuvent être administrés par voie parentérale (ex : halopéridol intra-musculaire), ce qui n'est pas le cas des antipsychotiques atypiques, à l'exception du Zyprexa Zydis[®], qui contient de l'olanzapine sous forme de « dissolution rapide » dans la bouche et qui peut représenter une alternative chez les patients refusant d'avaler les comprimés d'antipsychotiques. Toutefois, le Zyprexa Zydis[®] n'est disponible aux États-Unis que depuis quelques années, et est non encore utilisé dans les centres psychiatriques du Québec.

⁹ Durant mes deux années d'externat en médecine, j'ai suivi deux stages de psychiatrie à l'Unité de Soins Intensifs Psychiatriques (USIP) du pavillon Albert-Prévost (Hôpital Sacré-Cœur) ainsi qu'à l'hôpital Louis-H. Lafontaine. J'ai pu aussi constater que les patients en agitation sévère/psychose aiguë refusent presque tous la médication *per os*... autant ceux du Nord que du Sud de la ville! L'administration parentérale d'antipsychotiques devient donc inévitable.

3.2.2 NT et antipsychotiques

Dans le SNC, les effets pharmacologiques de la NT ressemblent à ceux des antipsychotiques (ou neuroleptiques), ce qui a amené certains auteurs à considérer la NT comme un neuroleptique endogène (Nemeroff, 1980, 1986; Ervin and Nemeroff, 1988; Kitabgi, 1989). De plus, tout comme ils agissent sur le système dopaminergique, les antipsychotiques exercent également un effet sur le système neurotensinergique : les antipsychotiques typiques semblent agir sur les systèmes neurotensinergiques mésolimbique et nigrostrié, alors que les antipsychotiques atypiques agissent plutôt sur le système neurotensinergique mésolimbique seulement (Kilts et al., 1988; Merchant et al., 1992a,b et 1994a,b; Merchant and Miller, 1994). Ainsi, l'administration d'antipsychotiques typiques et atypiques engendre une augmentation des concentrations de NT et de l'expression d'ARNm encodant la NT dans le NAcc, alors que seuls les antipsychotiques typiques génèrent une augmentation des concentrations tissulaires de NT et de l'expression d'ARNm encodant ce peptide dans le noyau caudé et le putamen (Levant et al., 1991a,b et 1992; Zahm et al., 1996, 1998; Kinkead et al., 1997, 2000a,b). Du fait que les antipsychotiques typiques causent le plus d'effets secondaires, ces observations ont conduit à l'hypothèse selon laquelle, à l'instar du système dopaminergique, le système neurotensinergique mésolimbique serait relié à l'effet thérapeutique des antipsychotiques alors que le système neurotensinergique nigrostrié serait plutôt relié aux effets secondaires de ces médicaments.

Puisque la NT semble agir comme un antipsychotique endogène, plusieurs questions fondamentales concernant ce peptide ont été soulevées : est-ce que la NT peut servir

d'antipsychotique « exogène », et est donc d'utilité clinique dans le traitement des troubles psychotiques? Si oui, quelle serait l'efficacité de ce peptide par rapport aux antipsychotiques typiques et atypiques dans le contrôle des symptômes positifs et négatifs de la schizophrénie? Causerait-il plus ou moins d'effets secondaires que les antipsychotiques existants? Pour répondre à ces questions, plusieurs études comportementales visant à comparer la NT aux antipsychotiques ont été effectuées, sur des modèles animaux qui permettent d'évaluer deux paramètres : 1) l'efficacité du traitement antipsychotique à contrôler certains comportements qui s'apparentent aux symptômes observés chez les patients schizophrènes, tels l'hyperactivité locomotrice, les stéréotypies (léchages, reniflements, bâillements mordillements), ainsi que les troubles de la pensée et la fragmentation cognitive (engendrés par une altération de la capacité de triage interne des stimuli neurosensoriels et une difficulté à maintenir une attention sélective tels que nous le détaillerons ci-bas); et 2) l'induction par le traitement antipsychotique de comportements s'apparentant aux effets secondaires moteurs observés chez l'humain après un traitement antipsychotique, tels la catalepsie et les mouvements de mâchonnement involontaires.

Ces études laissent supposer que le système neurotensinergique soit impliqué dans le contrôle de certains comportements animaux qui s'apparentent aux symptômes de la schizophrénie observés chez l'humain. Nous mentionnerons trois de ces comportements principaux : 1) l'hyperactivité locomotrice; 2) les stéréotypies; et 3) l'altération de la capacité de triage des stimuli neurosensoriels, ainsi que de la capacité de maintenir une attention sélective.

Premièrement, la NT mime l'effet antidopaminergique (via les récepteurs D₂) des antipsychotiques et inhibe l'hyperactivité locomotrice engendrée par une stimulation du système dopaminergique. Ainsi, tout comme l'administration périphérique d'antipsychotiques, l'administration de NT dans le LCR bloque l'hyperactivité locomotrice induite par l'administration d'apomorphine, d'amphétamine, de cocaïne et de méthylphénidate (Kalivas et al., 1986; Sarhan et al., 1997). Cet effet de la NT semble être médié par le système neurotensinergique mésolimbique, puisque des injections de NT dans le NAcc inhibent l'hyperactivité locomotrice induite par ces stimulants (Kalivas et al., 1981, 1982, 1983; Nemeroff et al., 1983a,b). De plus, la NT possède également la capacité de diminuer l'activité locomotrice spontanée (sans l'administration de psychostimulants) (Nemeroff et al., 1977; Jolicoeur et al., 1983).

Deuxièmement, il est connu que les stéréotypies induites par les agonistes dopaminergiques, telles que les bâillements, les léchages, les reniflements ou les mordillements, sont bloquées par les antipsychotiques typiques et ne le sont pas par les antipsychotiques atypiques (Costall and Naylor, 1976; Ljungberg et Ungerstedt, 1978). Contrairement aux antipsychotiques typiques, la NT n'inhibe pas les stéréotypies induites par l'apomorphine ou l'amphétamine (Ervin et al., 1981; Cusack et al., 2000). Ainsi, l'effet pharmacologique de la NT au niveau comportemental semble ressembler à celui des antipsychotiques atypiques plutôt que typiques.

Troisièmement, ce sont les effets de la NT sur la perturbation du triage des afférences neurosensorielles observée dans la schizophrénie qui ont été étudiés. En fait, un déficit de triage et de classement des stimuli neurosensoriels, ainsi qu'une altération de la capacité de

maintenir une attention soutenue, semblent être responsables des troubles de la pensée et de la fragmentation cognitive observés chez les patients schizophrènes (McGhie and Chapman, 1961; Freedman et al., 1991). Afin d'évaluer cette habileté à trier l'information neurosensorielle, plusieurs modèles expérimentaux ont été développés, dont le principal représentant est l'inhibition du réflexe de sursaut induit par un signal sonore par suite d'un pré-conditionnement avec un signal sonore¹⁰. Ainsi, chez les sujets normaux, ce réflexe de sursaut induit par un signal sonore élevé est significativement inhibé lorsque ce signal est immédiatement précédé d'un autre signal sonore plus faible. En contraste, l'inhibition de ce réflexe de sursaut après un conditionnement est altérée chez les patients schizophrènes étant donné leurs difficultés à trier l'information neurosensorielle et à maintenir une attention sélective et soutenue (Swerdlow and Geyer, 1998). Le traitement antipsychotique semble normaliser l'inhibition du réflexe de sursaut après un conditionnement chez les patients schizophrènes (Braff et al., 1999; Kumari et al., 1999, 2000). Chez l'animal, ce modèle a également été testé et s'est avéré valide et extrêmement utile pour évaluer l'effet des traitements pharmacologiques (ex : antipsychotiques, NT) sur l'habileté à trier les afférences neurosensorielles (Swerdlow et al., 1999). Ainsi, l'administration d'amphétamine altère la performance des animaux dans ce modèle alors que les antipsychotiques typiques et atypiques améliorent cette performance (Swerdlow and Geyer, 1998). De plus, l'altération de la performance des animaux induite par l'amphétamine est bloquée par l'administration d'antipsychotiques (Feifel et al., 1997). Cet effet est également observé par suite de l'administration de faibles doses de NT (Feifel et al., 1997).

¹⁰ Dans la littérature scientifique anglophone, ce réflexe est appelé le « prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle reflex ».

L'implication du système neurotensinergique dans l'induction de comportements animaux s'apparentant aux effets secondaires des antipsychotiques chez l'humain a également été examinée, qu'il s'agisse de la catalepsie ou des mouvements de mâchonnement involontaires.

La catalepsie est caractérisée par de la rigidité musculaire, une immobilité motrice, ainsi qu'une posture anormale; elle est considérée comme le modèle animal des effets secondaires « aigus » observés après un traitement antipsychotique. Contrairement aux antipsychotiques atypiques, les antipsychotiques typiques induisent les symptômes de catalepsie (Worms et al., 1983; Shibata et al., 1987). Les antipsychotiques atypiques semblent même posséder un effet protecteur contre la catalepsie causée par les antipsychotiques typiques, puisque l'administration de clozapine bloque l'effet cataleptogène induit par l'halopéridol chez le rat (Ward and Dorsa, 1999). Ici encore, la NT s'apparente aux antipsychotiques atypiques plutôt que typiques. L'administration périphérique d'agonistes des récepteurs neurotensinergiques (des fragments peptidiques modifiés pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique) n'induit pas de catalepsie (Sarhan et al., 1997). De plus, ces agonistes neurotensinergiques miment l'effet de la clozapine en bloquant la catalepsie induite par l'halopéridol (Cusack et al., 2000).

Les mouvements de mâchonnement involontaires apparaissent après une administration « chronique » d'antipsychotiques et représentent le modèle animal de la dyskinésie tardive. Les mouvements de mâchonnement involontaires sont principalement observés avec l'administration d'antipsychotiques typiques et à un plus faible degré après l'administration de clozapine. La NT semble potentialiser l'induction par les

antipsychotiques de ces mouvements de mâchonnement involontaires. Ainsi, l'injection dans le LCR de NT induit ces mouvements après l'administration chronique d'une faible dose de fluphénazine chez le rat, bien que cette même dose de fluphénazine ne génère aucun effet en absence de NT (Stoessl and Szczutkowski, 1991; Stoessl, 1995). À l'inverse, l'administration de l'antagoniste des récepteurs neurotensinergiques SR48692 inhibe l'apparition de ces mouvements de mâchonnement involontaires induits par les antipsychotiques (Stoessl, 1995).

3.3 Système NTergique et autorécepteur DAergique D₂

L'autorécepteur D₂ est exprimé par les neurones des voies dopaminergiques mésocorticolimbique et nigrostriée. Le dérèglement de la transmission dopaminergique au sein de ces faisceaux est associé à l'apparition de maladies importantes telles que la schizophrénie et la maladie de Parkinson. L'autorécepteur D₂ est localisé sur les neurones dopaminergiques de ces voies au niveau somatodendritique et axo-terminal. Ce récepteur joue un rôle majeur dans la régulation de la libération de DA et son activation par des agonistes tels que la dopamine, le quinpirole ou l'apomorphine inhibe la relâche dopaminergique. Par ailleurs, la régulation de la libération de DA par l'autorécepteur D₂ est perturbée par l'usage d'antipsychotiques, ces médicaments étant des antagonistes du récepteur D₂. Ces observations sont autant de raisons de s'intéresser à l'autorécepteur D₂ et son interaction avec d'autres systèmes de neurotransmetteurs, tel le système neurotensinergique.

Bien que l'inhibition de la libération de DA par l'autorécepteur D₂ constitue un mécanisme de régulation majeur de la relâche dopaminergique, il existe plusieurs autres modulateurs de la libération de dopamine. Un de ces principaux modulateurs est la neurotensine. Premièrement, tel que nous l'avons détaillé dans les sections précédentes, la NT et les récepteurs neurotensinergiques sont principalement localisés dans les régions recevant une forte innervation dopaminergique. Deuxièmement, la NT semble être impliquée dans certaines pathologies intimement associées à une dysfonction du système dopaminergique, telles que la schizophrénie et la maladie de Parkinson. Troisièmement, plusieurs études comportementales et physiologiques ont démontré des similitudes importantes entre l'effet pharmacologique de la NT et celui des antipsychotiques, qui agissent principalement comme antagonistes dopaminergiques. Ainsi, il existe de nombreuses données suggérant une interaction entre la NT et le système dopaminergique. Malgré ces données, le mécanisme moléculaire impliqué dans la modulation de la libération de DA par la NT demeure obscur.

La NT exerce son effet de modulateur de la transmission dopaminergique en facilitant la libération de DA. Ainsi, l'application de NT dans l'ATV (au niveau somatodendritique) augmente la décharge des neurones dopaminergiques et facilite la libération de DA dans le NAcc (au niveau terminal) (Shi and Bunney, 1991; Sotty et al., 2000). Cette facilitation de la libération de DA par la NT pourrait être due à une excitation directe des neurones dopaminergiques par la NT. Ceci est d'autant plus plausible que la NT est reconnue comme étant capable d'induire l'ouverture de canaux cationiques sur la membrane plasmique des neurones dopaminergiques (Farkas et al., 1996, 1997). Cette excitation des neurones dopaminergiques par la NT pourrait aussi être expliquée par une interaction NT-

autorécepteur D₂. En effet, une diminution de l'efficacité du récepteur D₂ par la NT pourrait atténuer l'inhibition de la libération de DA par ce dernier et augmenter ainsi l'excitabilité des neurones dopaminergiques. À cet égard, utilisant des tranches de cerveau de rat comprenant l'ATV et la SNc, Werkman et al. (2000) ont noté que l'application de NT (8-13) dans ces régions dopaminergiques somatodendritiques augmente la décharge des neurones dopaminergiques autant dans l'ATV que dans la SNc. De plus, dans cette étude, l'application de quinpirole seul (un agoniste sélectif du récepteur D₂) a significativement inhibé la décharge des neurones dopaminergiques. En présence de NT (8-13), cette inhibition par le quinpirole de la décharge des neurones dopaminergiques a toutefois été réduite d'environ 60% (Werkman et al., 2000). De plus, cette diminution par la NT (8-13) de l'efficacité du quinpirole à inhiber la décharge neuronale a été complètement bloquée par l'antagoniste des récepteurs neurotensinergiques SR142948A. Ces observations indiquent qu'au niveau somatodendritique, la NT agit sur les récepteurs neurotensinergiques pour induire, par un mécanisme pour l'instant inconnu, une diminution de l'efficacité des autorécepteurs D₂ à inhiber la libération de dopamine.

Sachant que la NT facilite la décharge des neurones dopaminergiques en inhibant l'activité des autorécepteurs D₂ au niveau somatodendritique, une question importante se pose à savoir si la NT agit par un mécanisme similaire dans les régions terminales. À cet effet, utilisant des cultures de neurones dopaminergiques de l'ATV (co-libérant la DA et le glutamate), Legault et al. (2002) ont démontré que l'application de NT seule n'augmente pas la libération du co-transmetteur glutamate par les terminaisons synaptiques de ces neurones. Ces auteurs ont cependant remarqué que la NT diminue la capacité d'un agoniste de l'autorécepteur D₂, le quinpirole, à inhiber la libération de glutamate par ces neurones.

Bien que n'examinant pas directement la libération de dopamine, ces résultats favorisent l'hypothèse voulant que l'activation du récepteur NTR₁ sur les terminaisons des neurones dopaminergiques dans le striatum puisse diminuer l'efficacité des autorécepteurs D₂, désinhibant ainsi la libération de DA.

4. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Nous avons étudié les effets de la NT sur la libération de DA et sur l'efficacité de l'autorécepteur D_2 à inhiber la relâche dopaminergique dans des tranches du NAcc de rat. À cette fin, nous avons utilisé la technique de voltamétrie cyclique pour mesurer la libération de DA induite par une salve de stimulations (10Hz, 30 stimulations) ainsi que par des stimulations uniques. À la différence d'un stimulus unique, nous avons constaté que la salve de stimuli génère une libération importante de DA et mène à une activation significative des autorécepteurs D_2 . Ainsi, nous avons pu comparer les effets de l'application de NT dans une condition où l'autorécepteur D_2 est peu actif (stimulation unique) et dans une condition où il est fortement activé (salve de stimulations).

Ce travail est présenté sous forme d'article dans la prochaine section.

ARTICLE

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification

Charbel Simon Fawaz,
Inscrit au programme de M.Sc. en Sciences neurologiques.

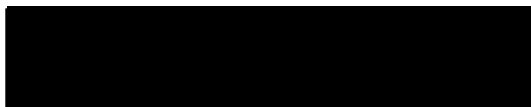
2. Description de l'article

Presynaptic action of Neurotensin on Dopamine release through D₂ receptor inhibition
Charbel Simon Fawaz, Philippe Martel and Louis-Éric Trudeau

Cet article sera soumis au *Journal of Neuroscience*.

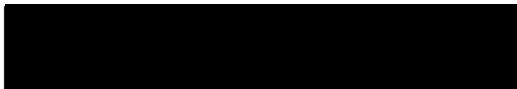
3. Déclaration des coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Charbel Simon Fawaz inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Étude du mécanisme de facilitation de la libération de dopamine par la neurotensine ».



