

Université de Montréal

**Modulation des neurones dopaminergiques du
mésencéphale par la neurotensine.**

par

Fannie St-Gelais

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Sciences Neurologiques

octobre, 2006

© Fannie St-Gelais, 2006



W
4
U58
2006
V. 130

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Modulation des neurones dopaminergiques du mésencéphale par la neurotensine.

présentée par :
Fannie St-Gelais

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Laurent Descarries, président-rapporteur
Louis-Éric Trudeau, directeur de recherche
Daniel Lévesque, membre du jury
Sylvain Williams, examinateur externe
Laurent Descarries, représentant du doyen de la FES

Résumé

La neurotensine est impliquée dans la régulation de plusieurs fonctions physiologiques comme le contrôle de la douleur, celui de l'alimentation et l'inflammation. Aussi, des pathologies telles que la schizophrénie, la maladie de Parkinson, la dépendance aux drogues d'abus et certaines maladies neurodégénératives pourraient impliquer des modifications du système neurotensinergique.

La neurotensine est un peptide qui interagit avec les neurones dopaminergiques du mésencéphale et dont un effet bien connu est d'augmenter leur niveau d'excitation. Cet effet se traduit entre autre par une augmentation de la fréquence de décharge (potentiels d'action), ainsi que par une dépolarisation du potentiel membranaire du neurone. Les mécanismes sous-jacents restent cependant mal connus. L'objectif général de cette thèse est donc d'approfondir nos connaissances du mécanisme d'action de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques. Nous avons montré que l'effet excitateur de la neurotensine sur la fréquence de décharge est dépendant du calcium et de l'activation de conductances cationiques non sélectives. En effet, l'augmentation de la fréquence de décharge induite par la neurotensine est bloquée par le chélateur du calcium BAPTA et par les bloqueurs de canaux cationiques SKF96365 et l'ion Zn^{2+} . En plus de cet effet excitateur sur les propriétés électrophysiologiques des neurones dopaminergiques, la neurotensine induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, ce calcium provenant majoritairement du milieu extracellulaire.

La neurotensine agit aussi sur les neurones dopaminergiques en bloquant partiellement la fonction des autorécepteurs D2. L'activation de l'autorécepteur D2 entraîne une inhibition de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques et cette inhibition est diminuée en présence de neurotensine. Un des objectifs de ce travail de thèse était de caractériser le mécanisme par lequel la neurotensine affecte la fonction des récepteurs D2. Nous avons montré que l'action de la neurotensine sur le récepteur D2 passe par une

activation de la PKC. En effet, l'application de bloqueurs de la PKC empêche cette interaction, alors que l'application d'un activateur de la PKC mime l'action de la neurotensine et bloque à lui seul la fonction du récepteur D2. Bien que la neurotensine inhibe la fonction du récepteur D2, nous avons constaté que l'effet excitateur de ce neuropeptide est indépendant de sa capacité à réguler ce récepteur. En effet, l'application d'un antagoniste du récepteur D2, le sulpiride, ne permet pas de bloquer l'effet excitateur de la neurotensine.

Nos travaux identifient de nouvelles voies par lesquelles la neurotensine produit son effet excitateur sur les neurones dopaminergiques et par lesquelles passe l'interaction entre la neurotensine et le récepteur dopaminergique D2. L'étude des mécanismes d'action cellulaires de la neurotensine revêt un intérêt particulier étant donné l'implication physiopathologique de ce peptide.

Mots-clés : neurotensine, neurones dopaminergiques, mésencéphale, patch clamp, calcium intracellulaire, PKC.

Abstract

Neurotensin plays a role in many physiological functions such as the control of pain, feeding and inflammation. In addition, pathologies such as schizophrenia, Parkinson disease, drug abuse and some neurodegenerative disorders could implicate some modifications in the neurotensinergic system.

Neurotensin is a peptide that interacts with midbrain dopaminergic neurons and one of its better known effect is to increase the excitation level of those neurons. This is due in part to an increase in action potentials firing rate and to a depolarisation of the membrane potential. However, the mechanisms underlying these effects remain to be described. The main goal of this thesis was to improve our knowledge of the mechanisms of action of neurotensin on dopaminergic neurons. We have shown that the excitatory effect of neurotensin on firing rate is blocked by the calcium chelator BAPTA, and is thus calcium-dependent. This excitation is also blocked by the cationic channel blockers SKF96355 and Zn^{2+} , and is therefore mediated by non-selective cationic conductances. We have also demonstrated that neurotensin induces an increase in intracellular calcium concentration in dopaminergic neurons, an effect that requires influx from the extracellular medium.

In addition to these direct effects of neurotensin on intracellular calcium levels and on cationic conductances, neurotensin also acts on dopaminergic neurons by inhibiting the function of the D2 autoreceptor. Pre-application of neurotensin reduces the ability of a D2 receptor agonist to inhibit firing rate. Our objective was to establish a cell-culture model of this regulation and to investigate the mechanism by which neurotensin affects the function of D2 receptors. We showed that the effect of neurotensin on the D2 receptor requires PKC activation since application of PKC blockers disrupt this interaction and application of a PKC activator mimics the action of neurotensin. Although neurotensin inhibits D2 receptor function, which could in principle lead to disinhibition of the firing rate, we found that the D2 receptor antagonist, sulpiride does not prevent the excitatory effect of neurotensin. This

demonstrates that inhibition of D2 receptor function is not required for the neurotensin-induced excitation of dopaminergic neurons.

Our studies have identified new pathways by which neurotensin induces its excitatory effect on dopaminergic neurons and by which the interaction between neurotensin and the D2 receptor take place. Understanding the cellular mechanism of action of neurotensin is of particular interest because of the physiopathological implications of the peptide.

Keywords : neurotensin, dopaminergic neurons, midbrain, patch clamp, intracellular calcium, PKC.