Dr Louis-Éric Trudeau

27 mars 2006
Date



Philippe Martel

27 mars 2006
Date

PRESYNAPTIC ACTION OF NEUROTENSIN ON DOPAMINE RELEASE THROUGH D₂ RECEPTOR INHIBITION

Charbel Simon Fawaz, Philippe Martel and Louis-Éric Trudeau*

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, QC, H3C 3J7,
Canada

*: Corresponding author at:

Department of pharmacology
Faculty of Medicine
Université de Montréal
Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7
Tel: 1-514-343-5692
Fax: 1-514-343-2291
E-mail: [REDACTED]

Keywords: Neurotensin, dopamine, axon terminal, fast-cyclic voltammetry, nucleus accumbens, brain slice

Acknowledgments: This work was supported by a grant from NSERC to L.-E. Trudeau. L.-E. Trudeau is supported by a senior scholar award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Charbel Simon Fawaz received support from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), delivered by way of the Summer Scholarship Program of the Université de Montréal. We wish to thank Marie-Josée Bourque for her advices on drug preparations and maintenance, Shouwei Yang for his helpful suggestions for preparing brain slices and Drs. Pierre-paul Rompré and Laurent Descarries for their comments on an earlier version of this manuscript.

ABSTRACT

Neurotensin (NT) is known to act on dopaminergic neurons at the somatodendritic level to regulate cell firing and enhance dopamine (DA) release. In addition, anatomical and indirect physiological data suggest the presence of NT receptors at the terminal level. However, a clear demonstration of the mechanism of action of NT on dopaminergic axon terminals is still lacking. To address this issue, we used fast-cyclic voltammetry (FCV) to monitor in real time the synaptic release of DA in the nucleus accumbens (NAcc). DA release was evoked by single electrical pulses and pulse trains (10 Hz, 30 pulses). Under these two stimulation conditions, we evaluated the characteristics of DA D₂ autoreceptors and the presynaptic action of NT in the NAcc. The selective agonist of D₂ autoreceptors, quinpirole (0.5-1 μM), inhibited DA overflow evoked by both single and train pulses in a concentration-dependent manner. In sharp contrast, the selective D₂ receptor antagonist, sulpiride (5 μM), strongly enhanced DA release triggered by pulse trains, without any effect on DA release elicited by single pulses. We then determined the effect of NT (8-13) (100 nM) and found that although NT fails to increase DA release evoked by single pulses, it strongly enhances DA release evoked by pulse trains that lead to more substantial DA release and engage D₂ autoreceptors. In addition, blockade of D₂ autoreceptors by sulpiride considerably inhibited the facilitation of DA release generated by NT (8-13). Taken together, these data suggest that NT enhances DA release principally by inhibiting the function of terminal D₂ autoreceptors.

INTRODUCTION

Neurotensin (NT) is a 13 amino acid peptide originally isolated from bovine hypothalamus (Carraway and Leeman, 1973). It is found in the central nervous system (CNS) and gastrointestinal tract. In the CNS, NT acts as a neurotransmitter or neuromodulator (McCarthy et al., 1979; Stowe and Nemeroff, 1991; Beaugard et al., 1992) and one of its better known actions is to modulate dopaminergic transmission within the mesolimbic and nigrostriatal pathways (Rostène et al., 1992). In addition, a number of studies suggest that NT may be implicated in the pathophysiology of CNS disorders including schizophrenia, Parkinson's disease and drug abuse (Garver et al., 1991; Rostène et al., 1992; Lambert et al., 1995; Rompré and Perron, 2000).

Considerable efforts have been made to characterize how NT acts at the somatodendritic level to enhance dopamine (DA) release. When applied to the ventral tegmental area (VTA), NT increases the firing rate of DA neurons and DA release in terminal fields of the nucleus accumbens (NAcc) and the prefrontal cortex (Kalivas and Duffy, 1990; Shi and Bunney, 1991; Sotty et al., 1998, 2000). Moreover, acute microinjection of NT into the VTA enhances motor activity and facilitates dopamine-dependent behaviors (Elliott and Nemeroff, 1986; Kalivas and Duffy, 1990; Sotty et al., 1998; Rompré and Perron, 2000). At a mechanistic level, recent work has established that somatodendritic NT receptors enhance the firing rate of DA neurons through a Ca^{2+} -dependent mechanism (St-Gelais et al., 2004).

At the terminal level, NT also acts to enhance DA release. First, anatomical evidence for a presynaptic localization of NT receptors has been provided (Quirion et al., 1985; Dilts and Kalivas, 1989; Schotte and Leysen, 1989). Second, NT facilitates K⁺-evoked and electrically-evoked DA release in a Ca²⁺-dependent but TTX-independent manner in striatal slice preparations (Hetier et al., 1988; Faggin and Cubeddu, 1990; Heaulme et al., 1997) as well as *in vivo* (Ferraro et al. 1995, 1997). These results support a presynaptic effect of NT on DA neuron axon terminals, but previous studies have not excluded an indirect mechanism of action. Recent work performed on cultured DA neurons releasing glutamate as a cotransmitter failed to provide support for a direct excitatory effect of NT on dopaminergic axon terminals (Legault et al., 2002). Rather, these authors found that NT enhances glutamate release from DA neurons by inhibiting the function of presynaptic D₂ autoreceptors. Whether this also occurs *in vivo* for DA release is currently undetermined, but a previous preliminary report failed to detect an enhancement of DA release evoked by single electrical pulses in striatal slices (Bull and Sheehan, 1991). Thus, the mechanism of action of NT on dopaminergic axon terminals remains unclear.

In the present study, we used fast-cyclic voltammetry (FCV) to better characterize the presynaptic action of NT in the NAcc. We find that although NT fails to increase DA release evoked by single pulses, it strongly enhances DA release evoked by pulse trains that lead to more substantial DA release and engage D₂ autoreceptors. Our results suggest that NT acts to enhance DA release by inhibiting the function of terminal D₂ autoreceptors.

MATERIALS AND METHODS

Animals and slice preparation

Experiments were performed in accordance with the Université de Montréal animal ethics committee guidelines. All efforts were made to minimize the number of animals sacrificed and their suffering. Sprague Dawley rats aged 4 to 6 weeks were used. They were housed under controlled temperature, lighting and humidity.

Rats were lightly anesthetized with halothane (Halothane B.P., MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON) and decapitated. Their brains were rapidly removed and transferred into ice-cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing: 125.2 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 0.3 mM anhydrous KH₂PO₄, 2.4 mM anhydrous CaCl₂, 1.3 mM anhydrous MgSO₄ and 10 mM D-glucose. Afterwards, NAcc brain slices were cut on a VT 1000s vibratome (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) at 400 µm thickness. The brain slice was separated into right and left sections at the mid-sagittal line after transfer to a holding chamber. Slices were allowed to recover for 1 hour at room temperature in the holding chamber in oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) aCSF. Slices were then transferred to a custom-built recording chamber and perfused (1 mL/min) with aCSF at 35°C.

Electrode fabrication and calibration

Carbon fibre electrodes of 5 µm diameter were fabricated according to procedures described by Kawagoe et al. (1991, 1992, 1993) and by Kuhr and Wightman (1986). The

fabrication procedure was adapted to optimize DA detection with our experimental setup. Eleven to 12 cm long carbon fibres (Cytec's Thornel, Greenville, SC) were inserted into borosilicate glass capillaries (1.2 mm external diameter \times 0.68 mm internal diameter \times 10 cm, A-M Systems, Carlsborg, WA) using an aspiration device. The borosilicate capillaries were then pulled using a P-2000 model micropipette puller (Sutter instruments, Novato, CA) thus making 2 carbon fibre electrodes with each borosilicate capillary. The carbon fibre was cemented in place by using a 2 component epoxy system (Epoxy technology, Billerica, MA). Afterwards, electrodes were placed into an oven and heated to 95°C for at least 24 to 48 hours. After curing, the carbon fibre tip was cut allowing approximately 100 to 200 μ m of the carbon fibre to extend beyond the borosilicate/epoxy junction. Electrodes were backfilled with a 4.0 M potassium acetate solution.

Carbon fibre electrodes were calibrated in an aCSF solution. The electrode was first conditioned for at least 30 minutes to permit stabilization of the recorded current. The background current ranged from 50 to 180 nA while the peak of the background-subtracted current obtained in the presence of 1 μ M DA (Fig. 1) varied between 3 and 8 nA. Electrodes failing to correspond to these characteristics were re-cut and retested or simply rejected. Calibration of the electrode was performed both before and after brain slice recordings for conversion of the current recorded into DA concentrations.

Electrochemical recordings

Fast-scan cyclic voltammetry was used to monitor DA release (Armstrong, James and Millar, 1979; Garriss and Wightman, 1995). A triangular voltage waveform (-400 to +1000 mV at a rate of 300 V/sec) was applied to the electrode every 100 msec and was computer-controlled using Clampex 9 software and a Digidata 1200 analog to digital converter (Axon Instruments, Union City, CA). This voltage ramp was applied to the electrode via an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Union City, CA) in voltage-clamp mode. The lowpass Bessel filter was set at 2 kHz. The background-subtracted voltammograms were used for calibration and to identify the released substance. Calibration was performed for each working electrode before and after the experiment in a 1 μ M DA solution. This allowed conversion of the recorded currents into DA concentrations. The released substance was clearly identified as DA since the oxidation currents recorded were obtained at the peak oxidation potential for DA (\sim +600 mV).

Electrical stimulation

Single pulse or train pulse electrical stimulations were computer-triggered and were generated by an S-900 stimulator (Dagan, Minneapolis, MN). Stimulations were applied to the NAcc brain slice through a twisted bipolar tungsten stimulation electrode (Plastics One, Roanoke, VA). The Teflon-coat at the tip of the stimulating electrode was carefully uncovered. The 2 stimulating electrode tips were separated by 100 to 150 μ m and were gently placed on the surface of the NAcc brain slice using a micromanipulator (Newport, Fountain Valley, CA). Single-pulse and train-pulse stimuli (10 Hz, 30 pulses) were then

generated to evoke DA release. Pulse duration was 1000 μsec for single pulses and 100 μsec for train pulses. Pulse amplitude was 400 μA for both single and train pulses.

Experimental design

The recording chamber was placed under a Faraday cage mounted on an anti-vibration pneumatic table. The chamber was installed under an MZ75 model stereomicroscope (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) and connected to a temperature-controlled perfusion and aspiration system. All perfusions were applied with a flow rate of 1 mL/min. Slices were stabilized in the recording chamber using a home-made net fabricated using platinum wire (World Precision Instruments, Sarasota, FL) as a frame. The carbon fibre electrode was then inserted $\sim 75 \mu\text{m}$ into the slice by a piezoelectric micromanipulator (Burleigh Instruments, Victor, NY) and placed at approximately 100 μm in front of the central position of the stimulating electrode tips. After insertion of the carbon fibre electrode, the slice was allowed to recuperate for several minutes before starting recordings. Electrical stimulations were applied at intervals of 2 minutes throughout the experiment. The first 10 minutes (6 stimulations) served as a control period. Drugs were administered immediately after stimulation number 6 and their effects monitored for a period of up to 26 minutes depending on their duration of action.

Drugs and chemicals

Chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO) except for tetrodotoxin (TTX) (Alomone laboratories, Jerusalem, Israel). The 8-13 fragment of NT was used as a

NT receptor agonist in the present experiments. Most drugs were stored in aliquots at -20°C as stock solutions. For final solutions, drugs were dissolved into aCSF immediately before use. Calcium, magnesium and glucose were freshly added to the aCSF, which was pre-oxygenated before use.

Statistical analysis

Data are always provided as mean \pm SEM, with n representing the number of slices. Statistical analysis was performed by SigmaStat 2.0 software (SPSS Science, Chicago, IL). Simple two group comparisons were assessed using Student's paired t -test. Otherwise, multiple group means were compared by analyses of variance (ANOVA), followed by a Tukey *post hoc* test. The minimal significance level for tests was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Time course of evoked DA overflow in the nucleus accumbens

Fast-cyclic voltammetry was used to monitor DA release at high time resolution in NAcc slices. We recorded DA overflow that followed single-pulse and train-pulse stimulations. In the NAcc, DA overflow was evoked by single pulses (400 μ A, 1 msec) and by trains of 30 pulses delivered at 10 Hz (Fig. 1). First, with train stimulation, DA concentrations peaked at $1.13 \pm 0.18 \mu$ M (n=5). DA concentrations rose to a maximum within 405 ± 67 msec (n=5) (time from stimulus onset to signal peak). The return to baseline was reached after approximately 6 seconds and the signal width at half-height was 2.21 ± 0.30 sec (n=5). In general, signal kinetics were stable during the first 36 minutes with stimulations delivered at two minutes intervals. Recording for more than 36 minutes showed a slow but gradual fall in the maximum DA concentrations recorded and a rise in the signal width at half-height, probably due to tissue damage caused by repeated stimulations. In addition, the peak DA levels recorded differed greatly between aCSF perfusion and the drug treatments (NT, sulpiride, TTX, etc.), whereas the rise time of the signal and the signal width at half-height were similar between these conditions. Second, with single-pulse parameters, DA levels reached a peak at $0.48 \pm 0.09 \mu$ M (n=5). DA concentrations rose to their maximum within 226 ± 18 msec (n=5). The return to baseline was observed after approximately one second and the signal width at half-height was 363 ± 42 msec (n=5). Student's paired *t*-test performed on individual means showed a significant difference between time courses of DA overflow evoked by single and train pulses at three

levels: the peak DA levels reached ($t = 5.54$, $p < 0.001$), the rise time to maximum levels ($t = 2.09$, $p < 0.02$) and the signal width at half-height ($t = 4.88$, $p < 0.001$).

As expected, the release of DA evoked by electrical stimulation of the NAcc was both dependent on the generation of action potentials and calcium-dependent. In the presence of the sodium channel blocker TTX ($1 \mu\text{M}$), the peak DA concentrations evoked by pulse train stimulation fell to $15.3 \pm 8.2 \%$ ($n=3$) of basal values (Fig. 2), a value which essentially represented baseline noise (paired t -test; $t = 2.74$, $p < 0.02$). Evoked release was also calcium-dependent since decreasing calcium to 0.5 mM and 0 mM reduced peak responses to $17.2 \pm 11.0 \%$ ($n=6$; paired t -test; $t = 4.63$, $p < 0.001$) and $10.5 \pm 6.4 \%$ ($n=2$), respectively (Fig. 2). Washout of these effects was rapid for low calcium solutions, while recovery of release after TTX required a more extended period of time (not shown).

Facilitation of terminal DA release by NT

We next evaluated the effect of NT on electrically-evoked DA accumulation in the NAcc. Using single electrical pulses, we found that NT (8-13) (100 nM) failed to alter DA overflow ($96.7 \pm 8.0 \%$ of control; Student's paired t -test, $t = 0.17$, $p > 0.05$, $n=5$), suggesting that DA release is not directly facilitated by NT (Fig. 3A). We next switched back to 3s pulse trains at 10 Hz . After a control period of 10 minutes ($T=0$ to $T=10$), NT was introduced in the bath for a period of 8 minutes ($T=10$ to $T=18$) (Fig. 3B). NT perfusion strongly enhanced train-evoked DA overflow to $143.1 \pm 6.8 \%$ of control values (the peak DA levels recorded in presence of NT were $1.47 \pm 0.10 \mu\text{M}$) (Student's paired t -

test, $t = 4.52$, $p < 0.001$ compared to the baseline period, $n=13$). The peak DA concentrations recorded were obtained 6 minutes after the beginning of NT perfusion (at $T=16$) and represented an enhancement of DA release of 43.1 ± 6.8 % compared to the control values. NT application for a further period of time did not induce an additional increase of DA levels. On the contrary, DA concentrations recorded 8 minutes after NT in the bath ($T=18$) showed a significant decrease in DA levels compared to $T=16$ and represented only 120.6 ± 3.4 % of the baseline level ($n=13$). A two-way ANOVA confirmed significant differences between DA levels recorded during the control period (DA levels recorded in absence of NT), and at $T=16$ and $T=18$ (in the presence of NT) ($F = 5.49$, $p < 0.001$). This observation of a short-lasting facilitation is compatible with the known ability of NT receptors to desensitize in response to sustained stimulation (DiPaola and Richelson, 1990; Castel et al., 1991; Beaudet et al., 1994; Faure et al., 1995).

Quantification of DA release modulation by D₂ autoreceptors

Previous data have suggested that NT receptor activation may decrease terminal D₂ receptor function (Tanganelli et al., 1989; Shi and Bunney, 1991; von Euler et al., 1991; Legault et al., 2002). One interpretation of the ability of NT to facilitate train-evoked but not single pulse-evoked DA overflow is therefore that NT facilitates DA overflow by inhibiting the function of terminal D₂ autoreceptors. This would imply that D₂ autoreceptors are engaged during train but not single pulse stimulation. To evaluate this hypothesis, we next quantified evoked DA overflow using selective agonists and antagonists of D₂ autoreceptors. Activation of D₂ receptors by quinpirole (0.5 and 1 μ M)

inhibited pulse train-evoked DA overflow in a concentration-dependent manner (Fig. 4A). Quinpirole 0.5 μM lowered DA levels to 47.0 ± 1.7 % of basal values ($n=3$), while 1 μM reduced DA levels to 27.9 ± 2.5 % of baseline ($n=3$). A one-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test confirmed a significant difference between each of these three values ($F = 6.28$, $p < 0.001$). Using single pulses, DA overflow was reduced to 22.6 ± 1.8 % of basal values by 0.5 μM quinpirole ($n=6$) and to 13.0 ± 3.8 % of basal values by 1 μM quinpirole ($n=5$) (Fig. 4B).