Table des matières

| | |
|--|------|
| Résumé..... | iii |
| Abstract | v |
| Liste des tableaux..... | xi |
| Liste des figures | xii |
| Liste des abbréviations..... | xiii |
| INTRODUCTION | 1 |
| PARTIE I : LE SYSTÈME DOPAMINERGIQUE..... | 2 |
| 1.1. La dopamine..... | 2 |
| 1.2. Anatomie du système dopaminergique | 4 |
| 1.3. Les récepteurs dopaminergiques..... | 7 |
| 1.4. Voies de signalisation activées par les récepteurs dopaminergiques | 9 |
| 1.4.1. Voies de signalisation impliquant l'adénylate cyclase..... | 9 |
| 1.4.2. Conductances potassiques de type GIRK | 11 |
| 1.4.3. Effet d'un agoniste du récepteur D2 sur l'activité du neurone dopaminergique | 12 |
| 1.4.4. Voies de signalisation activées par le récepteur D2 en parallèle à la voie de l'adénylate cyclase | 13 |
| 1.4.5. Le récepteur D2 et la régulation de l'expression des gènes et des peptides .. | 14 |
| 1.5. Régulation de la fonction du récepteur D2 | 15 |
| 1.5.1. Phosphorylation et internalisation du récepteur D2 | 15 |
| 1.5.2. Partenaires du récepteur D2 influençant son activité..... | 17 |
| 1.5.3. Oligomérisation du récepteur D2..... | 17 |
| 1.6. Pathologies associées au système dopaminergique..... | 18 |
| 1.6.1. Maladie de Parkinson..... | 18 |
| 1.6.2. Schizophrénie..... | 19 |
| 1.6.3. Consommation de drogue d'abus..... | 22 |
| 1.6.4. Dépression..... | 24 |

| | |
|---|----|
| PARTIE II : LA NEUROTENSINE | 25 |
| 2.1. La neurotensine | 25 |
| 2.1.1. Structure de la neurotensine | 25 |
| 2.1.2. Synthèse et dégradation de la neurotensine | 26 |
| 2.1.3. Localisation de la neurotensine dans le SNC et le SNP | 27 |
| 2.2. Les récepteurs de la neurotensine | 29 |
| 2.2.1. Historique de la découverte des récepteurs de la neurotensine | 29 |
| 2.2.2. Structure et fonction des sous-types de récepteurs de la neurotensine | 31 |
| 2.2.3. Localisation des récepteurs neurotensinergiques dans le cerveau | 34 |
| 2.2.4. Localisation cellulaire des récepteurs de la neurotensine | 36 |
| 2.2.5. Pharmacologie des récepteurs neurotensinergique | 36 |
| PARTIE III : EFFETS DE LA NEUROTENSINE SUR LES NEURONES DOPAMINERGIQUES | 39 |
| 3.1. Effets de la neurotensine sur l'activité des neurones dopaminergiques..... | 39 |
| 3.1.1. Effets de la neurotensine sur la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques | 40 |
| 3.1.2. Effet de la neurotensine sur la relâche de dopamine..... | 41 |
| 3.1.3. Effets de la neurotensine sur les conductances ioniques..... | 42 |
| 3.2. Voies de signalisation activées par la neurotensine | 44 |
| 3.2.1. Voies moléculaires activées par la neurotensine..... | 44 |
| 3.2.2. Internalisation du complexe ligand-récepteur (NT- récepteur NT) | 47 |
| 3.2.3. Effet de la neurotensine sur les niveaux de calcium intracellulaire | 49 |
| 3.3. Introduction de l'article 1 | 49 |
| PARTIE IV : INTERACTION ENTRE LA NEUROTENSINE ET LE RÉCEPTEUR DOPAMINERGIQUE D2..... | 51 |
| 4.1. Colocalisation anatomique de la neurotensine et de la dopamine dans le mésencéphale | 51 |

| | |
|---|---------|
| 4.2. Données comportementales à l'appui d'une interaction entre la neurotensine et le système dopaminergique | 52 |
| 4.3. Données biochimiques à l'appui d'une interaction entre la neurotensine et le récepteur D2 | 53 |
| 4.4. Données électrophysiologiques à l'appui d'une interaction entre la neurotensine et le récepteur D2 | 54 |
| 4.4.1. Interaction impliquant des conductances ioniques..... | 54 |
| 4.4.2. Interactions affectant la décharge des neurones..... | 55 |
| 4.5. Hypothèse proposée pour expliquer le mécanisme d'interaction entre la neurotensine et ses récepteurs et le récepteur D2..... | 56 |
| RÉSULTATS | 57 |
| Contribution des co-auteurs | 58 |
| ARTICLE 1 | 60 |
| ARTICLE 2 | 95 |
| DISCUSSION | 131 |
| Considérations méthodologiques | 131 |
| Cultures cellulaires..... | 131 |
| Tranches aigues de mésencéphale :..... | 134 |
| Modèles de tranches aigues et cultures cellulaires : différences dans les résultats obtenus | 139 |
| Mesure de l'excitabilité des neurone dopaminergiques | 142 |
| Résultats (article 1) | 143 |
| Résultats (article 2) | 147 |
| Perspectives..... | 150 |
| Implications physiopathologiques de cette interaction | 151 |
| L'interaction entre la neurotensine et le récepteur D2 est réciproque | 152 |

Implications physiopathologiques de la neurotensine..... 153
ARTICLE 3..... 154
Conclusion 224
Bibliographie..... 225
Annexe 269
Introduction de l'article 4..... 270
ARTICLE 4..... I

Liste des tableaux

| | | |
|-------------|--|-----|
| Tableau 1 : | Résumé des modifications des systèmes de neurotransmetteurs observées chez le schizophrène et des médicaments utilisés pour agir sur ces systèmes..... | 22 |
| Tableau 2 : | Caractéristiques pharmacologiques des récepteurs neurotensinergiques | 37 |
| Tableau 3 : | Études rapportant l'incidence de la présence du courant I _h et celle du phénotype dopaminergique vérifié par immunohistochimie..... | 135 |