We next studied the effect of sulpiride (5 μM), a D_2 receptor antagonist, on evoked DA overflow. DA overflow in response to single pulses was unchanged after application of sulpiride (95.1 ± 1.9 % of basal values, $n=4$) (Fig. 4B). In contrast, sulpiride strongly enhanced DA release triggered by pulse trains (176.4 ± 5.3 % of control, $n=8$; Student's paired t -test, $t = 4.30$, $p < 0.001$) (Fig. 4A). These results suggest that unlike single pulses, the more substantial DA overflow evoked by pulse trains engages D_2 autoreceptors.

The enhancement of DA release by NT depends on D_2 autoreceptors activation

To evaluate whether NT enhances DA overflow by inhibiting D_2 autoreceptor function, we next tested whether NT still increases DA overflow following D_2 receptor blockade. We applied sulpiride (5 μM) alone and found that it increased DA levels to 181.3 ± 3.6 % of basal values ($n=10$). With sulpiride present in the bath, NT (8-13) (100 nM) produced only a minor additional increase in DA levels (to 194.4 ± 5.5 % of control, $n=10$), thus reflecting an almost complete block of the facilitating effect of NT (Fig. 5A). A one-

way ANOVA revealed a significant difference between these three conditions (control, sulpiride and sulpiride + NT) (Tukey test; $F = 3.58$, $p < 0.05$). A specific comparison of the enhancement of DA overflow by NT in the presence of sulpiride ($+ 13.1 \pm 9.1$ % above sulpiride alone) or in its absence ($+ 43.1 \pm 6.8$ % above control) shows that the effect of NT was strongly reduced under autoreceptor blockade (Student's paired t -test, $t = 4.12$, $p < 0.05$) (Fig. 5B). These results suggest that although NT still possesses the ability to enhance DA release even when D_2 autoreceptors activity is blocked, the majority of its effect is blocked under such conditions.

Pulse trains generate considerable DA release in the NAcc brain slice in the presence of sulpiride (maximal increase of $2.2 \mu\text{M}$ in the presence of both sulpiride and NT). The blockade by sulpiride of the ability of NT to facilitate DA release could thus be an artefact resulting from a ceiling effect due to depletion of the releasable pools of DA. To test this possibility, we pre-applied sulpiride ($5 \mu\text{M}$) and then introduced a modified aCSF containing an elevated concentration of calcium (3.4 mM Ca^{2+}) (Fig. 6A). Sulpiride first increased DA overflow to 177.0 ± 7.0 % of basal levels ($n=7$). Elevation of extracellular calcium to 3.4 mM in the presence of sulpiride produced an additional increase to 258.1 ± 15.1 % of control ($n=7$) (Fig. 6B). A one-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test confirmed significant differences between the control, sulpiride and 3.4 mM calcium conditions ($F = 5.81$, $p < 0.001$). The maximal DA release detected with sulpiride and Ca^{2+} 3.4 mM present in the recording chamber exceeded $3.0 \mu\text{M}$. Thus, the blockade by sulpiride of the ability of NT to facilitate DA release is not likely to simply result from a depletion of releasable DA pools.

DISCUSSION

Although multiple aspects of the action of NT on DA release at the somatodendritic level have been investigated (Elliott and Nemeroff, 1986; Seutin et al., 1989; Jiang et al., 1994; Werkman et al., 2000), the mechanism of action of NT on DAergic axon terminals is still unclear. The present results provide new insight into the mechanism mediating the facilitation of DA release by NT at the level of axon terminals. We show that this mechanism consists in a decrease by NT of the effectiveness of terminal D₂ autoreceptors that normally inhibit DA release from dopaminergic neurons. We also demonstrate that the effects of NT on DA release differ greatly depending on the electrical stimulation parameters used to elicit this release. On the one hand, NT fails to alter DA overflow triggered by single pulses in the NAcc. This observation is consistent with a previous preliminary report showing that NT failed to induce an enhancement of DA release evoked by single electrical pulses in striatal slices (Bull and Sheehan, 1991), and suggests that DA release is not directly facilitated by NT. On the other hand, NT strongly enhances DA release evoked by pulse trains that generate more substantial DA release and engage D₂ autoreceptors.

We show that NT fails to have a direct excitatory effect on dopaminergic axon terminals, and that it acts to enhance DA release by inhibiting the function of terminal D₂ autoreceptors. Our results support a recent report proposing an indirect mechanism of action of NT on dopaminergic axon terminals (Legault et al., 2002). These authors monitored glutamate co-release in cultured DA neurons and found that NT does not directly

increase glutamate release, but rather attenuates the function of presynaptic D₂ autoreceptors.

NT is known to facilitate K⁺ and electrically-evoked DA release in a Ca²⁺-dependent and TTX-independent manner in striatal slice preparations (Hetier et al., 1988; Faggin and Cubeddu, 1990; Heaulme et al., 1997) as well as *in vivo* (Ferraro et al., 1995, 1997). Although these observations imply a presynaptic effect of NT on DAergic neurons, previous results have not excluded an indirect mechanism of action. In fact, two indirect mechanisms of action of NT can be proposed to explain these data. First, one hypothesis is that NT receptors are located in the striatum on other elements (other neurons or astrocytes) than DAergic axon terminals. For example, these receptors could be located on corticostriatal glutamatergic axon terminals. If this was the case, NT receptor activation could facilitate the spontaneous release of glutamate (Kalivs and Duffy, 1997), which would then enhance DA release by depolarizing DAergic axon terminals. Second, another possibility is that NT acts on NT receptors present on DAergic terminals and enhances DA release by inhibiting the function of terminal dopaminergic D₂ autoreceptors. This possibility has been proposed previously in preliminary reports (Tanganelli et al., 1989; von Euler et al., 1991) and was recently more directly studied using cultures of isolated dopaminergic neurons (Legault et al., 2002). Our findings provide evidence supporting this later hypothesis. First, we show that electrically-evoked DA overflow is much higher after pulse trains than after single pulse stimulations. Second, we demonstrate that sulpiride considerably enhances DA release in pulse train mode, but not in single pulse mode. Two of our experiments also exclude a significant contribution of NT-mediated activation of corticostriatal terminals. First, if NT-evoked glutamate release from corticostriatal

terminals played a significant role, one would predict that DA release evoked by single pulses would be facilitated by NT. This was not the case. A second prediction is that NT-induced enhancement of DA release evoked by pulse trains would still occur in the presence of a D_2 antagonist. On the contrary, we found that the ability of NT to enhance train pulse-evoked DA release was mostly blocked in the presence of sulpiride, a D_2 receptor antagonist.

Taken together, these data suggest that unlike single pulses, pulse trains generate a more substantial DA release and engage D_2 autoreceptors. In consequence, pulse trains provide favourable conditions to test the ability of NT to enhance DA release by an inhibition of the function of D_2 receptors. In fact, our experiments with NT show that it strongly facilitates DA release evoked by pulse trains, but fails to increase DA release evoked by single pulses. This observation is in accordance with an NT- D_2 autoreceptor interaction at the terminal level.

In the present study, we have not determined which of the NT receptors is implicated in the effect of NT at the terminal level. Nevertheless, previous data suggest that the type 1 NT receptor (NTR_1) is likely responsible for most of this effect. First, DA neurons of the ventral tegmental area and substantia nigra express abundant levels of NTR_1 (Szigethy and Beaudet, 1989; Sato et al., 1992), but only modest amounts of NTR_2 (Sarret et al., 2003). Second, the excitatory effects of NT on DA neurons are maintained in NTR_2 knockout mice but strongly reduced in NTR_1 knockout mice (Leonetti et al., 2004). Compatible with this, SR48692, an antagonist of the NTR_1 , blocks the ability of NT to increase the firing rate of DA neurons in culture (St-Gelais et al., 2004). Whether this

NTR₁ antagonist also blocks the effects of NT at the terminal level remains to be determined.

In summary, our results provide a better understanding of the mechanism of action of NT on DAergic axon terminals. We suggest that NT enhances DA release mainly by inhibiting the function of D₂-type autoreceptors located on DAergic axon terminals, thus disinhibiting DA release. Future experiments should be oriented toward identifying the NT receptor subtype that mediates the observed physiological effect of NT. Furthermore, the signaling pathways implicated in the NT-D₂ receptor interaction and the specific mechanism involved, such as heterologous desensitization or direct receptor-receptor interactions will also need to be investigated.

REFERENCES

- Armstrong James M, Millar J (1979) Carbon fibre microelectrodes. *J Neurosci Meth* 1:279-287.
- Beaudet A, Mazella J, Nouel D, Chabry J, Castel MN, Laduron P, Kitabgi P, Faure MP (1994) Internalization and intracellular mobilization of neurotensin in neuronal cells. *Biochem Pharmacol* 47:43-52.
- Beauregard M, Ferron A, Descarries L (1992) Opposite effects of neurotensin on dopamine inhibition in different regions of the rat brain: an iontophoretic study. *Neuroscience* 47:613-619.
- Bull DR, Sheehan MJ (1991) Presynaptic regulation of electrically evoked dopamine overflow in nucleus accumbens: a pharmacological study using fast cyclic voltammetry in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343:260-265.
- Carraway R, Leeman SE (1973) The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 248:6554-6861.
- Castel MN, Faucher D, Cuine F, Dubedat P, Boireau A, Laduron PM (1991) Identification of intact neurotensin in the substantia nigra after its retrograde axonal transport in dopaminergic neurons. *J Neurochem* 56:1816-1818.
- Dilts RP, Kalivas PW (1989) Autoradiographic localization of μ -opioid and neurotensin receptors within the mesolimbic dopamine system. *Brain Res* 488:311-327.

DiPaola ED, Richelson E (1990) Cardiovascular effects of neurotensin and some analogues on rats. *Eur J Pharmacol* 175:279-283.

Elliott PJ, Nemeroff CB (1986) Repeated neurotensin administration in the ventral tegmental area: effects on baseline and D-amphetamine-induced locomotor activity. *Neurosci Lett* 68:239-244.

Faggin BM, Cubeddu LX (1990) Rapid desensitization of dopamine release induced by neurotensin and neurotensin fragments. *J Pharmacol Exp Ther* 253:812-818.

Faure MP, Nouel D, Beaudet A (1995) Axonal and dendritic transport of internalized neurotensin in rat mesostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience* 68:519-529.

Ferraro L, Tanganelli S, O'Connor WT, Bianchi C, Ungerstedt U, Fuxe K (1995) Neurotensin increases endogenous glutamate release in the neostriatum of the awake rat. *Synapse* 20:362-364.

Ferraro L, O'Connor WT, Antonelli T, Fuxe K, Tanganelli S (1997) Differential effects of intrastriatal neurotensin(1-13) and neurotensin(8-13) on striatal dopamine and pallidal GABA release. A dual-probe microdialysis study in the awake rat. *Eur J Neurosci* 9:1838-1846.

Garris PA, Wightman RM (1995) Regional differences in dopamine release, uptake, and diffusion measured by fast-scan cyclic voltammetry. In: *Neuromethods: Voltammetric Methods in Brain Systems* (Boulton A, Baker G, Adams RN, eds), pp 179-220. Totowa, NJ: Humana.

Garver DL, Bissette G, Yao JK, Nemeroff CB (1991) Relation of CSF neurotensin concentrations to symptoms and drug response of psychotic patients. *Amer J Psychiatry* 148:484-488.

Heaulme M, Leyris R, Le Fur G, Soubrié P (1997) Involvement of potentially distinct neurotensin receptors in neurotensin-induced stimulation of striatal [³H]dopamine release evoked by KCl versus electrical depolarization. *Neuropharmacology* 36:1447-1454.

Hetier E, Boireau A, Dubedat P, Blanchard JC (1988) Neurotensin effects on evoked release of dopamine in slices from striatum, nucleus accumbens and prefrontal cortex in rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337:13-17.

Jiang ZG, Pessia M, North RA (1994) Neurotensin excitation of rat ventral tegmental neurones. *J Physiol (Lond.)* 474:119-129.

Kalivas PW, Duffy P (1990) Effect of acute and daily neurotensin and enkephalin treatments on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 10:2940-2949.

Kalivas PW, Duffy P (1997) Dopamine regulation of extracellular glutamate in the nucleus accumbens. *Brain Res* 761:173-177.

Kawagoe KT, Jankowski JA, Wightman RM (1991) Etched carbon-fiber electrodes as amperometric detectors of catecholamine secretion from isolated biological cells. *Analytical Chemistry* 63:1589-1594.

Kawagoe KT, Garris PA, Wiedemann DJ, Wightman RM (1992) Regulation of transient dopamine concentration gradients in the microenvironment surrounding nerve terminals in the rat striatum. *Neuroscience* 51:55-64.

Kawagoe KT, Zimmerman JB, Wightman RM (1993) Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *J Neurosci Meth* 48:225-240.

Kuhr WG, Wightman RM (1986) Real-time measurement of dopamine release in the rat brain. *Brain Res* 381:168-171.

Lambert PD, Gross R, Nemeroff CB, Kilts CD (1995) Anatomy and mechanisms of neurotensin-dopamine interactions in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 757:377-389.

Legault M, Congar P, Michel FJ, Trudeau L-E (2002) Presynaptic action of neurotensin on cultured ventral tegmental area dopaminergic neurones. *Neuroscience* 111:177-187.

Leonetti M, Brun P, Clerget M, Steinberg R, Soubrie P, Renaud B, Suaud-Chagny MF (2004) Specific involvement of neurotensin type 1 receptor in the neurotensin-mediated in vivo dopamine efflux using knock-out mice. *J Neurochem* 89:1-6.

McCarthy PS, Walker RJ, Yajima H, Kitagawa K, Woodruff GN (1979) The action of neurotensin on neurones in the nucleus accumbens and cerebellum of the rat. *Gen Pharmacol* 10:331-333.

Nouel D, Faure MP, St. Pierre JA, Alonso R, Quirion R, Beaudet A (1997) Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors. *J Neurosci* 17:1795-1803.

Quirion R, Chiueh CC, Everist HD, Pert A (1985) Comparative localization of neurotensin receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic terminals. *Brain Res* 327:385-389.

Rompré P, Perron S (2000) Evidence for a role of endogenous neurotensin in the initiation of amphetamine sensitization. *Neuropharmacology* 39:1880-1892.

Rostène W, Brouard A, Dana C, Masuo Y, Agid F, Vial M, Lhiaubet AM, Pélaprat D (1992) Interaction between neurotensin and dopamine in the brain. Morphofunctional and clinical evidence. *Ann N Y Acad Sci* 668:217-231.

Sarret P, Perron A, Stroh T, Beaudet A (2003) Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 461:520-538.

Sato M, Kiyama S, Tohyama M (1992) Different postnatal development of cells expressing mRNA encoding neurotensin receptor. *Neuroscience* 48:137-149.

Schotte A, Leysen JE (1989) Autoradiographic evidence for the localization of high affinity neurotensin binding sites on dopaminergic nerve terminals in the nigrostriatal and mesolimbic pathways in rat brain. *J Chem Neuroanat* 2:253-257.

Seutin V, Massotte L, Dresse A (1989) Electrophysiological effects of neurotensin on dopaminergic neurones of the ventral tegmental area of the rat *in vitro*. *Neuropharmacology* 28:949-954.

Shi WX, Bunney BS (1991) Neurotensin modulates autoreceptor mediated dopamine effects on midbrain dopamine cell activity. *Brain Res* 543:315-321.

Sotty F, Souliere F, Brun P, Chouvet G, Steinberg R, Soubrié P, Renaud B, Suaud-Chagny MF (1998) Differential effects of neurotensin on dopamine release in the caudal and rostral nucleus accumbens: a combined *in vivo* electrochemical and electrophysiological study. *Neuroscience* 85:1173-1182.

Sotty F, Brun P, Leonetti M, Steinberg R, Soubrie P, Renaud B, Suaud-Chagny MF (2000) Comparative effects of neurotensin, neurotensin(8-13) and (D-Tyr(11))neurotensin applied into the ventral tegmental area on extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Neuroscience* 98:485-492.

St-Gelais F, Legault M, Bourque MJ, Rompré PP, Trudeau LE (2004) Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* 24:2566-2574.

Stowe ZN, Nemeroff CB (1991) The electrophysiological actions of neurotensin in the central nervous system. *Life Sci* 49:987-1002.

Szigethy E, Beaudet A (1989) Correspondence between high affinity ¹²⁵I-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* 279:128-137.

Tanganelli S, von Euler G, Fuxe K, Agnati LF, Ungerstedt U (1989) Neurotensin counteracts apomorphine-induced inhibition of dopamine release as studied by microdialysis in rat neostriatum. *Brain Res* 502:319-324.

Von Euler G, van der Ploeg I, Fredholm BB, Fuxe K (1991) Neurotensin decreases the affinity of dopamine D₂ agonist binding by a G protein-independent mechanism. *J Neurochem* 56:178-183.

no effect on single pulse-evoked DA release (n=5) (A), whereas it strongly enhanced train-evoked DA overflow (n=13) (B). Data are expressed as a percentage of the DA levels recorded before NT application.

Figure 4: DA release is modulated by agonists and antagonists of D₂ receptors. A) Graph showing the effect of the D₂ receptor agonist quinpirole 0.5 (n=3) and 1 μM (n=3), and the D₂ receptor antagonist sulpiride 5 μM (n=8) on DA overflow following pulse-train stimulation. The activation of D₂ receptors by quinpirole inhibits DA release in a concentration-dependent manner, whereas the blockade of these receptors by sulpiride considerably enhances DA release triggered by pulse trains. B) Graph comparing the effect of quinpirole 0.5 (n=6) and 1 μM (n=5), and sulpiride 5 μM (n=4) application on DA overflow elicited by single-pulse stimulations. Under these conditions, D₂ receptors activation by quinpirole also inhibits DA release in a concentration-dependent manner. However, DA overflow in response to single pulses is unchanged in the presence of sulpiride.

Figure 5: The enhancement of DA release by NT is dependent on D₂ receptors. A) Graph showing the effect of NT (8-13) on DA overflow following D₂ receptor blockade by sulpiride (n=10). First, sulpiride (5 μM) alone was pre-applied. Second, with sulpiride present in the bath, NT (8-13) (100 nM) was introduced from t= 10 min for a total of 8 mins. B) Time course of DA levels recorded in the presence of NT (8-13) and sulpiride alone as well as in the presence of both NT (8-13) + sulpiride. NT (8-13) alone increases DA concentrations to 43 % above control levels (n=13), while sulpiride alone enhances DA release by 81 % compared to control values (n=10). In the presence of sulpiride, NT (8-13)

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Time course of evoked DA overflow in the NAcc in response to single-pulse and train-pulse stimulations. A) Schematic diagram of a coronal slice of the rat brain at the level of the NAcc showing the recording area indicated by the black circle. cc, corpus callosum; CPu, caudate/putamen; aca, anterior commissure. B) Average evoked DA concentrations following single-pulse (400 μ A, 1000 μ s/pulse, n=5) and train-pulse (400 μ A, 100 μ s/pulse, 30 pulses at 10 Hz, n=5) stimulations. C) Background-subtracted voltammograms recorded at the time of the peak DA overflow following single pulses and pulse trains compared with a 1 μ M DA calibration voltammogram. Calibration of the electrode before and after the recording was performed for conversion of the current recorded into DA concentrations and to identify the released substance.

Figure 2: Influence of cell firing and extracellular calcium concentrations on DA overflow following train-pulse stimulation. A) Graph showing the time course of DA concentrations (in μ M) obtained during the control period (n=5) and in the presence of 1 μ M TTX (n=3), 0.5 mM (n=6) and 0 mM (n=2) calcium. The control trace was recorded in 2.4 mM calcium concentration. B) Bar graphs comparing the difference in DA levels (in % of control) between the control period, during the drug application (TTX, 0.5 and 0 mM Ca^{2+}) and after the drug withdrawal periods. Drugs were applied for 8 minutes.

Figure 3: Effect of NT on terminal DA release following single-pulse and train-pulse stimulations. NT (8-13) was applied at t=10 min for a total of 8 mins. NT (8-13) exerted

Werkman TR, Kruse CG, Nievelstein H, Long SK, Wadman WJ (2000) Neurotensin attenuates the quinpirole-induced inhibition of the firing rate of dopamine neurons in the rat substantia nigra pars compacta and the ventral tegmental area. *Neuroscience* 95:417-423.

increases DA levels by an additional 13 % only (n=10). The ability of NT to enhance DA release is thus almost completely prevented when D₂ autoreceptors are blocked.

Figure 6: Releasable pools of DA are not depleted in the presence of sulpiride.

A) Graph showing the effect of an elevation of extracellular calcium concentrations to 3.4 mM (from t= 10 min for a total of 8 mins) with pre-applied sulpiride (5 μM) in the bath (n=7).

B) Comparison between the time course of DA levels obtained with sulpiride alone (+77 % above control, n=7) and sulpiride + 3.4 mM Ca²⁺ (+ 81 % above sulpiride alone, and +158 % above control, n=7).

FIGURE 1

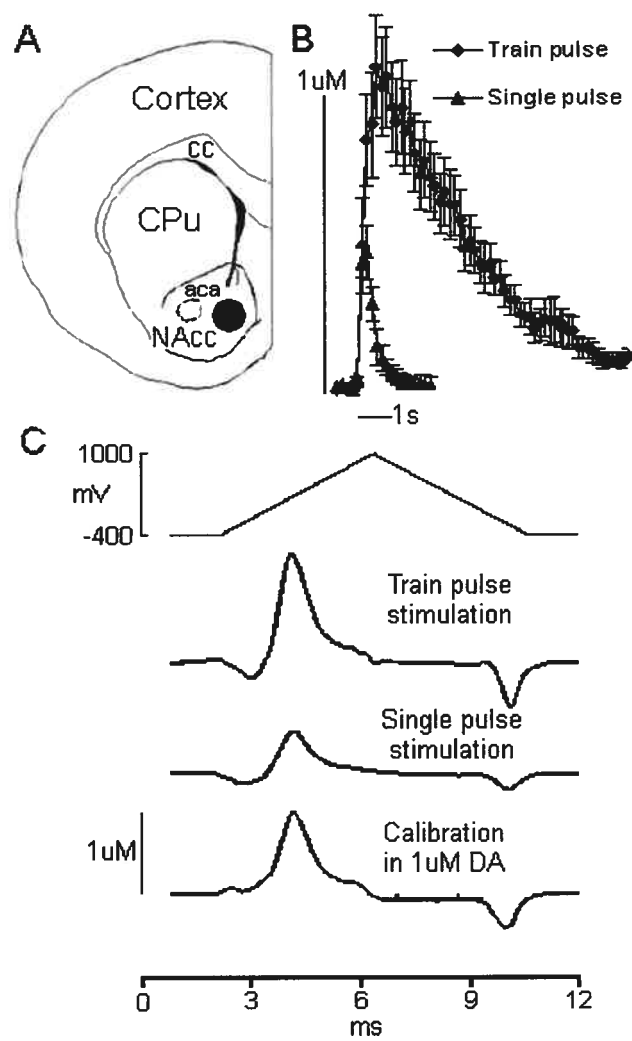


FIGURE 2

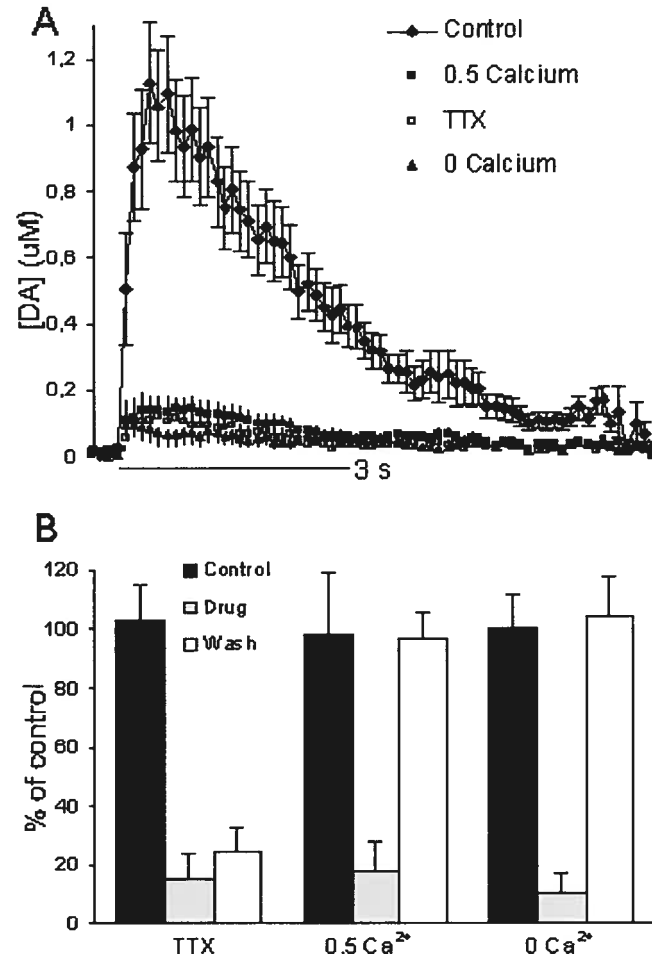


FIGURE 3

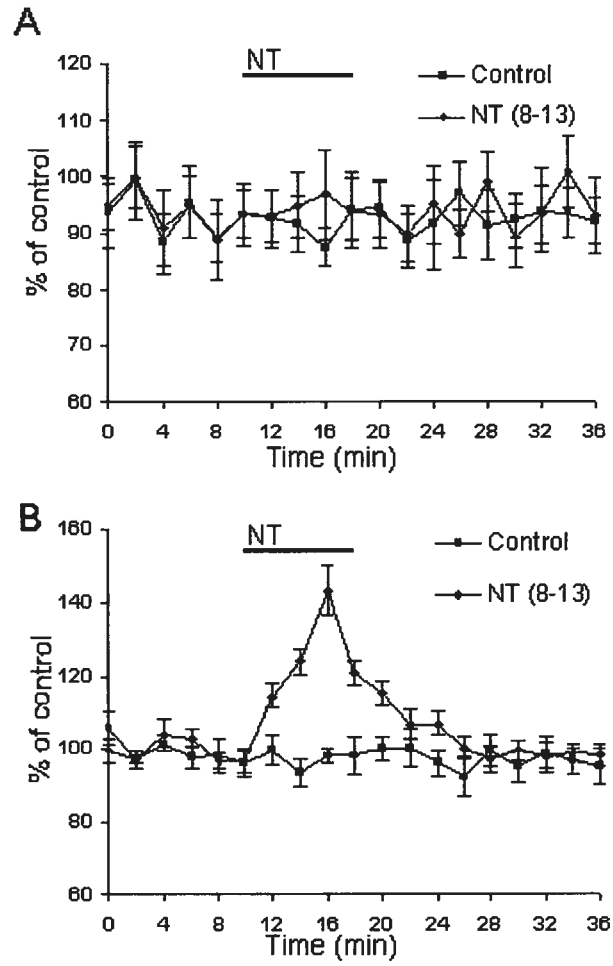


FIGURE 4

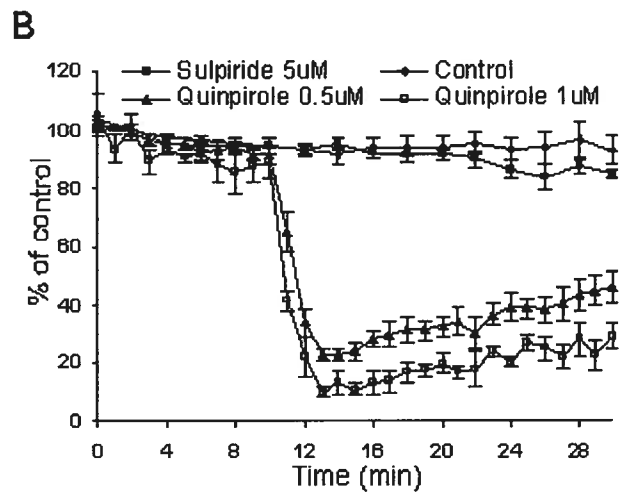
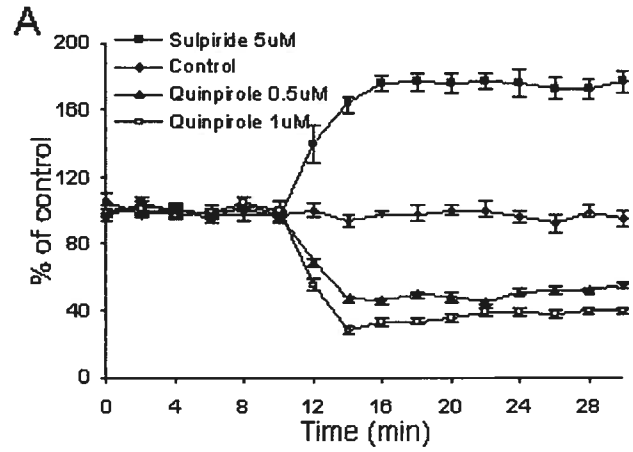


FIGURE 5

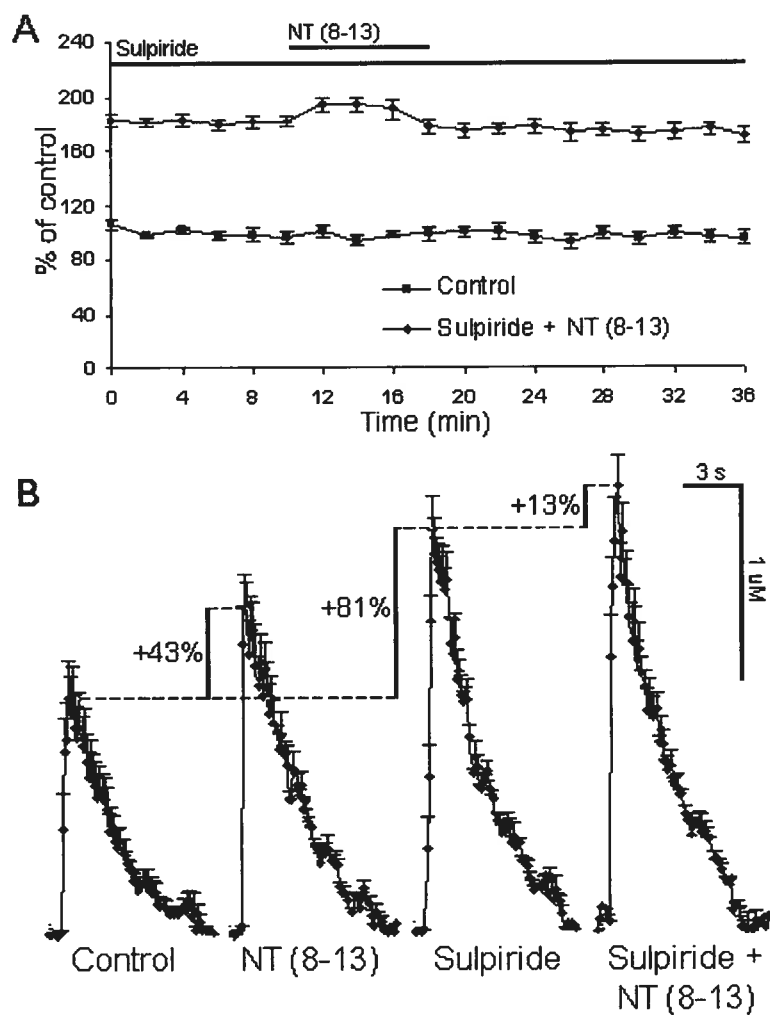
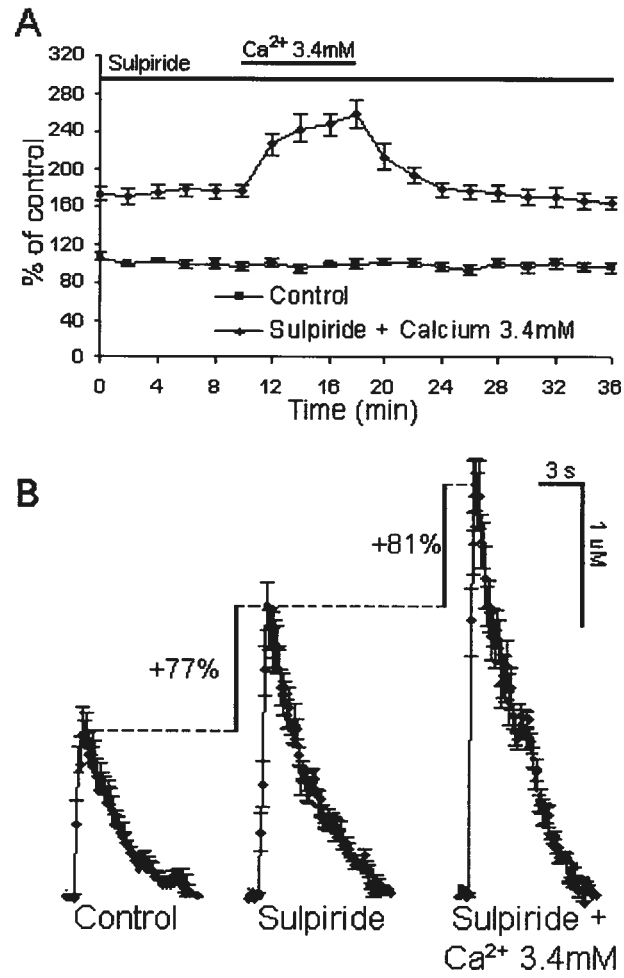


FIGURE 6



DISCUSSION

5. LA VOLTAMÉTRIE CYCLIQUE

Plusieurs techniques ont été développées pour mesurer la libération de dopamine. Ces techniques, pour ne mentionner que quelques unes, comprennent l'HPLC (high-pressure liquid chromatography), la mesure de la dopamine tritiée, la mesure de co-libération de dopamine/glutamate en culture cellulaire, ainsi que l'ampérométrie et la voltamétrie cyclique. De nos jours, les techniques les plus couramment utilisées sont toutefois les techniques électrochimiques comprenant l'HPLC, l'ampérométrie et la voltamétrie cyclique. Ces techniques électrochimiques se basent sur la réaction d'oxydation/réduction de la substance à l'étude, la dopamine en l'occurrence.