Liste des figures

| | | |
|-------------|---|----|
| Figure 1. | Schéma de la voie de synthèse de la dopamine..... | 2 |
| Figure 2. | Schéma des projections dopaminergiques sur une coupe sagittale d'un cerveau de rat..... | 4 |
| Figure 3. | Principaux noyaux mésencéphaliques contenant des neurones dopaminergiques. | 6 |
| Figure 4. | Schéma des voies de signalisation des récepteurs dopaminergiques D1 et D2..... | 10 |
| Figure 5. | Schéma représentant la séquence d'acides aminés du récepteur D2L chez le rat..... | 16 |
| Figure 6. | Séquence des acides aminés composant la neurotensine..... | 26 |
| Figure 7. | Représentation schématique des voies neurotensinergiques impliquant les neurones dopaminergiques du mésencéphale..... | 28 |
| Figure 8. | Représentation schématique des récepteurs rNTS1 et mNTS2..... | 32 |
| Figure 9. | Représentation schématique du récepteur neurotensinergique de type 3 (hNTS3)..... | 33 |
| Figure 10 : | Schéma de la voie de signalisation du récepteur neurotensinergique NTS1..... | 45 |
| Figure 11. | Représentation schématique de l'internalisation du complexe neurotensine-NTS1 via un mécanisme dépendant de vésicules tapissées de clathrine..... | 48 |

Liste des abbréviations

| | |
|------------|---|
| AC : | Adénylate cyclase |
| ADN : | Acide désoxyribonucléique |
| AMPc : | Adénosine monophosphate cyclique |
| ARNm : | acide ribonucléique messenger |
| ATP : | Adénosine triphosphate |
| ATV : | Aire tegmentaire ventrale |
| bdB : | Bande diagonale de Broca |
| BRET : | « Bioluminescence resonance energy transfer » (Transfert résonnant d'énergie de bioluminescence) |
| BST : | Noyau du lit de la strie terminale |
| cAMP : | Adénosine monophosphate cyclique |
| CPF : | Cortex préfrontal |
| cPLA2 : | Phospholipase A2 dépendante du calcium |
| CREB : | « cAMP-responsive element binding protein » (protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc) |
| D2S: | Isoforme courte du récepteur D2 |
| D2L: | Isoforme longue du récepteur D2 |
| DA : | Dopamine |
| DAG : | Diacylglycérol |
| DAT: | Transporteur de la dopamine |
| DARPP-32 : | « Dopamine and cyclic adenoside 3'-5'-monophosphate regulated phosphoprotein, 32KDa » (phosphoprotéine régulée par la dopamine et l'adénosine cyclique monophosphate) |
| DISC : | « Disrupted in Schizophrenia » |

| | |
|----------|---|
| EGFP: | « Enhanced-green fluorescence protein » (protéine à fluorescence augmentée verte) |
| FRET: | « Fluorescence resonance energy transfer » (Transfert résonnant d'énergie de fluorescence) |
| GABA: | Acide γ -aminobutyrique |
| GDP : | Guanosine diphosphate |
| GFP: | « Green fluorescence protein» (protéine fluorescente verte) |
| GIRK : | « G-protein gated inward rectifying K ⁺ channel » (canal K ⁺ à rectification entrante activé par les protéines G) |
| GP : | Globus pallidus |
| GMPc : | Guanylate monophosphate cyclique |
| GRK: | Kinase des récepteurs couplés aux protéines G |
| GSK : | Kinase glycogène synthétase |
| GTP : | Guanosine triphosphate |
| 5-HT: | Sérotonine |
| IC50 : | Concentration pour obtenir 50% d'inhibition |
| Ih : | Courant activé par l'hyperpolarisation |
| IP3 : | Inositol triphosphate |
| Kd : | Constante de dissociation |
| Kir : | Canaux potassiques à rectification entrante |
| LC : | Locus coeruleus |
| L-DOPA : | L-dihydroxyphénylalanine |
| LRi : | Noyau linéaire rostral du raphé |
| LS : | Septum latéral |
| LSD : | Diéthyl-lysergamide |
| MAOI : | Inhibiteurs de la monoamine oxydase |
| MAPK : | « Mitogen Activated Protein Kinase » (protéine kinase activée par des agents mitogènes) |

| | |
|---------|--|
| mGLUR: | Récepteur glutamatergique métabotropique |
| NCS-1 : | « Neural calcium sensor » (senseur calcique neuronal) |
| NMDA : | N-méthyl-D-aspartate |
| NN : | Neuromédine |
| NO : | Oxyde nitrique |
| NPL : | Noyau parabrachial latéral |
| NT : | Neurotensine |
| NTS : | Sous-type de récepteur neurotensinergique |
| PAG : | Substance grise périaqueducule |
| Par-4 : | « Prostate apoptosis response-4 » (Réponse apoptotique de la prostate) |
| PCP : | Phencyclidine |
| PIP2 : | Phosphatidyl inositol 4-5 biphosphate |
| PKA : | cAMP-dependent protein kinase |
| PKC : | Protéine kinase C |
| PLC : | Phospholipase C |
| PLT : | Potentialisation à long terme |
| PP : | Protéine phosphatase |
| RCPG : | Récepteur couplé a une protéine G |
| RD : | Raphé dorsal |
| RE : | Réticulum endoplasmique |
| RLi : | Noyau linéaire rostral du raphé |
| RRF : | « Retro-rubral field » (Champ rétrorubral) |
| SN : | Substance noire |
| SNC : | Système nerveux central |
| SNP : | Système nerveux périphérique |
| SNc : | Substance noire compacte |
| SNr : | Substance noire réticulée |
| SST : | Somatostatine |

| | |
|-------|------------------------------|
| TH : | Tyrosine hydroxylase |
| TM: | Domaine transmembranaire |
| TNG: | Transgolgi |
| Trp : | Tryptophane |
| TRP: | Transient receptor potential |
| VP : | Pallidum ventral |

A mes parents

Remerciements

J'aimerais remercier les gens qui m'ont aidé dans la rédaction de cette thèse et dans la réalisation des travaux de recherche qui l'ont précédée. D'abord j'aimerais remercier mon directeur de recherche le Dr Louis-Éric Trudeau pour l'aide et le soutien qu'il m'a accordés depuis mon arrivée à l'Université de Montréal. Son intelligence et sa passion pour la science sont sources d'inspiration pour les étudiants.

Merci aux membres du jury de ma thèse, qui ont travaillé à la révision de ce manuscrit, les Drs Laurent Descarries, Sylvain Williams et Daniel Lévesque. J'aimerais aussi remercier les membres de mon comité de parrainage, les Drs Jean-Claude Lacaille et Pierre-Paul Rompré, qui m'ont donné de leur temps, de leurs conseils et encouragements au cours de ma formation doctorale.

Merci à tous les étudiants et aux membres du personnel que j'ai côtoyés, avec lesquels j'ai collaboré durant ces dernières années et qui ont égayé mon séjour à l'Université de Montréal : Claudia Jomphe, Grégory Dal Bo, Patrice Congar, Francois Michel, Annie Bergevin, Gabriel Fortin et Marie-Josée Bourque. Un merci spécial au Dr Jean-Claude Lacaille et aux membres de son laboratoire pour leur accueil parmi eux. Merci entre autre à Delphine Gobert, France Morin et Geneviève Lebeau pour le partage de l'espace et de l'équipement.

Finalement, un gros merci à mes parents et à ma sœur Laurence pour leurs supports et leurs encouragements. Un merci spécial à mon amie Mélanie, qui m'a toujours supportée et divertie dans les moments plus difficiles.

INTRODUCTION

L'étude des mécanismes régulant les fonctions cérébrales, la pensée, la cognition et l'apprentissage, est un domaine de recherche fascinant. La dopamine est présente de façon ubiquitaire dans le cerveau, jouant conséquemment un rôle important dans plusieurs fonctions cérébrales et comportements tels la motivation, la cognition et l'initiation du mouvement et certaines pathologies dont les plus connues sont la schizophrénie et la maladie de Parkinson. Ceci en fait un neurotransmetteur très intéressant à étudier. L'activité des neurones dopaminergique est régulée par plusieurs transmetteurs, dont la neurotensine. Celle-ci est un peptide largement distribué dans le cerveau et dont l'effet général est excitateur sur les neurones à dopamine. Cependant, les voies de signalisation qui médient cet effet demeurent peu connues. Le premier objectif de mon travail de doctorat a été de caractériser certains des mécanismes d'action intracellulaires de la neurotensine. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle du calcium. Une autre des actions connues de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques est la désensibilisation de la fonction de l'autorécepteur D2. La mise à jour du mécanisme de cette interaction a constitué le deuxième objectif de cette thèse. Les implications connues et potentielles de la neurotensine dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques justifient l'intérêt porté aux modes d'action de ce neuropeptide.

PARTIE I : LE SYSTÈME DOPAMINERGIQUE

1.1. La dopamine

La dopamine fait partie de la famille des neurotransmetteurs catécholaminergiques, au même titre que l'adrénaline et la noradrénaline.

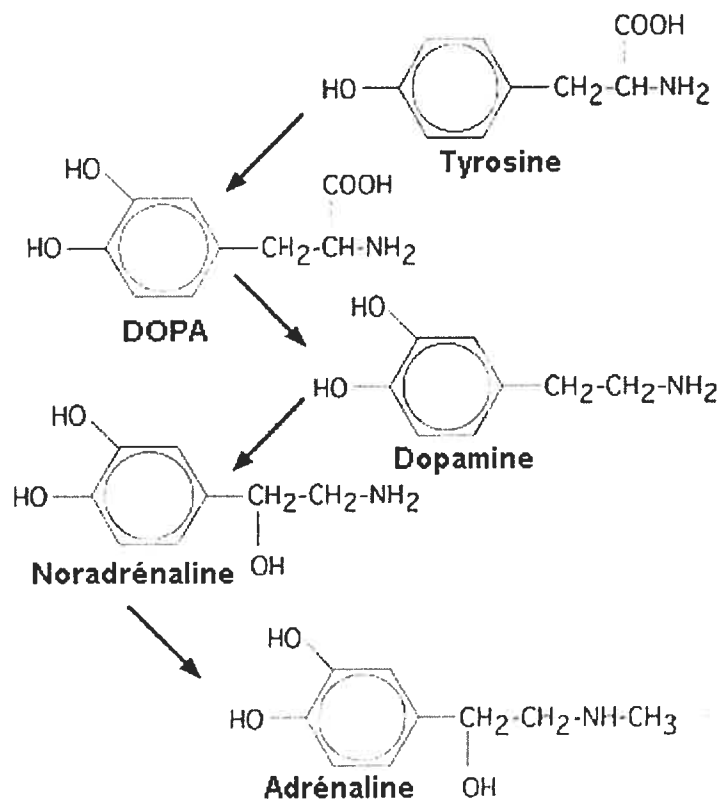


Figure 1. Schéma de la voie de synthèse de la dopamine (D'après <http://homepage.psy.utexas.edu/homepage/class/Psy301/Salinas/sec2/Brain/transparencies03.html>).

Ces transmetteurs catécholaminergiques sont synthétisés à partir de la tyrosine (figure 1). La production de dopamine est le résultat de deux processus enzymatiques, impliquant d'abord la tyrosine hydroxylase puis la DOPA-décarboxylase. A partir de la dopamine peuvent ensuite être synthétisées l'adrénaline et la noradrénaline. L'immunoréactivité contre la tyrosine hydroxylase est une méthode répandue pour l'identification des neurones dopaminergiques dans les régions du cerveau qui ne contiennent pas de neurones adrénérgiques ou noradrénérgiques.