Tout d'abord, l'HPLC consiste à analyser un échantillon en phase liquide par suite du passage de ses composantes à travers une colonne de filtration et leur mesure dans un détecteur (typiquement un détecteur ampérométrique). Les composantes de cet échantillon sont alors comparées à un échantillon témoin d'une composition chimique connue. Cette technique permet de déterminer avec une précision surprenante l'identité et la quantité de la substance présente dans l'échantillon analysé. Cependant, la résolution temporelle de cette méthode est limitée, puisqu'une quantité considérable de liquide doit passer à travers la colonne de filtration afin de permettre l'identification de la substance étudiée. Ainsi, un intervalle de plusieurs minutes est typiquement nécessaire à l'acquisition de données (enregistrement des concentrations de dopamine extracellulaire).

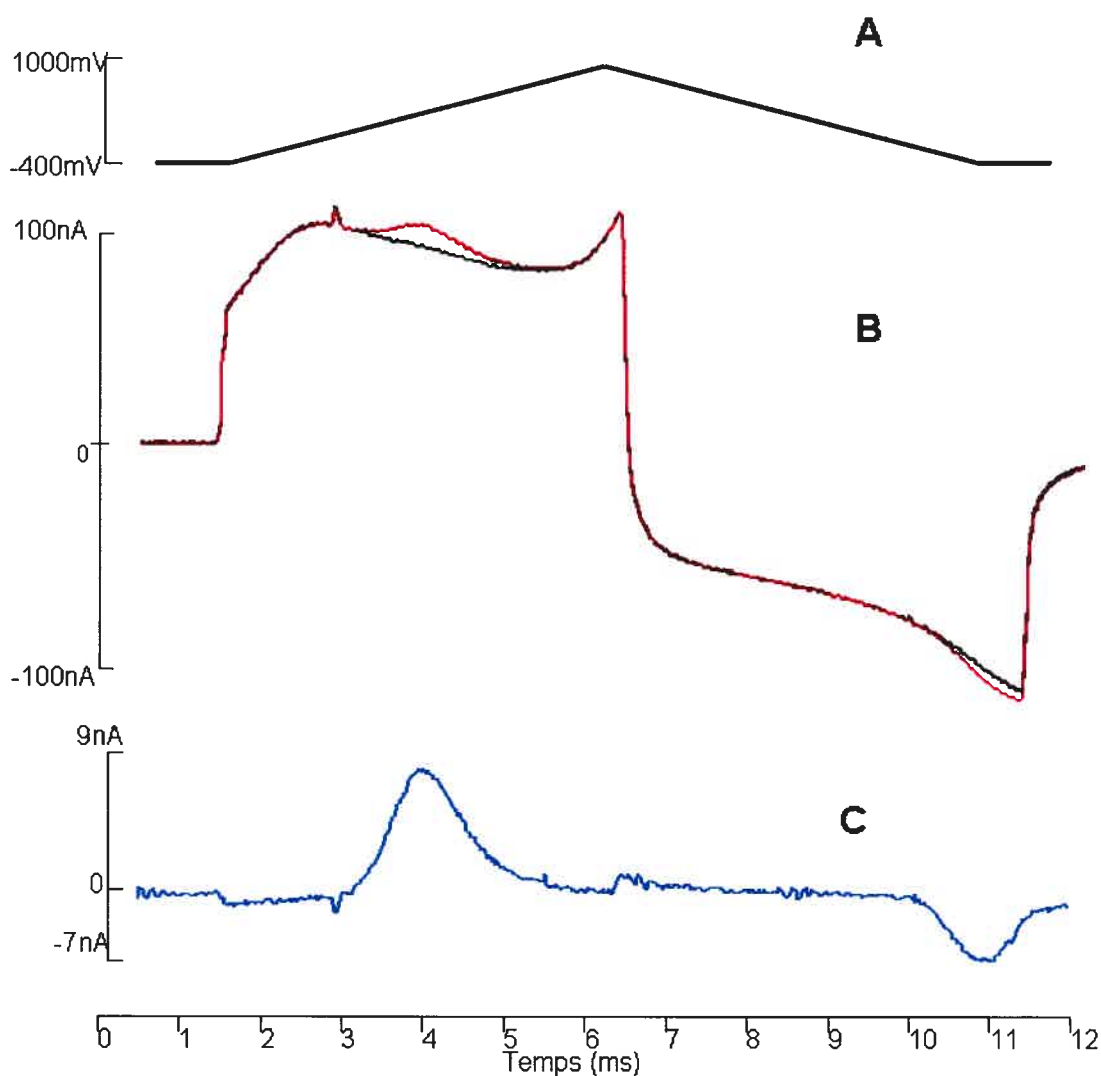


Figure 3 : Principe de la voltamétrie cyclique. A. Rampe de voltage triangulaire appliquée sur la fibre de carbone; B. Courant en nA généré en solution saline sans DA (courbe noire) et en solution saline en présence de DA (5 μM dans cet exemple) (courbe rouge); C. Graphique représentant la soustraction de la réponse obtenue en salin sans DA à partir de la réponse obtenue en salin avec DA.

L'ampérométrie et la voltamétrie cyclique permettent de détecter des substances en les oxydant via une électrode avec fibre de carbone sur laquelle on applique un voltage positif. Le matériel oxydé libère alors des électrons qui sont collectés par la fibre de carbone et qui génèrent un courant à travers cette fibre. La détection de ce courant est la base des techniques de détection électrochimiques.

En ampérométrie, un voltage positif (typiquement +400 mV) est appliqué de façon continue sur l'électrode avec fibre de carbone. Ce voltage engendre une oxydation de la substance étudiée générant un courant positif qui peut être mesuré. Ce signal engendré par l'oxydation de la substance se termine lorsque cette substance s'éloigne par diffusion de l'électrode avec fibre de carbone et devient donc indétectable par l'électrode. L'ampérométrie est une approche qui est caractérisée par une grande sensibilité et permet la détection d'événements unitaires de relâche vésiculaire (de l'ordre du pA). Cependant, cette technique ne permet pas de différencier les substances oxydées, rendant ainsi l'interprétation des enregistrements difficile dans les régions où coexistent plusieurs substances oxydables.

Dans la technique de voltamétrie cyclique, une rampe de voltage triangulaire est appliquée sur l'électrode avec fibre de carbone durant quelques millisecondes (figure 3A). Cette rampe peut être répétée plusieurs fois par seconde. Ces rampes de voltage triangulaires génèrent un courant détectable par la fibre de carbone : la phase montante de la rampe de voltage génère un courant positif alors que la phase descendante de la rampe de voltage génère un courant négatif. Ce courant est même présent dans une simple solution saline en absence de substances oxydables dû à la présence dans la solution saline (LCR artificiel) de plusieurs électrolytes (figure 3B, tracé noir). Le courant généré dans le salin en absence de substance oxydable, la dopamine en l'occurrence, est appelé le courant de fond ou le courant de base. En présence de dopamine ou d'autres substances oxydables (par exemple, la noradrénaline, l'adrénaline ou la sérotonine), un nouveau courant se surajoute au courant de base à des régions spécifiques de la courbe en fonction du potentiel d'oxydation spécifique à chaque substance (figure 3B, tracé rouge). Ainsi, on peut

soustraire le courant obtenu dans la solution saline sans DA du courant obtenu dans la solution saline avec DA (figure 3C). Le courant soustrait obtenu est divisé en 2 parties : un courant positif généré par l'oxydation de DA lors de l'application d'un voltage positif et un courant négatif généré par la réduction de DA lors de l'application d'un voltage négatif. Ce courant soustrait est proportionnel à la concentration de DA dans la solution saline, ce qui permet de déterminer la quantité de DA présente. De plus, pour la dopamine, le courant d'oxydation survient lors de l'application d'un voltage entre 300 et 900mV avec un pic à approximativement 600mV, alors que le courant de réduction survient à un voltage d'approximativement -200mV. Ainsi, contrairement à l'ampérométrie, la voltamétrie cyclique permet de différencier des composés à condition que leurs potentiels d'oxydation respectifs soient suffisamment différents.

Les différentes techniques de détection de la dopamine possèdent leurs avantages et inconvénients et sont souvent complémentaires dans la quête d'une meilleure compréhension du système dopaminergique et de ses interactions avec d'autres systèmes de circuiterie neuronale. Afin d'étudier la modulation de la libération de DA par le système neurotensinergique dans des tranches de NAcc, nous avons préféré utiliser la voltamétrie cyclique puisqu'elle permettait d'identifier de manière fiable la substance libérée (la dopamine en l'occurrence) tout en offrant une excellente résolution temporelle.

5.1 Fabrication des électrodes de fibre de carbone¹¹

Lors de la réalisation d'un projet à l'aide d'une technique de voltamétrie cyclique, la fabrication d'électrodes de fibre de carbone avec une bonne sensibilité à la dopamine est une étape cruciale. Ainsi, à travers la recherche du protocole optimal pour la fabrication de ces électrodes, plusieurs combinaisons de paramètres ont été essayées pour chacune des étapes de la fabrication.

La première étape consiste à insérer une fibre de carbone de 5 μm de diamètre dans un tube de borosilicate de 0,68 mm de diamètre intérieur. À cette fin, le tube a été relié à un système « sous vide » aspirant graduellement la fibre de carbone. Pour faciliter cette manipulation, la fibre de carbone est placée en ligne droite sur une feuille blanche. La fibre est alors bien visible à l'œil nu et son insertion dans le tube peut se poursuivre, sous loupe, avec un agrandissement de 3 dioptries.

Le tube de borosilicate abritant la fibre de carbone doit alors être étiré pour créer deux électrodes. Les paramètres d'étirement doivent permettre d'obtenir une électrode dont le bout est de petit diamètre, afin de créer une jonction étanche avec la fibre de carbone et suffisamment solide pour résister à l'insertion dans une tranche de cerveau. Les paramètres optimaux pour l'étireuse que nous avons utilisée (Sutter P-2000) ont été : Heat 430, Filament 4, Velocity 50, Delay 220, Pull 110. Nous avons habituellement préparé une vingtaine de tubes de borosilicate à la fois, et donc une quarantaine d'électrodes, avant de

¹¹ Des résultats préliminaires sur la fabrication des électrodes de fibre de carbone ont déjà été abordés dans un manuscrit présenté au Comité d'Organisation du Programme des Stagiaires d'Été (COPSE) de l'Université de Montréal à l'été 2002.

les tester. La fibre de carbone des électrodes a été coupée à l'aide du scalpel, sous microscope, à environ 100 à 200 μm de la jonction borosilicate/carbone.

Ensuite, les électrodes ont été trempées dans l'époxy afin de sceller la jonction entre le tube de borosilicate et la fibre de carbone. L'époxy a été choisie pour ses excellentes caractéristiques d'étanchéité, ainsi que pour sa stabilité dans une variété de systèmes liquidiens aqueux et non-aqueux. Pour préparer le mélange d'époxy résine/durcisseur, la résine (8mL) est chauffée à 90°C pendant 2 à 3 minutes; 2 mL de durcisseur sont ajoutés et mélangés à la résine jusqu'à ce que l'apparence du mélange soit uniforme. Les électrodes sont alors trempées deux par deux dans ce mélange, pour une durée de 45 à 60 secondes. Mentionnons aussi que le mélange d'époxy peut être utilisé pendant une vingtaine de minutes, ce qui est amplement suffisant pour tremper une quarantaine d'électrodes.

Les électrodes trempées dans l'époxy sont ensuite mises au four à 95-100°C, pour une durée d'environ 48h. Des températures de chauffage élevées ainsi qu'une longue durée de chauffage¹² améliorent considérablement le taux de succès. Par la suite, le bout des électrodes est coupé à environ 100 μm à partir de l'extrémité de la fibre de carbone. L'autre extrémité de l'électrode est chauffée au brûleur Bunsen pendant 3 à 5 s afin d'arrondir le bout du tube de borosilicate. Ainsi, on évite d'abîmer la couche de chlorure d'argent créée sur le fil d'argent lors de l'insertion de l'électrode dans le portoir d'électrodes. Finalement, avant d'être testée, l'électrode est remplie d'acétate de potassium 4,0 M afin de créer un

¹² Au départ, les électrodes étaient chauffées pendant environ 12h où, le plus souvent, elles étaient laissées dans le four pour la nuit. Cependant, avec une augmentation de la durée de chauffage à 48h, le taux de succès des électrodes a été nettement meilleur.

contact électrique adéquat entre la fibre de carbone et le fil d'argent chloruré du système d'enregistrement.

5.2 Test des électrodes de fibre de carbone

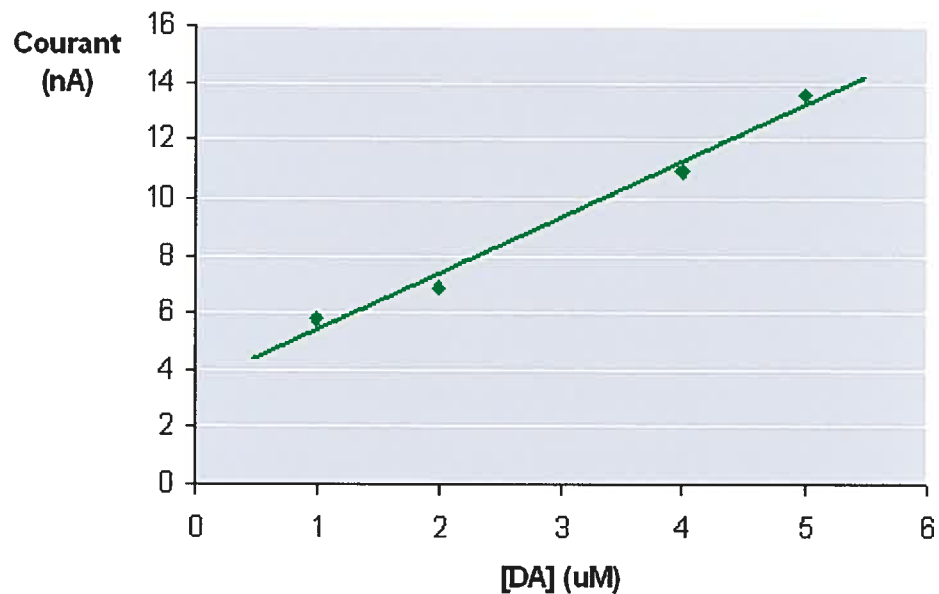


Figure 4 : Réponse de l'électrode avec fibre de carbone à différentes [DA] (1, 2, 4 et 5 μM).

Les électrodes ont été testées avec de la DA 1 μM . Certains laboratoires choisissent de tester les électrodes avec 5 μM de DA, mais nous avons préféré une plus faible concentration de DA, qui correspond mieux aux concentrations rencontrées dans les tranches de NAcc. Quoiqu'il en soit, ces deux méthodes sont adéquates puisqu'il existe une relation linéaire entre la concentration de DA dans le bain et le courant détecté par une électrode de bonne qualité. Cette linéarité de la réponse de l'électrode à différentes concentrations est extrêmement importante, puisqu'elle est intimement liée à la validité des résultats (concentrations de DA) obtenus en tranche. La concentration de DA libérée en

tranche est calculée à partir du courant détecté par l'électrode par comparaison au courant obtenu dans la solution contrôle de DA 1 μM . Lorsque testées en présence de DA 1, 2, 4 et 5 μM , nous avons confirmé la linéarité de la réponse des électrodes à ces diverses concentrations (figure 4).

Certains paramètres sont critiques lors du test des électrodes. Après application d'une rampe de voltage triangulaire allant de -400 à 1000mV , les électrodes de bonne qualité ont laissé passer entre 50 et 200 nA de courant brut dans du salin physiologique. Le même salin a été utilisé pour tester les électrodes et pour les manipulations expérimentales. En présence de DA 1 μM , les électrodes retenues ont été celles qui permettaient d'enregistrer des courants maximum nets entre 3 et 8 nA. Ce courant net est le résultat de la soustraction du tracé initial en l'absence de dopamine, à partir du tracé obtenu avec la DA 1 μM . Lorsque l'électrode ne répondait pas à ce critère, elle était recoupée et retestée. Après deux ou trois recoups, toute électrode qui ne satisfaisait pas à cette condition était rejetée.

6. PRÉPARATION DES TRANCHES DE CERVEAU

Des rats âgés de 4 à 6 semaines ont été utilisés. Les rats ont été anesthésiés à l'halothane avant d'être décapités. La quantité d'anesthésique inhalé a été limitée à la plus faible dose nécessaire pour étourdir le rat avant la décapitation, puisque l'anesthésie était susceptible d'altérer les résultats. Des tranches de 400 μm d'épaisseur incluant le NAcc ont été obtenues à l'aide d'un vibratome. Nous avons choisi cette épaisseur puisqu'elle fournissait des tranches suffisamment solides pour résister aux manipulations (transfert de la chambre du vibratome à la chambre de repos et de la chambre de repos à la chambre d'enregistrement), ainsi qu'au traumatisme de l'insertion de la fibre de carbone. À cette épaisseur, 3 ou 4 tranches incluaient le NAcc, et donc 6 à 8 demi-tranches, autorisant des périodes d'enregistrement de 4 à 5 heures. Nous avons rarement dépassé 5 heures d'enregistrement avec un même rat, puisque la qualité des tranches se détériore à plus long terme. Tout au long du processus de coupe des tranches, le cerveau a été gardé à 5°C dans la chambre du vibratome, ce qui nous donnait le double avantage de diminuer le métabolisme cérébral (assurant une meilleure longévité de la qualité des tranches) et de rendre le cerveau plus solide pour la coupe. Une fois les tranches obtenues, elles ont été placées dans du salin physiologique oxygéné (95% O₂ et 5% CO₂) à la température de la pièce durant 1h, puis dans la chambre d'enregistrement où elles ont été perfusées (1ml/min) à 35 degrés Celsius avec du salin physiologique. Les enregistrements ont débuté après quelques minutes de repos.