Dans les neurones dopaminergiques, la dopamine synthétisée est emmagasinée dans des vésicules synaptiques de la terminaison axonale et elle est relâchée en réponse à un signal calcique généré par l'arrivée d'un potentiel d'action. La dopamine relâchée par les terminaisons synaptique peut ainsi activer les récepteurs dopaminergiques post-synaptiques, ainsi que les autorécepteurs situés sur la membrane des neurones dopaminergiques eux-mêmes. La transmission du signal dopaminergique se termine principalement du fait de la re-capture rapide de la dopamine par les transporteurs de la dopamine également situés sur la membrane de ces neurones (Jones et al., 1998; Benoit-Marand et al., 2000). En plus d'induire la libération terminale de dopamine, l'augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques entraîne une relâche somatodendritique de dopamine. Le mécanisme par lequel cette relâche s'effectue est toujours controversé puisque certaines conditions expérimentales suggèrent une implication du transporteur de la dopamine alors que d'autres démontrent l'implication d'un mécanisme d'exocytose (Beart et al., 1979; Falkenburger et al., 2001; Fortin et al., 2006). La dopamine libérée au niveau somatodendritique peut agir de façon rétrograde sur les neurones dopaminergiques et stimuler les autorécepteurs exprimés sur leur corps cellulaire, ce qui entraîne une diminution de l'activité des neurones.

1.2. Anatomie du système dopaminergique

Dans le système nerveux central, les neurones dopaminergiques sont regroupés dans différentes régions ou noyaux. Ces neurones dopaminergiques se projettent dans plusieurs régions du cerveau et affectent ainsi de multiples fonctions cérébrales. Le groupe de neurones dopaminergiques le plus important est situé dans la partie ventrale du mésencéphale, qui contient environ 90% du nombre total de cellules dopaminergiques du cerveau. Cette région se divise en plusieurs noyaux : le champ rétrosubstantiel (aire A8), l'aire tegmentaire ventrale (ATV) (aire A10) et la substance noire (SN) (aire A9). Cette dernière région est partagée entre la SN compacte (SNc) et la SN réticulée (SNr).

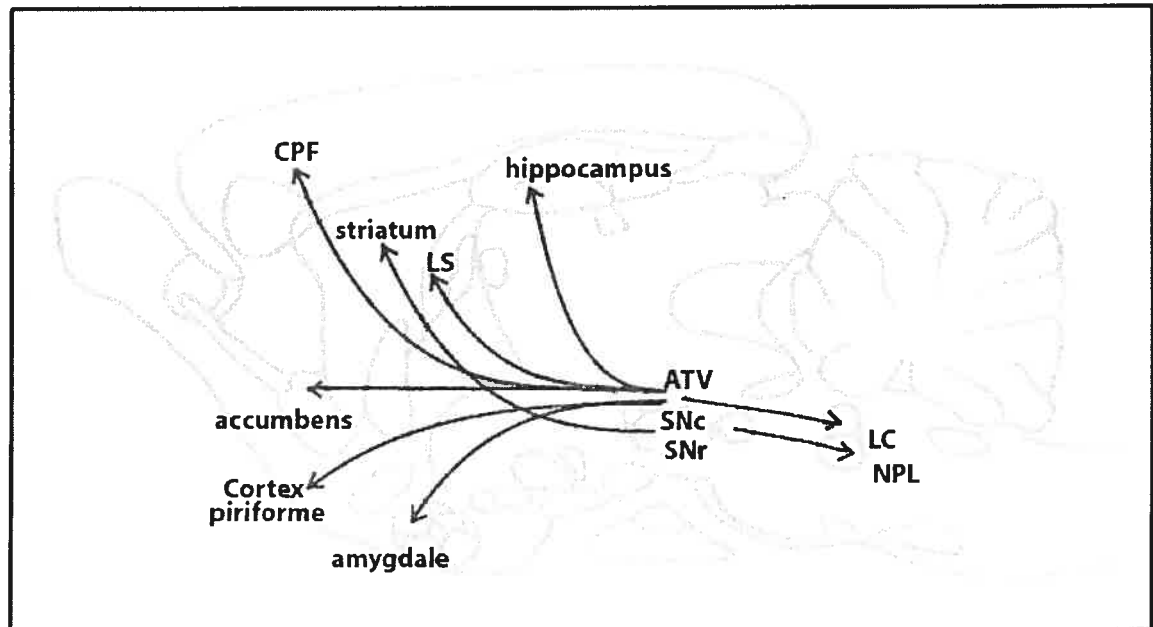


Figure 2. Schéma des projections dopaminergiques sur une coupe sagittale d'un cerveau de rat. Abréviations : CPF, cortex préfrontal; LC, locus coeruleus; LS, septum latéral; NPL, noyau parabrachial latéral (adapté de St-Gelais et al., 2006).

Les neurones dopaminergiques dont les corps cellulaire et dendrites sont situés dans le mésencéphale se projettent dans plusieurs régions du cerveau en formant principalement les voies nigrostriées et mésocorticolimbiques (figure 2). Les neurones dopaminergiques de la SN qui se projettent dans le striatum innervent plus précisément le noyau caudé-putamen. Ces neurones seraient impliqués dans l'initiation de la réponse motrice et dans certaines pathologies comme la maladie de Parkinson et la chorée de Huntington. La voie mésocorticolimbique comprend les neurones de l'ATV qui se projettent vers le cortex préfrontal et temporal ainsi que dans le striatum ventral (qui correspond au noyau accumbens chez le rongeur) et certaines structures limbiques comme le noyau central de l'amygdale, le septum latéral, l'hippocampe, le tubercule olfactif et le noyau du lit de la strie terminale. Ces projections sont impliquées dans des processus physiologiques comme la cognition, l'éveil, l'attention, la mémoire, l'apprentissage et la motivation; elles soutiennent des fonctions émotionnelles et sont aussi impliquées dans les mécanismes de renforcement et de récompense mis à contribution lors de la recherche de plaisir ou de la prise de drogues d'abus. Les neurones dopaminergiques de l'ATV sont également associés à certaines conditions pathologiques comme la schizophrénie. Quant aux neurones dopaminergiques du champ rétro-rubral, ils se projettent au locus coeruleus et au noyau parabrachial latéral.

En plus des noyaux A8, A9 et A10, le mésencéphale regroupe d'autres noyaux contenant des neurones dopaminergiques. En effet, certaines extensions du raphé comme la substance grise périaqueducale (PAG), le noyau raphé dorsal (RD) et le noyau linéaire rostral du raphé (LRi) contiennent une certaine proportion de neurones dopaminergiques (figure 3). La région comprenant le PAG et le noyau raphé dorsal est aussi appelé le noyau A10 dorso-caudal (Hokfelt et al., 1984; Hasue and Shammah-Lagnado, 2002). Les neurones dopaminergiques des noyaux RLi et PAG se projettent soit localement soit dans différentes structures comme le noyau central de l'amygdale, le noyau du lit de la strie terminale, l'amygdale et la substantia innominata (Ottersen, 1981; Hasue and Shammah-

Lagnado, 2002). Les neurones dopaminergiques situés dans le noyau raphé dorsal quant à eux se projettent au striatum (Descarries et al., 1986). Les rôles physiologiques de cette petite population de neurones ont fait l'objet de peu d'études, mais, récemment, une implication des cellules dopaminergiques des noyaux RLi et PAG dans certaines propriétés de sensibilisation et de récompense de l'héroïne a été suggérée (Flores et al., 2005).

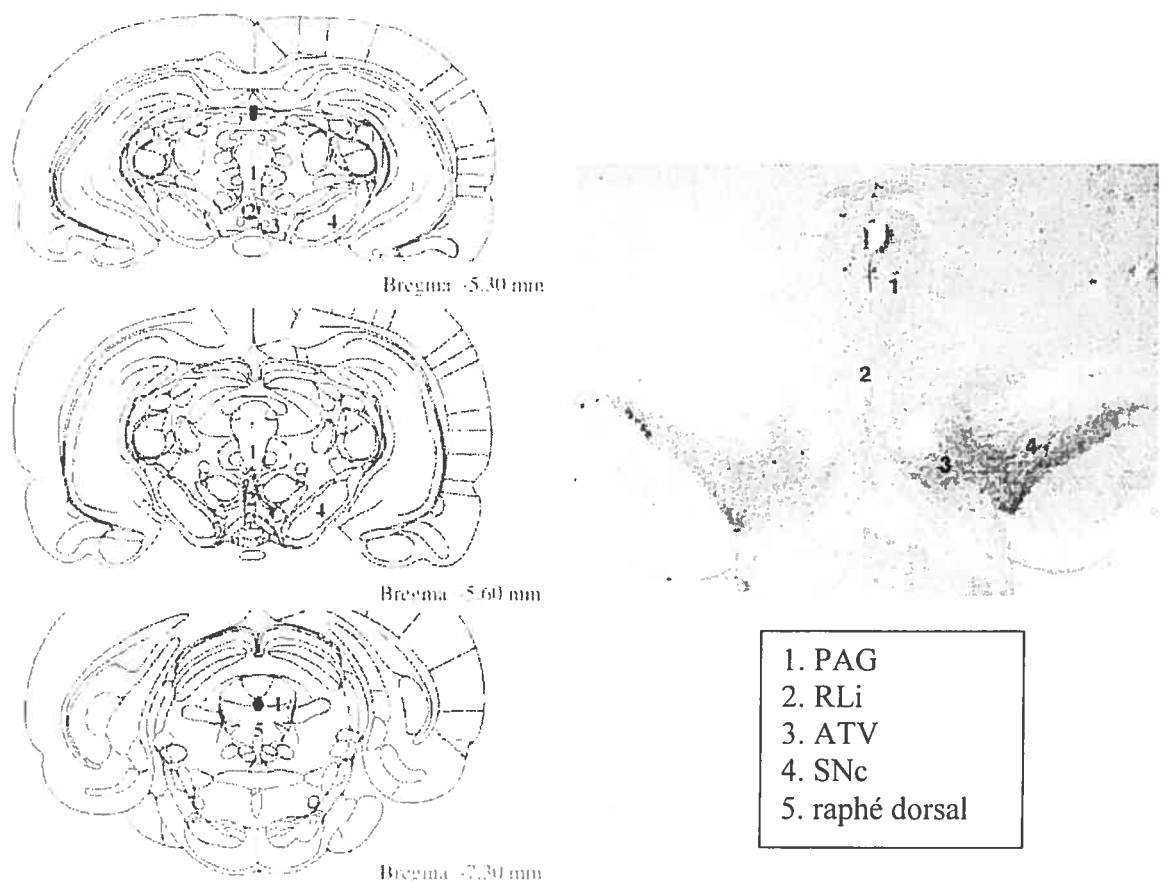


Figure 3. Principaux noyaux mésencéphaliques contenant des neurones dopaminergiques. Colonne de gauche: dessins de coupes transverses du cerveau de rat incluant mésencéphale (à partir de l'atlas Paxinos and Watson, 1997). Colonne de droite : photographie d'une coupe transverse du mésencéphale après marquage immunohistochimique de la tyrosine hydroxylase (d'après Flores et al., 2005).

En plus de leur présence dans le mésencéphale, on retrouve aussi des neurones dopaminergiques dans le diencephale (aires A11-A14). Les cellules des groupes A11 et A13 se situent plus précisément dans l'hypothalamus dorsal et sont à l'origine d'une projection descendante vers la moelle épinière. On retrouve aussi des neurones dopaminergiques dans le bulbe olfactif (A15 et A16) et la rétine (A17) (Witkovsky, 2004).

L'aire tegmentaire ventrale, qui nous intéresse davantage dans la présente étude, est une région au contenu neuronal hétérogène. En effet, en plus des neurones dopaminergiques, on y retrouve des neurones GABAergiques, qui exercent la fonction d'interneurones inhibiteurs au niveau local, mais dont certains sont aussi des neurones de projection (Nagai et al., 1983).