Pour confirmer la localisation anatomique des prélèvements, nous avons effectué une étude immunocytochimique sur les premières tranches de cerveau obtenues, à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre la tyrosine hydroxylase (TH, enzyme de synthèse de la dopamine) et d'un anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente, l'Alexa 488. En microscopie de fluorescence, l'Alexa 488 émet une lumière verte lorsque stimulée par de la lumière bleue (~490 nm). L'observation des tranches a démontré un réseau dense d'axones localisant la TH dans le NAcc et le striatum, deux régions recevant une forte innervation dopaminergique. Des fibres immunoréactives ont également été observées dans le cortex cérébral, mais en densité beaucoup plus faible que dans le striatum et le NAcc.

7. MONTAGE EXPÉRIMENTAL

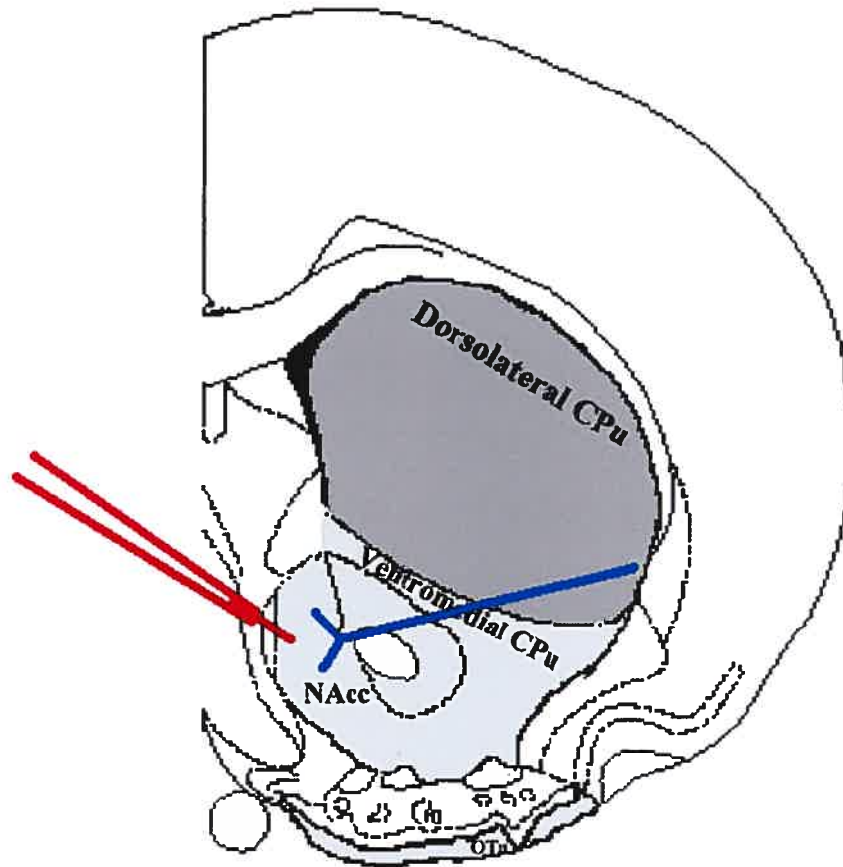


Figure 5 : Représentation schématique d'une tranche de noyau accumbens en coupe coronale. L'électrode bipolaire (schématisée en bleu) est déposée sur la surface de la tranche et sert à stimuler la tranche pour libérer la DA. L'électrode avec fibre de carbone (schématisée en rouge) est insérée dans la tranche et est utilisée pour effectuer les enregistrements (modifié de Binder et al., 2001).

Les expériences ont été effectuées sur une table pneumatique éliminant les interférences physiques (vibrations). Une cage de Faraday a également été utilisée pour contrer les interférences électromagnétiques.

La dopamine est libérée des neurones en stimulant le tissu par des stimuli électriques générés par une électrode bipolaire (figure 5; d'autres méthodes de stimulation tissulaire

existent telle que la stimulation chimique par dépolarisation des neurones à l'aide d'une solution riche en potassium extracellulaire). La stimulation électrique a été générée par le stimulateur S-900 de la compagnie Dagan. Deux sortes d'électrodes bipolaires ont été essayées (une électrode en tungstène et une électrode en platine) et ont démontré des efficacités de stimulation similaires. Les deux extrémités de l'électrode bipolaire ont été séparées d'environ 100-150 μm . Le bout de chacune de ces extrémités a été dénudé sous microscope à l'aide d'une lame de scalpel. Nous avons fait montre d'une prudence particulière lors de ce dénudement afin de ne pas abîmer les côtés des extrémités de l'électrode pour permettre à cette électrode de générer dans la tranche un champ électrique uniforme. Par la suite, l'électrode bipolaire a été déposée sur la surface de la tranche et les stimulations électriques ont alors été appliquées (stimulations uniques et salve de stimuli). En stimulations uniques, la durée du stimulus était de 1000 μsec avec une amplitude de 400 μA /stimulation, alors que la salve comportait 30 stimulations de 100 μsec chacune avec une amplitude de 400 μA /stimulation délivrées à 10 Hz (temps de récupération d'environ 100 msec entre chacun des stimuli). Ainsi, en maintenant la même amplitude du stimulus entre les deux modes (400 μA), la charge de courant totale appliquée est donc trois fois plus grande (mais divisée en trente stimuli plus courts) en mode salves qu'en mode stimulations uniques, et cette importante charge de courant explique la libération plus significative de DA dans le premier mode. Afin de ne pas abîmer la tranche de cerveau, il est important également de laisser un temps de récupération suffisant entre chacun des stimuli d'une salve (100 msec en l'occurrence). Ces paramètres de stimulation pour la salve nous ont donc permis de déclencher une libération significative de DA des terminaisons dopaminergiques, sans abîmer toutefois les éléments nerveux, nous permettant donc de

maintenir une stabilité des concentrations de DA libérée pendant 36 minutes d'enregistrement.

L'électrode de voltamétrie a été insérée à une profondeur d'environ 75 μm dans la tranche, à l'aide d'un micromanipulateur piézo-électrique. Elle a été placée à une distance de 100 μm de l'électrode bipolaire, fixée à un autre micromanipulateur (figure 5). Une rampe de -400 à 1000 mV a été appliquée à 300 V/s, et des données ont été obtenues avec un amplificateur Axopatch 200B d'Axon Instruments (fréquence de filtrage de 2 kHz).

8. PERSPECTIVES

8.1 Mécanismes de la régulation des autorécepteurs D_2 par la NT

La facilitation de la libération de DA par la NT, due à l'inhibition de la fonction des autorécepteurs dopaminergiques D_2 , pourrait constituer un système de régulation important de la libération de DA. Ainsi, afin de poursuivre la caractérisation de ce mécanisme de régulation, il importerait d'élucider les voies cellulaires et moléculaires impliquées dans ce contrôle présynaptique. Tout d'abord, il faudrait déterminer le type de récepteur neurotensinergique (NTR_1 ou NTR_2) associé à l'effet observé de la NT dans le NAcc. Cette étude pourrait être effectuée en utilisant les bloqueurs neurotensinergiques SR48692 et SR142948A. Un blocage de la réponse à la NT par une faible concentration (10 à 100 nM) de l'antagoniste SR48692 (un bloqueur du récepteur NTR_1) confirmerait l'implication du récepteur NTR_1 . À l'inverse, un blocage de la réponse à la NT par l'antagoniste non-sélectif SR142948A (bloquant le récepteur NTR_1 et NTR_2) et non par l'antagoniste SR48692 suggérerait l'implication du récepteur NTR_2 . L'étape suivante consisterait à déterminer les voies de signalisation intracellulaires nécessaires à l'interaction NT-autorécepteur D_2 . Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre 1.3.1), plusieurs médiateurs intracellulaires sont mobilisés par les récepteurs neurotensinergiques. Parmi ces effecteurs intracellulaires, ceux de la voie de la phospholipase C (PLC) sont des candidats de choix, puisque ces médiateurs ont été reliés aux effets de la NT dans plusieurs études antérieures (principalement au niveau somatodendritique plutôt que terminal). Ainsi, le U73122 (un bloqueur de la PLC) pourrait être utilisé afin de déterminer si l'activation de cet enzyme est

nécessaire pour initier la cascade. Advenant des résultats positifs, des études plus poussées s'imposeraient afin de déterminer laquelle des voies de signalisation en aval de la PLC est préférentiellement utilisée. Les voies intracellulaires à examiner incluraient alors celle de l' IP_3/Ca^{2+} , la protéine kinase C, le GMP cyclique et l'oxyde nitrique. Dans le contexte de nombreuses études rapportant la capacité des récepteurs couplés aux protéines G à former des dimères et des hétéromères, il serait également intéressant de déterminer si le récepteur D_2 est en mesure de former un hétérodimère avec l'un des récepteurs de la NT. Ceci pourrait être évalué par des études d'immunoprécipitation, ainsi que par des études de co-transfection de récepteurs associés à des protéines fluorescentes permettant de quantifier la proximité moléculaire par la technique du transfert de fluorescence (FRET) (Bouvier, 2001).

8.2 Implications thérapeutiques de la NT

Malgré l'évolution rapide des connaissances sur le système nerveux central au cours des dernières décennies, la compréhension des mécanismes d'action d'un neurotransmetteur et de ses différentes interactions avec d'autres systèmes de neurotransmetteurs a toujours constitué un défi. Cette notion est particulièrement pertinente lorsqu'il s'agit des neurotransmetteurs peptidergiques, puisque leurs effets sont généralement plus subtils et moins directs que ceux des transmetteurs classiques comme la dopamine, la sérotonine ou l'acétylcholine. De plus, depuis plusieurs années, on comprend que les différentes fonctions neurophysiologiques (et par conséquent les pathologies associées à leur dérèglement) ne sont jamais médiées par un seul neurotransmetteur mais

plutôt par un ensemble d'interactions entre plusieurs systèmes de neurotransmetteurs. L'interaction entre le système neurotensinergique et le système dopaminergique en constitue un exemple éloquent, et le dérèglement de l'un et/ou l'autre de ces deux systèmes pourrait être impliqué dans des pathologies redoutables telles que la schizophrénie, la dépendance aux drogues d'abus et la maladie de Parkinson.

Nous savons maintenant que la NT peut moduler la transmission dopaminergique en inhibant la fonction des autorécepteurs somatodendritiques et terminaux de type D_2 tel que démontré dans cet ouvrage, et aussi que cette transmission peut être modulée par l'action des antipsychotiques qui agissent comme des antagonistes des récepteurs dopaminergiques D_2 . Il est donc raisonnable de supposer que des agonistes des récepteurs de la NT pourraient servir à traiter les patients atteints de troubles associés au système dopaminergique tels que les troubles psychotiques. Toutefois, afin que la NT puisse exercer un effet au niveau du SNC, il faudrait qu'elle possède la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique. Or les peptides ne traversent pas en général la barrière hémato-encéphalique et la NT ne fait pas exception à cette règle. Elle doit être administrée focalement pour exercer un effet dans le cerveau. Ainsi, plusieurs groupes ont tenté de développer des agonistes des récepteurs neurotensinergiques pouvant traverser la barrière hémato-encéphalique. Le premier de ces analogues de la NT a été développé par Machida et al. (1993) pour la compagnie Eisai Co. Ltd. Ce composé semble exercer des effets comportementaux similaires à la NT (8-13) chez le rat. Toutefois, contrairement à la NT (8-13), qui possède des affinités similaires pour les récepteurs neurotensinergiques (NTR_1) du rat ($K_d = 0,16$ nM) et de l'humain ($K_d = 0,14$ nM), l'analogue Eisai possède une affinité beaucoup plus grande pour le récepteur NTR_1 du rat ($K_d = 5$ nM) par rapport à celui de

l'humain ($K_d = 130$ nM). D'autres analogues de la NT traversant la barrière hémato-encéphalique ont été décrits et incluent le NT 66L, le NT 67L et le NT 69L (Tyler et al., 1999; Cusack et al., 2000; Tyler-McMahon et al., 2000). Tous ces analogues de la NT (8-13) traversent la barrière hémato-encéphalique et remplissent, par conséquent, la condition *sine qua non* leur donnant le potentiel d'être utilisés chez des sujets humains comme des médicaments agissant au niveau du SNC (des antipsychotiques en l'occurrence). Cependant, le passage de cette barrière ne représente pas la seule condition nécessaire pour l'utilisation de ces molécules dans le traitement des troubles psychotiques. Des études physiologiques, pharmacologiques et comportementales doivent être effectuées pour démontrer qu'ils possèdent une activité similaire à la NT (8-13). Plusieurs études ont révélé des similitudes entre les effets des analogues et ceux de la NT. Ainsi, l'administration intra-péritonéale chez le rat de l'analogue neurotensinergique NT 66L induit une hypothermie et un effet antinociceptif en agissant comme agoniste du récepteur neurotensinergique NTR_1 (Tyler et al., 1999). De plus, l'injection intra-péritonéale chez le rat du NT 69L, un autre analogue neurotensinergique, bloque l'effet cataleptogène induit par l'application d'halopéridol, ainsi que la tendance répétitive et stéréotypée de « grimper » induite par l'administration d'apomorphine (Cusack et al., 2000). En conclusion, mentionnons que le développement des agonistes neurotensinergiques traversant la barrière hémato-encéphalique et la caractérisation de leurs effets physiologiques demeure une piste de recherche importante à développer dans l'espoir d'utiliser ces médicaments dans le traitement de la schizophrénie, par exemple.

9. CONCLUSION

Le système neurotensinergique constitue un régulateur majeur des voies dopaminergiques et pourrait être impliqué dans les pathologies associées au système dopaminergique incluant la schizophrénie. Plusieurs études ont également démontré des effets similaires entre la NT et les antipsychotiques. Certains auteurs ont même qualifié la neurotensine de « neuroleptique endogène » (Nemeroff, 1980, 1986), même si l'opinion prévalente est qu'une telle affirmation est exagérée.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à l'implication de la NT dans de telles maladies demeurent obscurs. Nos travaux ont cependant permis de mieux comprendre le mécanisme d'interaction NT-DA au niveau axo-terminal (NAcc). L'utilisation d'une technique (la voltamétrie cyclique) permettant une détection de la libération de DA en temps réel nous a permis de comparer l'effet de la libération de DA dans deux conditions expérimentales, la stimulation électrique unique (libération de DA d'une durée de l'ordre du msec à seconde) et la salve de stimulations (libération de DA d'une durée de l'ordre de quelques secondes). Nous avons ainsi constaté que l'application de NT dans les régions terminales de la voie mésolimbique (NAcc) engendre une facilitation de la libération de DA et que cette facilitation de la libération dopaminergique par la NT se fait par une inhibition de la fonction des autorécepteurs D₂ terminaux. Ainsi, nous avons contribué à clarifier la base physiologique de l'interaction dopamine-neurotensine dans le cerveau. Nos travaux devraient aussi permettre de mieux comprendre

les similitudes observées jusqu'à maintenant entre les effets de la NT et ceux des antipsychotiques.

BIBLIOGRAPHIE

Almenoff J, Wilk S, Orłowski M (1981) Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochem Biophys Res Commun* 102:206-214.

Arsenault MY, Parent A, Séguéla P, Descarries L (1988) Distribution and morphological characteristics of dopamine-immunoreactive neurons in the midbrain of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol* 267:489-506.

Audinat E, Hermel JM, Crépel F (1989) Neurotensin-induced excitation of neurons of the rat's frontal cortex studied intracellularly in vitro. *Exp Brain Res* 78:358-368.

Bachus SE, Kleinman JE (1996) The neuropathology of schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 57 (suppl 11):72-83.

Bean AJ, Dagerlind A, Hökfelt T, Dobner PR (1992) Cloning of human neurotensin/neuromedin N genomic sequences and expression in the ventral mesencephalon of schizophrenics and age/sex matched controls. *Neuroscience* 50:259-268.

Beaudet A, Mazella J, Nouel D, Chabry J, Castel MN, Laduron P, Kitabgi P, Faure MP (1994) Internalization and intracellular mobilization of neurotensin in neuronal cells. *Biochem Pharmacol* 47:43-52.

Biggins JA, Perry EK, McDermott JR, Smith AI, Perry RH, Edwardson JA (1983) Post mortem levels of thyrotropin-releasing hormone and neurotensin in the amygdala in Alzheimer's disease, schizophrenia and depression. *J Neurol Sci* 58:117-122.

Binder EB, Kinkead B, Owens MJ, Nemeroff CB (2001) Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacol Rev* 53:453-486.

Björklund A, Lindvall O (1984) Dopamine-containing systems in the CNS. In: Handbook of Chemical Neuroanatomy: Classical Transmitters in the CNS (Björklund A and Hökfelt T, eds), pp 55-122. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.

Boudin H, Pélaprat D, Rostène W, Beaudet A (1996) Cellular distribution of neurotensin receptors in rat brain: immunohistochemical study using an antipeptide antibody against the cloned high affinity receptor. *J Comp Neurol* 373:76-89.

Boudin H, Pélaprat D, Rostène W, Pickel VM, Beaudet A (1998) Correlative ultrastructural distribution of neurotensin receptor proteins and binding sites in the rat substantia nigra. *J Neurosci* 18:8473-8484.

Bouvier M (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2:274-286.