1.3. Les récepteurs dopaminergiques

L'effet de la dopamine est transmis par cinq types de récepteurs qui ont été clonés et nommés D1 à D5. Les récepteurs dopaminergiques sont exprimés par plusieurs populations de neurones : des neurones GABAergiques, glutamatergiques, sérotoninergiques, cholinergiques et peptidergiques, localisés dans différentes structures cérébrales (Jaber et al., 1996; Baldessarini and Tarazi, 1996). En plus de cette situation post-synaptique des récepteurs dopaminergiques D1 à D5, les récepteurs de type D2 et D3 jouent le rôle d'autorécepteurs, étant exprimés par les neurones dopaminergiques eux-mêmes (Sesack et al., 1994). Ces autorécepteurs régulent et contrôlent de façon rétrograde l'activité des neurones dopaminergiques. La dopamine, relâchée à la terminaison axonale et à partir du compartiment somatodendritique lorsque le neurone dopaminergique est excité, peut se lier aux autorécepteurs et entraîner une inhibition de l'activité des neurones et conséquemment de la relâche de dopamine.

Il existe 2 isoformes des récepteurs D2 qui diffèrent l'une de l'autre par leur structure et leur localisation. Des données suggèrent que l'isoforme courte (D2S, 415 acides aminés) soit plus abondante au niveau pré-synaptique alors que l'isoforme longue (D2L, 444 acides aminés) prédomine au niveau post-synaptique (Martres et al., 1992; Khan et al., 1998; Wang et al., 2000; Usiello et al., 2000; Centonze et al., 2002; Lindgren et al., 2003). Ces 2 isoformes sont générées par épissage alternatif (Picetti et al., 1997) et la différence de leur séquence d'acides aminés se retrouve dans la 3^e boucle intracellulaire : l'isoforme D2L comprend 29 acides aminés additionnels. Comme la 3^e boucle intracellulaire est un site majeur d'interaction entre le récepteur et les protéines G, il pourrait donc exister des différences fonctionnelles entre les isoformes. Par contre, jusqu'à maintenant, peu de différences entre les fonctions du D2S et du D2L ont été répertoriées, si ce n'est que les autorécepteurs D2 ont une affinité pour la dopamine et certains agonistes dopaminergiques de 5 à 10 fois plus grande que les récepteurs D2 situés en post-synaptique (Leysen et al., 1993).

Il existe plusieurs outils pharmacologiques pour activer ou bloquer les récepteurs dopaminergiques D2: des agonistes comme la bromocriptine et le quinpirole et des antagonistes comme le sulpiride, les phénothiazines, les thioxanthènes, les butyrophénones et la clozapine. Les molécules agissant comme antagonistes du récepteur D2 ont des effets antipsychotiques et sont utilisées dans le traitement des symptômes de la schizophrénie. En plus de ces outils pharmacologiques, des lignées de souris génétiquement déficientes en récepteur D2 ont été développées. Certaines lignées sont spécifiquement déficientes en D2L (Usiello et al., 2000) et d'autres à la fois en D2L et D2S (Baik et al., 1995) ce qui permet de mieux caractériser les propriétés des 2 isoformes.

1.4. Voies de signalisation activées par les récepteurs dopaminergiques

Les cinq types de récepteurs dopaminergiques, D1 à D5, font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), qui sont structurellement caractérisés par leurs 7 passages transmembranaires. Ces récepteurs à dopamine sont divisés en deux classes suivant le sens de leur effet sur l'activité de l'adénylate cyclase (AC). La première famille, celle des récepteurs de type D1, comprend les sous-types D1 et D5. La stimulation des récepteurs de cette classe induit une activation de l'adénylate cyclase via les protéines Gs. La deuxième famille, celle des récepteurs de type D2, comprend les sous-types D2, D3 et D4. Les récepteurs de cette classe inhibent l'activité de l'adénylate cyclase via leur couplage aux protéines Gi.

1.4.1. Voies de signalisation impliquant l'adénylate cyclase

Plusieurs messagers et effecteurs sont recrutés et mis à contribution lors de la stimulation d'un RCPG par son agoniste. La liaison du transmetteur à un RCPG permet la liaison de ce dernier avec une protéine G, elle-même associée à une molécule de guanoside diphosphate (GDP). La liaison de l'agoniste entraîne un changement de conformation du récepteur qui mène au remplacement du GDP par une molécule de guanoside triphosphate (GTP). L'arrivée du GTP entraîne la dissociation de la protéine G en 2 composantes : la sous unité α et un complexe formé des sous-unités $\beta\gamma$. La dissociation de la protéine G entraîne l'activation de la sous-unité α . Il y a plusieurs types de sous-unités α qui entraînent des voies de signalisation différentes : les sous-unités de type α_s entraînent l'activation de l'adénylate cyclase alors que les sous-unités α_i entraînent au contraire une inhibition de l'adénylate cyclase. Dans le cas d'une activation, l'adénylate cyclase convertit une molécule d'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Quatre molécules d'AMPc se lient ensuite aux 2 sous-unités régulatrices de la protéine kinase A (PKA), qui se trouve activée à son tour. En phosphorylant des substrats

spécifiques, la PKA induira la réponse cellulaire. Cette cascade moléculaire, activée par la stimulation des protéines Gs est au contraire inhibée par une protéine de type Gi, menant à une inhibition de l'adénylate cyclase et ultimement de la PKA. C'est ce dernier effet qui a lieu lors de la stimulation des récepteurs dopaminergiques de type D2 (figure 4).