Bozou JC, de Nadaï F, Vincent JP, Kitabgi P (1989a) Neurotensin, bradykinin and somatostatin inhibit cAMP production in neuroblastoma N1E115 cells via both pertussis toxin sensitive and insensitive mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* 161:1144-1150.

Bozou JC, Rochet N, Magnaldo I, Kitabgi P, Vincent JP (1989b) Neurotensin stimulates inositol triphosphate-mediated calcium mobilization but not protein kinase C activation in HT29 cells. *Biochem J* 264:871-878.

Braff DL, Swerdlow NR, Geyer MA (1999) Symptoms correlates of prepulse inhibition deficits in male schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 156:596-602.

Breslin NA, Suddath RL, Bissette G, Nemeroff CB, Lowrimore P, Weinberger DR (1994) CSF concentrations of neurotensin in schizophrenia: an investigation of clinical and biochemical correlates. *Schizophr Res* 12:35-41.

Brouard A, Pélaprat D, Vial M, Lhiaubet A, Rostène W (1994) Effects of ion channel blockers and phorbol ester treatments on ³H-dopamine release and neurotensin facilitation of ³H-dopamine release from rat mesencephalic cells in primary culture. *J Neurochem* 62:1416-1425.

Bunney BS, Grace AA (1978) Acute and chronic haloperidol treatment: comparison of effects on nigral dopaminergic cell activity. *Life Science* 23:1715-1728.

Bunzow JR, Van Tol HHM, Grandy DK, Albert P, Salon A, Christie MD, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988) Cloning and expression of a rat D₂ dopamine receptor cDNA. *Nature* 336:783-787.

Burgevin MC, Castel MN, Quarteronet D, Chevet T, Laduron PM (1992) Neurotensin increases tyrosine hydroxylase messenger RNA-positive neurons in substantia nigra after retrograde axonal transport. *Neuroscience* 49:627-633.

Carlsson A (1988) The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1:179-186.

Carpenter WT Jr, Buchanan RW (1994) Schizophrenia. *New Engl J Med* 330:681-690.

Carraway RE, Leeman SE (1973) The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 248:6854-6861.

Castel MN, Beaudet A, Laduron PM (1992a) Retrograde axonal transport of neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. Modulation during ageing and possible physiological role. *Biochem Pharmacol* 49:53-62.

Castel MN, Faucher D, Cuine F, Dubedat P, Boireau A, Laduron PM (1991) Identification of intact neurotensin in the substantia nigra after its retrograde axonal transport in dopaminergic neurons. *J Neurochem* 56:1816-1818.

Castel MN, Malgouris C, Blanchard JC, Laduron PM (1990) Retrograde axonal transport of neurotensin in the dopaminergic nigrostriatal pathway in the rat. *Neuroscience* 36:425-430.

Castel MN, Woulfe J, Wang X, Laduron PM, Beaudet A (1992b) Light and electron microscopic localization of retrogradely transported neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience* 50:269-282.

Chabry J, Gaudriault G, Vincent JP, Mazella J (1993) Implication of various forms of neurotensin receptors in the mechanism of internalization of neurotensin in cerebral neurons. *J Biol Chem* 268:17138-17144.

Chabry J, Labbé-Jullié C, Gully D, Kitabgi P, Vincent JP, Mazella J (1994) Stable expression of the cloned rat brain neurotensin receptor into fibroblasts: binding properties, photoaffinity labelling, transducing mechanisms and internalization. *J Neurochem* 63:19-27.

Chalon P, Vita N, Kaghad M, Guillemot M, Bonnin J, Delpech B, Le Fur G, Ferrarra P, Caput D (1996) Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett* 386:91-94.

Checler F, Mazella J, Kitabgi P, Vincent JP (1986a) High-affinity receptor sites and rapid proteolytic inactivation of neurotensin in primary cultured neurons. *J Neurochem* 47:1742-1748.

Checler F, Vincent JP, Kitabgi P (1986b) Purification and characterization of a novel neurotensin-degrading peptidase from rat brain synaptic membranes. *J Biol Chem* 261:11274-11281.

Chiodo LA, Bunney BS (1983) Typical and atypical neuroleptics: differential effects of chronic administration on the activity of A9 and A10 midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 3:1607-1619.

Costall B, Naylor RJ (1976) A comparison of the abilities of typical neuroleptic agents and of thioridazine, clozapine, sulpiride and metoclopramide to antagonise the hyperactivity induced by dopamine applied intracerebrally to areas of the extrapyramidal and mesolimbic systems. *Eur J Pharmacol* 40:9-19.

Cusack B, Boules M, Tyler BM, Fauq A, McCormick DJ, Richelson E (2000) Effects of a novel neurotensin peptide analog given extracranially on CNS behaviors mediated by apomorphine and haloperidol. *Brain Res* 856:48-54.

Dal Toso R, Sommer B, Ewart M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH (1989) The dopamine receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* 8:4025-4034.

DiPaola ED, Richelson E (1990) Cardiovascular effects of neurotensin and some analogues on rats. *Eur J Pharmacol* 175:279-283.

Dobner PR, Barber DL, Villa-Komaroff L, McKiernan C (1987) Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3516-3520.

Dubuc I, Costentin J, Terranova JP, Barnouin MC, Soubrié P, Le Fur G, Rostène W, Kitabgi P (1994) The nonpeptide neurotensin antagonist, SR48692, used as a tool to reveal putative neurotensin receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 112:352-354.

Elde R, Schalling M, Ceccatelli S, Nakanishi S, Hökfelt T (1990) Localization of neuropeptide receptor mRNA in rat brain: initial observations using probes for neurotensin and substance P receptors. *Neurosci Lett* 120:134-138.

Ervin GN, Birkemo LS, Nemeroff CB, Prange AJ Jr (1981) Neurotensin blocks certain amphetamine-induced behaviours. *Nature* 291:73-76.

Ervin GN, Nemeroff CB (1988) Antagonization of the behavioral activation produced by direct stimulation of forebrain dopamine receptors caused by intraaccumbens injections of neurotensin. *Neuropsychopharmacology* 1:243-250.

Evers BM, Wang X, Zhou Z, Townsend CM Jr, McNeil GP, Dobner PR (1995) Characterization of promoter elements required for cell-specific expression of the neurotensin/neuromedin N gene in a human endocrine cell line. *Mol Cell Biol* 15:3870-3881.

Fallon JH (1988) Topographic organization of ascending dopaminergic projections. *Ann NY Acad Sci* 537:1-9.

Fallon JH, Moore RY (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* 180:545-580.

Farde L, Wiesel FA, Halldin C, Sedvall G (1988) Central D₂-dopamine receptor occupancy in schizophrenic patients treated with antipsychotic drugs. *Arch Gen Psychiatry* 45:71-76.

Farkas RH, Chien PY, Nakajima S, Nakajima Y (1996) Properties of a slow nonselective cation conductance modulated by neurotensin and other neurotransmitters in midbrain dopaminergic neurons. *J Neurophysiol* 76:1968-1981.

Farkas RH, Chien PY, Nakajima S, Nakajima Y (1997) Neurotensin and dopamine D₂ activation oppositely regulate the same K⁺ conductance in rat midbrain dopaminergic neurons. *Neurosci Lett* 231:21-24.

Faure MP, Nouel D, Beaudet A (1995) Axonal and dendritic transport of internalized neurotensin in rat mesostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience* 68:519-529.

Feifel D, Minor KL, Dulawa S, Swerdlow NR (1997) The effects of intra-accumbens neurotensin on sensorimotor gating. *Brain Res* 760:80-84.

Freedman R, Waldo M, Bickford-Wimer P, Nagamoto H (1991) Elementary neuronal dysfunctions in schizophrenia. *Schizophr Res* 4:233-243.

Garver DL, Bissette G, Yao JK, Nemeroff CB (1991) Relation of CSF neurotensin concentrations to symptoms and drug response of psychotic patients. *Am J Psychiatry* 148:484-488.

Gilbert JA, McCormick DJ, Pfenning MA, Kanba KS, Enloe LJ, Moore A, Richelson E (1989) Neurotensin(8-13): comparison of novel analogs for stimulation of cyclic GMP formation in neuroblastoma clone N1E115 and receptor binding to human brain and intact N1E115 cells. *Biochem Pharmacol* 38:3377-3382.

Gilbert JA, Richelson E (1984) Neurotensin stimulates formation of cyclic GMP in murine neuroblastoma clone N1E-115. *Eur J Pharmacol* 99:245-246.

Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC (1989) Alternative splicing directs the expression of two D₂ dopamine receptor isoforms. *Nature* 342:923-926.

Goedbert M, Pinnock RD, Downes CP, Mantyh PW, Emson PC (1984) Neurotensin stimulates inositol phospholipid hydrolysis in rat brain slices. *Brain Res* 32:193-197.

Grace AA, Bunney BS (1986) Induction of depolarization block in midbrain dopamine neurons by repeated administration of haloperidol: analysis using in vivo intracellular recording. *J Pharmacol Exp Ther* 233:1092-1100.

Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni MA, Makam H, Reed L, Magenis RE, Civelli O (1989a) The human dopamine D₂ receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a *TaqI* RFLP. *Am J Hum Genet* 45:778-785.

Grandy DK, Marchionni MA, Makam H, Stofko RE, Alfano M, Frothingham L, Fischer JB, Burke-Howie KJ, Bunzow JR, Server AC (1989b) Cloning of the cDNA and gene for a human D₂ dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9762-9766.

Gully D, Canton M, Boigegrain R, Jeanjean F, Molimard JC, Poncelet M, Gueudet C, Heulme M, Leyris R, Brouard A, Pélaprat P, Labbé-Jullié C, Mazella J, Soubrié P,

Maffrand JP, Rostène W, Kitabgi P, Lefur G (1993) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:65-69.

Gully D, Labeeuw B, Boigegrain R, OuryDonat F, Bachy A, Poncelet M, Steinberg R, Suaud Chagny MF, Santucci V, Vita N, Pecceu F, Labbé-Jullié C, Kitabgi P, Soubrié P, Lefur G, Maffrand JP (1997) Biochemical and pharmacological activities of SR142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 280:802-812.

Hand TH, Hu XT, Wang RY (1987) Differential effects of acute clozapine and haloperidol on the activity of ventral tegmental (A10) and nigrostriatal (A9) dopamine neurons. *Brain Res* 415:257-269.

Hermans E, Gailly P, Octave JN, Maloteaux JM (1994) Rapid desensitization of agonist-induced calcium mobilization in transfected PC12 cells expressing the rat neurotensin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 198:400-407.

Hermans E, Jeanjean AP, Laduron PM, Octave JN, Maloteaux JM (1993) Postnatal ontogeny of the rat brain neurotensin receptor mRNA. *Neurosci Lett* 157(1):45-48.

Hermans E, Maloteaux JM, Octave JN (1992) Phospholipase C activation by neurotensin and neuromedin N in Chinese hamster ovary cells expressing the rat neurotensin receptor. *Mol Brain Res* 15:332-338.

Hu XT, Wang RY (1989) Haloperidol and clozapine: differential effects on the sensitivity of caudate-putamen neurons to dopamine agonists and cholecystokinin following one month continuous treatment. *Brain Res* 486:325-333.

Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG (1996) Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35:1503-1519.

Jolicoeur FB, De Michele G, Barbeau A, St-Pierre S (1983) Neurotensin affects hyperactivity but not stereotypy induced by pre and post synaptic dopaminergic stimulation. *Neurosci Biobehav Rev* 7:385-390.

Joyce JN (1993) The dopamine hypothesis of schizophrenia: limbic interactions with serotonin and norepinephrine.. *Psychopharmacology* 112(suppl 1):S16-34.

Kalivas PW, Burgess SK, Nemeroff CB, Prange AJ Jr (1983) Behavioral and neurochemical effects of neurotensin microinjection into the ventral tegmental area of the rat. *Neuroscience* 8:495-505.

Kalivas PW, Nemeroff CB, Prange AJ Jr (1981) Increase in spontaneous motor activity following infusion of neurotensin into the ventral tegmental area. *Brain Res* 229:525-529.

Kalivas PW, Nemeroff CB, Prange AJ Jr (1982) Neuroanatomical site specific modulation of spontaneous motor activity by neurotensin. *Eur J Pharmacol* 78:471-474.

Kalivas PW, Richardson-Carlson R, Duffy P (1986) Neuromedin N mimics the actions of neurotensin in the ventral tegmental area but not in the nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 238:1126-1131.

Kapur S, Zipurski R, Jones C, Remington G, Houle S (2000) Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects : a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157:514-520.

Kapur S, Zipurski R, Remington G, Jones C, McKay G, Houle S (1997) PET evidence that loxapine is an equipotent blocker of 5-HT₂ and D₂ receptors: implications for the treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 154:1525-1529.

Kapur S, Zipurski RB, Remington G (1999) Clinical and theoretical implications of 5-HT₂ and D₂ receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 156:286-293.

Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.

Kilts CD, Anderson CM, Bissette G, Ely TD, Nemeroff CB (1988) Differential effects of antipsychotic drugs on the neurotensin concentration of discrete rat brain nuclei. *Biochem Pharmacol* 37:1547-1554.

Kinkead B, Lorch SM, Owens MJ, Nemeroff CB (2000a) Sex- and estrous cycle-related differences in the effects of acute antipsychotic drug administration on neurotensin-containing neurons in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 295:205-211.

Kinkead B, Owens MJ, Nemeroff CB (1997) The effects of subchronic antipsychotic drug administration on neurotensin concentrations in the rat brain. *Soc Neurosci Abstr* 23:1673.

Kinkead B, Shahid S, Owens MJ, Nemeroff CB (2000b) Effects of acute and subchronic administration of typical and atypical antipsychotic drugs on the neurotensin system of the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 295:67-73.

Kislaukis E, Bullock, McNeil S, Dobner PR (1988) The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression and evolution of exon sequences. *J Biol Chem* 263:4963-4968.

Kitabgi P (1989) Neurotensin modulates dopamine neurotransmission at several levels along brain dopaminergic pathways. *Neurochem Int* 14:919-930.

Kitabgi P, Carraway R, Van Rietschoten J, Granier C, Morgat JL, Menez A, Leeman S, Freychet P (1977) Neurotensin: specific binding to synaptic membranes from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:1846-1850.

Kumari V, Soni W, Mathew VM, Sharma T (2000) Prepulse inhibition of the startle response in men with schizophrenia: effects of age of onset of illness, symptoms and medication. *Arch Gen Psychiatry* 57:609-614.

Kumari V, Soni W, Sharma T (1999) Normalization of information processing deficits in schizophrenia with clozapine. *Am J Psychiatry* 156:1046-1051.

Labbé-Jullié C, Dubuc I, Brouard A, Doulut S, Bourdel E, Pélaprat D, Mazella J, Martinez J, Rostène W, Costentin J, Kitabgi P (1994) In vivo and in vitro studies with peptide and pseudopeptide neurotensin analogs suggest the existence of neurotensin receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 268:328-336.

Laduron PM (1994) From receptor internalization to nuclear translocation. New targets for long-term pharmacology. *Biochem Pharmacol* 47:3-13.

Laduron PM (1995) Functional consequences of retrograde axonal transport of receptor-bound neurotensin. *Trends Pharmacol Sci* 16:338-343.

Lahti RA, Cochrane EV, Roberts RC, Conley RR, Tamminga CA (1998) [³H]Neurotensin receptor densities in human postmortem brain tissue obtained from normal and schizophrenic persons: An autoradiographic study. *J Neural Transm* 105:507-516.

Lambert PD, Gross R, Nemeroff CB, Kilts CD (1995) Anatomy and mechanisms of neurotensin-dopamine interactions in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 757:377-389.

Lazarus LH, Perrin MH, Brown MR (1977) Mast cell binding of neurotensin: 1. Iodination of neurotensin and characterization of interaction of the neurotensin with mast cell receptor sites. *J Biol Chem* 252:7174-7179.

Le F, Cusack B, Richelson E (1996) The neurotensin receptor: is there more than one subtype? *Trends Pharmacol Sci* 17:1-3.

Legault M, Congar P, Michel FJ, Trudeau L-E (2002) Presynaptic action of neurotensin on cultured ventral tegmental area dopaminergic neurones. *Neuroscience* 111:177-187.

Levant B, Bissette G, Davis MD, Heffner TG, Nemeroff CB (1991a) Effects of CI-943, a potential antipsychotic drug, and haloperidol on regional brain neurotensin concentrations. *Synapse* 9:225-230.

Levant B, Bissette G, Widerlov E, Nemeroff CB (1991b) Alterations in regional brain neurotensin concentrations produced by atypical antipsychotic drugs. *Regul Pept* 32:193-201.

Levant B, Merchant KM, Dorsa DM, Nemeroff CB (1992) BMY14802, a potential antipsychotic drug, increases expression of proneurotensin mRNA in the rat striatum. *Mol Brain Res* 12:279-284.

Lindström LH, Widerlöv E, Bissette G, Nemeroff C (1988) Reduced CSF neurotensin concentration in drug-free schizophrenic patients. *Schizophr Res* 1:55-59.

- Ljungberg T, Ungerstedt U (1978) Classification of neuroleptic drugs according to their ability to inhibit apomorphine-induced locomotion and yawning: evidence for two different mechanisms of action. *Psychopharmacol* 56:239-247.
- Machida R, Tokumura T, Tsuchiya Y, Sasaki A, Abe K (1993) Pharmacokinetics of novel hexapeptides with neurotensin activity in rats. *Biol Pharm Bull* 16:43-47.
- Marsault R, Frelin C (1992) Activation by nitric oxide of guanylyl cyclase in endothelial cells from brain capillaries. *J Neurochem* 59:942-945.
- Marsden CD, Tarsy D, Baldessarini RJ (1975) Spontaneous and drug-induced movement disorders in psychotic patients. In: *Psychiatry Aspects of Neurological Disease* (Benson DF and Blumer D, eds). New York: Grune and Stratton.
- Matthysse S (1973) Antipsychotic drug actions: a clue to the neuropathology of schizophrenia? *Fed Proc* 32:200-208.
- Mazella J (2001) Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* 13:1-6.
- Mazella J, Bott JM, Guillemare E, Coppola T, Sarret T, Vincent JP (1996) Structure, functional expression and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J Neurosci* 16:5613-5620.
- Mazella J, Chabry J, Kitabgi P, Vincent JP (1988) Solubilization and characterization of active neurotensin receptors in mouse brain. *J Biol Chem* 263:144-149.

Mazella J, Chabry J, Zsürger J, Vincent JP (1989) Purification of the neurotensin receptors from mouse brain by high affinity chromatography. *J Biol Chem* 264:5559-5563.

Mazella J, Kitabgi P, Vincent JP (1985) Molecular properties of neurotensin receptors in rat brain. Identification of subunits by covalent binding. *J Biol Chem* 260:508-514.

Mazella J, Zsürger N, Navarro V, Chabry J, Kaghad M, Caput D, Ferrera P, Vita N, Gully D, Maffrand JP, Vincent JP (1998) The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 273:26273-26276.

McGhie A, Chapman J (1961) Disorders of attention and perception in early schizophrenia. *Br J Med Psychol* 34:103.

Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, Van Tol HHM, Watson SJ, Civelli O (1989) Distribution of D₂ dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7625-7628.

Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC (1989) Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pki values. *J Pharmacol Exp Ther* 251:238-246.

Memo M, Castelletti L, Valerio A, Missale C, Spano PF (1986) Identification of neurotensin receptors associated with calcium channels and prolactin release in rat pituitary. *J Neurochem* 47:1682-1688.

Merchant KM, Dobie DJ, Dorsa DM (1992a) Expression of the proneurotensin gene in the rat brain and its regulation by antipsychotic drugs. *Ann NY Acad Sci* 668:54-69.

Merchant KM, Dobie DJ, Filloux FM, Totzke M, Aravagiri M, Dorsa DM (1994a) Effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on neurotensin and c-fos mRNA in rat neostriatal subregions. *J Pharmacol Exp Ther* 271:460-471.

Merchant KM, Dobner PR, Dorsa DM (1992b) Differential effects of haloperidol and clozapine on neurotensin gene transcription in rat neostriatum. *J Neurosci* 12:652-663.

Merchant KM, Hanson GR, Dorsa DM (1994b) Induction of neurotensin and c-fos mRNA in distinct subregions of rat neostriatum after acute methamphetamine: comparison with acute haloperidol. *J Pharmacol Exper Ther* 269:806-812.

Merchant KM, Miller MA (1994) Coexpression of neurotensin and c-fos mRNAs in rat neostriatal neurons following acute haloperidol. *Mol Brain Res* 23:271-277.

Minamino N, Kangawa K, Matsuo H (1984) Neuromedin N: a novel neurotensin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 122:542-549.

Moghaddam B, Bunney BS (1990) Acute effects of typical and atypical antipsychotic drugs on the release of dopamine from prefrontal cortex, nucleus accumbens, and striatum of the rat: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 54:1755-1760.

Monsma FJ, McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC, Sibley DR (1989) Multiple D₂ dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342:926-929.

Morris NJ, Ross SA, Lane WS, Moestrup SK, Petersen CM, Keller SR, Lienhard GE (1998) Sortilin is the major 110-kDa protein in GLUT4 vesicles from adipocytes. *J Biol Chem* 273:3582-3587.

Moyse E, Rostène W, Vial M, Léonard K, Mazella J, Kitabgi P, Vincent JP, Beaudet A (1987) Distribution of neurotensin binding sites in rat brain: a light microscopic radioautographic study using monoiodo ^{125}I -Tyr³-neurotensin. *Neuroscience* 22:525-536.

Navarro V, Martin S, Sarret P, Nielsen MS, Petersen CM, Vincent J, Mazella J (2001) Pharmacological properties of the mouse neurotensin receptor 3. Maintenance of cell surface receptor during internalization of neurotensin. *FEBS Letters* 495:100-105.

Nemeroff CB (1980) Neurotensin: Perchance an endogenous neuroleptic. *Biol Psychiatry* 15:283-302.

Nemeroff CB (1986) The interaction of neurotensin with dopaminergic pathways in the central nervous system: basic neurobiology and implications for the pathogenesis and treatment of schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology* 11(1):15-37.

Nemeroff CB, Bissette G, Prange AJ Jr, Loosen PT, Barlow TS, Lipton MA (1977) Neurotensin: central nervous system effects of a hypothalamic peptide. *Brain Res* 128:485-496.

Nemeroff CB, Bissette G, Widerlöv E, Beckmann H, Gerner R, Mangberg PJ, Lindström L, Prange AJ Jr, Gattaz WF (1989) Neurotensin-like immunoreactivity in cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia, depression, anorexia nervosa-bulimia, and premenstrual syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1:16-20.

Nemeroff CB, Luttinger D, Hernandez DE, Mailman RB, Mason GA, Davis SD, Widerlöv E, Frye GD, Kilts CA, Beaumont K, Breese GR, Prange AJ Jr (1983a) Interactions of

neurotensin with brain dopamine systems: biochemical and behavioral studies. *J Pharmacol Exp Ther* 225:337-345.

Nemeroff CB, Youngblood WW, Manberg PJ, Prange AJ Jr, Kizer JS (1983b) Regional brain concentrations of neuropeptides in Huntington's chorea and schizophrenia. *Science* 221:972-975.

O'Connors WT, Drew KL, Ungerstedt U (1989) Differences in dopamine release and metabolism in rat striatal subregions following acute clozapine using in vivo microdialysis. *Neurosci Lett* 98:211-216.

Olney JW, Farber NB (1995) Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 52:998-1007.

Orlowski M, Michaud C, Chu TG (1983) A soluble metalloendopeptidase from rat brain. Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. *Eur J Pharmacol* 135:81-88.

Parent A, Lavoie B (1993) The heterogeneity of the mesostriatal dopaminergic system as revealed in normal and parkinsonian monkeys. *Adv Neurol* 60:25-33.

Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, Jacobsen L, Tommerup N, Rasmussen HH, Roigaard H, Gliemann J, Madsen P, Moestrup SK (1997) Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem* 272:3599-3605.

Roberts GW, Ferrier IN, Lee Y, Crow TJ, Johnstone EC, Owens DG, Bacarese-Hamilton AJ, McGregor G, O'Shaughnessy D, Polak JM et al. (1983) Peptides, the limbic lobe and schizophrenia. *Brain Res* 288:199-211.

Sarhan S, Hitchcock JM, Grauffel CA, Wettstein JG (1997) Comparative antipsychotic profiles of neurotensin and a related systemically active peptide agonist. *Peptides* 18:1223-1227.

Sarret P, Beaudet A, Vincent JP, Mazella J (1998) Regional and cellular distribution of low affinity neurotensin receptor mRNA in adult and developing mouse brain. *J Comp Neurol* 394:344-356.

Sarret P, Esdaile MJ, Perron A, Martinez J, Stroh T, Beaudet A (2005) Potent spinal analgesia elicited through stimulation of NTS2 Neurotensin receptors. *J Neurosci* 25:8188-8196.

Sato M, Kiyama H, Yoshida S, Saika, Tohyama M (1991) Postnatal ontogeny of cells expressing prepro-neurotensin/neuromedin N mRNA in the rat forebrain and midbrain: a hybridization histochemical study involving isotope-labeled and enzyme-labeled probes. *J Comp Neurol* 310:300-315.

Sato M, Kiyama S, Tohyama M (1992) Different postnatal development of cells expressing mRNA encoding neurotensin receptor. *Neuroscience* 48:137-149.

Schotte A, Leysen JE (1989) Autoradiographic evidence for the localization of high affinity neurotensin binding sites on dopaminergic nerve terminals in the nigrostriatal and mesolimbic pathways in rat brain. *J Chem Neuroanat* 2:253-257.

Schotte A, Rostène W, Laduron PM (1988) Different subcellular localization of neurotensin-receptor and neurotensin-acceptor sites in the rat brain dopaminergic system. *J Neurochem* 50:1026-1031.

Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K (1976) Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 261:717-719.

Sharma RP, Janicak PG, Bissette G, Nemeroff CB (1997) CSF neurotensin concentrations and antipsychotic treatment in schizophrenia and schizoaffective disorders. *Am J Psychiatry* 154:1019-1021.

Shi WX, Bunney BS (1991) Neurotensin modulates autoreceptor mediated dopamine effects on midbrain dopamine cell activity. *Brain Res* 543:315-321.

Shibata K, Yamada K, Furukawa T (1987) Possible neuronal mechanisms involved in neurotensin-induced catalepsy in mice. *Psychopharmacology* 91:288-292.

Skidgel RA, Engelbrecht S, Johnson AR, Erdos EG (1984) Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* 5:769-776.

Slusher BS, Zacco AE, Maslanski JA, Norris TE, McLane MW, Moore WC, Rogers NE, Ignarro LJ (1994) The cloned neurotensin receptor mediates cyclic GMP formation when coexpressed with nitric oxide synthase cDNA. *Mol Pharmacol* 46:115-121.

Snider RM, Forray C, Pfenning M, Richelson E (1986) Neurotensin stimulates inositol phospholipids metabolism and calcium mobilization in murine neuroblastoma clone N1E-115. *J Neurochem* 47:1214-1218.

Snyder SH, Banerjee SP, Yamamura HI, Greenberg D (1974a) Drugs, neurotransmitters and schizophrenia. *Science* 184:1243-1253.

Snyder SH, Greenberg D, Yamamura HI (1974b) Antischizophrenic drugs and brain cholinergic receptors. *Arch Gen Psychiatry* 31:58-61.

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Barthenet ML, Schwartz JC (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D-3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347:146-151.

Sotty F, Brun P, Leonetti M, Steinberg R, Soubrie P, Renaud B, Suaud-Chagny MF (2000) Comparative effects of neurotensin, neurotensin(8-13) and (D-Tyr(11))neurotensin applied into the ventral tegmental area on extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Neuroscience* 98:485-492.

Souazé F (2001) Maintaining cell sensitivity to G-protein coupled receptor agonists: neurotensin and the role of the receptor gene activation. *J Neuroendocrinol* 13:473-479.

Spano PF, Govoni S, Trabucchi M (1978) Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol* 19:155-165.

Stamford JA, Kruk ZL, Millar J (1988) Actions of dopamine antagonists on stimulated striatal and limbic dopamine release: an in vivo voltammetric study. *Br J Pharmacol* 94:924-932.

Stoessl AJ (1995) Effects of neurotensin in a rodent model of tardive dyskinesia. *Neuropharmacology* 34:457-462.

Stoessl AJ, Szczutkowski E (1991) Neurotensin and neurotensin analogues modify the effects of chronic neuroleptic administration in the rat. *Brain Res* 558:289-295.

Sunahara RK, Guan HC, O'Down BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HHM, Niznik HB (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D₅ receptor with higher affinity for dopamine than D₁. *Nature* 350:614-619.

Svensson TH, Mathe JM, Andersson JL, Nomikos GG, Hildebrand BE, Marcus M (1995) Mode of action of atypical neuroleptics in relation to the phencyclidine model of schizophrenia: role of 5-HT₂ receptor and alpha(1)-adrenoreceptor antagonism. *J Clin Psychopharmacol* 15:S11-S18.

Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA (1999) Cross-species studies of sensorimotor gating of the startle reflex. *Ann NY Acad Sci* 877:202-216.

Swerdlow NR, Geyer MA (1998) Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull* 24:285-301.

Tanaka K, Masu M, Nakanishi S (1990) Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 4:847-854.

Trudeau LE (2000) Neurotensin regulates intracellular calcium in ventral tegmental area astrocytes: evidence for the involvement of multiple receptors. *Neuroscience* 97:293-302.

Truffinet P, Tamminga CA, Fabre LF, Meltzer HY, Rivière ME, Papillon-Downey C (1999) Placebo-controlled study of the D₄/5-HT_{2A} antagonist fananserin in the treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 156:419-425.

Tyler BM, Douglas CL, Fauq A, Pang YP, Stewart JA, Cusack B, McCormick DJ, Richelson E (1999) In vitro binding and CNS effects of novel neurotensin agonists that cross the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 38:1027-1034.

Tyler-McMahon BM, Stewart JA, Farinas F, McCormick DJ, Richelson E (2000) Highly potent neurotensin analog that causes hypothermia and antinociception. *Eur J Pharmacol* 390:107-111.

Uhl GR, Kuhar MJ (1984) Chronic neuroleptic treatment enhances neurotensin receptor binding in human and rat substantia nigra. *Nature* 309:350-352.

Ungerstedt U (1971) Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl* 367:1-48.

Van Tol HHM, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D₄ receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350:610-614.

Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P (1999) Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 20:302-309.

Vita N, Chalon P, Donat F, Bachy A, Kagha M, Guillemot M, Thurneysen O, Bonnin J, Delpech B, Soubrié P, Le Fur G, Caput D, Ferrara P (1997) Molecular cloning and characterization of a new human neurotensin binding site that recognizes levocabastine. *Soc Neurosci Abstr* 23:394.

Vita N, Laurent P, Lefort S, Chalon P, Dumont X, Kaghad M, Gully D, Le Fur G, Ferrara P, Caput D (1993) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett* 317:139-142.

Walker N, Lépée-Lorgeoux I, Fournier J, Betancur C, Rostène W, Ferrara P, Caput D (1998) Tissue distribution and cellular localization of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor mRNA in adult rat brain. *Mol Brain Res* 57:193-200.

Ward RP, Dorsa DM (1999) Molecular and behavioral effects mediated by Gs-coupled adenosine A_{2a}, but not serotonin 5-HT₄ or 5-HT₆ receptors following antipsychotic administration. *Neuroscience* 89:927-938.

Watson M, Isackson PJ, Makker M, Yamada MS, Yamada M, Cusack B, Richelson E (1993) Identification of a polymorphism in the human neurotensin receptor gene. *Mayo Clin Proc* 68(11):1043-1048.

Watson M, Yamada M, Cusack B, Veverka K, Bolden-Watson C, Richelson E (1992) The rat neurotensin receptor expressed in Chinese hamster ovary cells mediates the release of inositol phosphates. *J Neurochem* 59:1967-1970.

Weinberger DR, Lipska BK (1995) Cortical maldevelopment, anti-psychotic drugs, and schizophrenia: A search for a common ground. *Schizophr Res* 16:87-110.

Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HH, O'Down BF, Brann MR (1991) Dopamine D₁ and D₂ receptor mRNA expression in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1859-1863.

Werkman TR, Kruse CG, Nievelstein H, Long SK, Wadman WJ (2000) Neurotensin attenuates the quinpirole-induced inhibition of the firing rate of dopamine neurons in the rat substantia nigra pars compacta and the ventral tegmental area. *Neuroscience* 95:417-423.

White FJ, Wang RY (1983a) Differential effects of classical and atypical antipsychotic drugs on A9 and A10 dopamine cells. *Science* 221:1054-1057.

White FJ, Wang RY (1983b) Comparison of the effects of chronic haloperidol treatment on A9 and A10 dopamine neurons in the rat. *Life Science* 32:983-993.

Widerlöv E, Lindström LH, Besev G, Manberg PJ, Nemeroff CB, Breese GR, Kizer JS, Prange AJ Jr (1982) Subnormal CSF levels of neurotensin in a subgroup of schizophrenic patients: normalization after neuroleptic treatment. *Am J Psychiatry* 139:1122-1126.

Worms P, Broekkamp CLE, Lloyd KG (1983) Behavioral effects of neuroleptics. In: *Neuroleptics* (RH Roth, eds). New York: Raven Press, p 93.

Zahm DS, Williams ES, Krause JE, Welch MA, Grosu DS (1998) Distinct and interactive effects of d-amphetamine and haloperidol on levels of neurotensin and its mRNA in subterritories in the dorsal and ventral striatum of the rat. *J Comp Neurol* 400:487-503.

Zahm DS, Williams ES, Poulad D, Krause JE (1996) Temporal dissociation of neurotensin/neuromedin N mRNA expression in topographically separate subsets of rat striatal neurons following administration of haloperidol. *Brain Res Mol Brain Res* 42:71-78.

Zech M, Roberts GW, Bogerts B, Crow TJ, Polak JM (1986) Neuropeptides in the amygdala of controls, schizophrenics and patients suffering from Huntington's chorea: An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* 71:259-266.

Zhang X, Xu ZQ, Bao L, Dagerlind A, Hökfelt T (1995) Complementary distribution of receptors for neurotensin and NPY in small neurons in rat lumbar DRGs and regulation of the receptors and peptides after peripheral axotomy. *J Neurosci* 15:2733-2747.

Zsürger N, Mazella J, Vincent JP (1994) Solubilization and purification of a high affinity neurotensin receptor from newborn human brain. *Brain Res* 639:245-252.