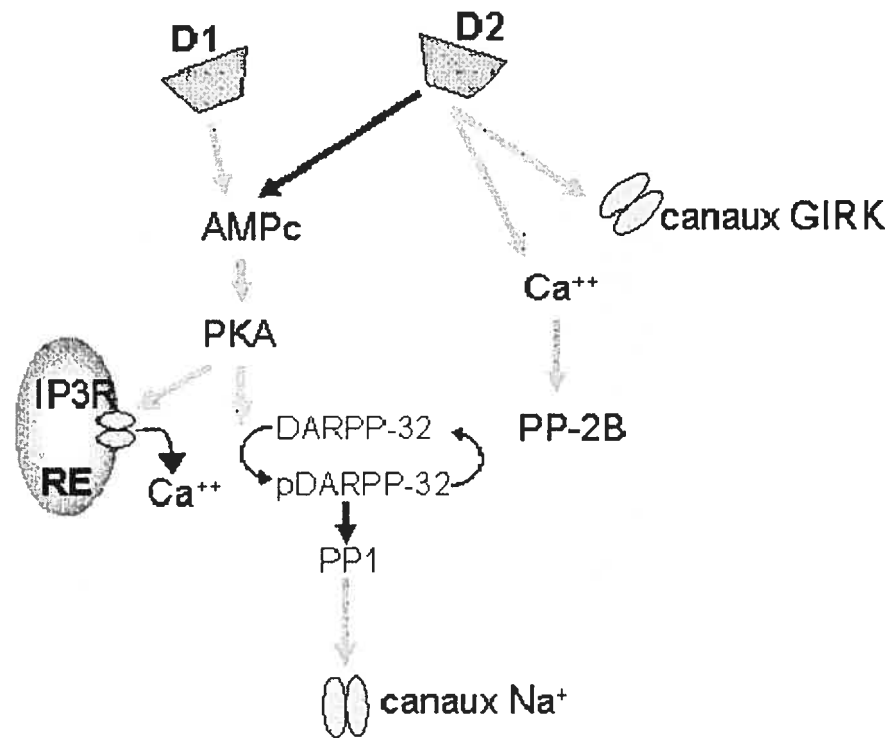


Figure 4. Schéma des voies de signalisation des récepteurs dopaminergiques D1 et D2. Abréviations : RE : réticulum endoplasmique; IP3R : récepteur de l'IP3, PP : protéine phosphatase.

Certains effecteurs de cette voie de signalisation ont été mis à jour. Entre autre, on sait que l'activation du récepteur D2 diminue l'état de phosphorylation de la

phosphoprotéine DARPP-32 via son effet inhibiteur sur l'AMPc et la PKA (Nishi et al., 1997; Lindskog et al., 1999).

L'effet de l'activation du récepteur D2 sur l'adénylate cyclase est donc induit par la sous-unité α de la protéine G, mais le complexe formé par les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G peut également affecter certaines cibles intracellulaires comme des MAP kinases, des réserves internes de calcium et des canaux ioniques comme les canaux GIRK (canaux potassiques à rectification entrante activés par une protéine G).

1.4.2. Conductances potassiques de type GIRK

Les canaux GIRK sont des protéines membranaires qui conduisent un courant potassique sortant au potentiel de repos de la membrane et jouent un rôle important dans le contrôle de l'excitabilité neuronale (Kubo et al., 1993; Jan and Jan, 1994; Wickman and Clapham, 1995). L'ouverture de ces canaux est régulée, entre autres, par des protéines de type G_i comme celles qui sont couplées au récepteur D2 de la dopamine.

La famille des canaux GIRK comprend 5 sous-types: GIRK1 à GIRK5, aussi désignés de façon classique Kir3.1 à Kir3.5. Ces canaux sont des tétramères (Yang et al., 1995) et peuvent donc exister sous forme d'homo et d'hétérodimères. Des expériences réalisées en immunohistochimie et en hybridation *in situ* montrent la distribution des différentes isoformes dans le cerveau (Liao et al., 1996). Dans certaines régions comme l'hippocampe, le cortex et le thalamus on retrouve plusieurs isoformes, les canaux GIRK1 à GIRK4 (Karschin et al., 1994; Kobayashi et al., 1995; Spauschus et al., 1996; Ponce et al., 1996; Karschin et al., 1996; Liao et al., 1996). Par contre, les neurones dopaminergiques de la substance noire et de l'ATV n'expriment que l'isoforme GIRK2. Les isoformes GIRK1 et GIRK4 sont absentes, alors qu'il n'y a pas actuellement de données suggérant la présence de GIRK3 dans ces structures (Murer et al., 1997; Liss et al., 1999; Inanobe et al., 1999; Davila et al., 2003).

L'activation du récepteur D2 par la dopamine ou un autre agoniste entraîne l'inhibition de l'excitabilité des neurones dopaminergiques. Cette diminution d'excitabilité résulte, du moins en partie, de l'ouverture de conductances potassiques à rectification entrante de type GIRK par une action directe des sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine Gi (Lacey et al., 1987; Kim et al., 1995; Cathala and Paupardin-Tritsch, 1997; Pillai et al., 1998; Kuzhikandathil et al., 1998). Ces effets peuvent être bloqués par des antagonistes des récepteurs D2 comme la clozapine, qui est utilisée en psychiatrie comme antipsychotique (Bowery et al., 1994).

1.4.3. Effet d'un agoniste du récepteur D2 sur l'activité du neurone dopaminergique

L'activation des conductances potassiques mentionnées précédemment entraînera un effet inhibiteur sur les neurones, une réponse qui peut-être mesurée en électrophysiologie. En effet, l'application d'un agoniste des récepteurs D2 entraîne une diminution de la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques, de même qu'une hyperpolarisation membranaire (Bunney et al., 1973; Lacey et al., 1987; Silva and Bunney, 1988; Rayport et al., 1992; Mercuri et al., 1997). En configuration voltage imposé, il est également possible de mesurer un courant potassique avec l'application d'un agoniste du récepteur D2, ce courant possédant des caractéristiques cinétiques semblables à celles des canaux GIRK (Uchida et al., 2000; Gregerson et al., 2001), bien qu'il n'ait pas encore été identifié comme tel à l'aide d'outils pharmacologiques, par exemple.

De plus, l'application d'agonistes du récepteur D2 entraîne une diminution de la relâche de dopamine au niveau terminal dans le striatum et le cortex (Seeman and Lee, 1975; Suaud-Chagny et al., 1991; Kennedy et al., 1992; Cragg and Greenfield, 1997), ainsi qu'au niveau somatodendritique (Cragg and Greenfield, 1997), ce qui est compatible avec une diminution de l'activité des neurones.

1.4.4. Voies de signalisation activées par le récepteur D2 en parallèle à la voie de l'adénylate cyclase

En plus d'induire l'inhibition de l'AMPC et d'avoir un effet direct sur des conductances potassiques GIRK, la liaison d'un agoniste aux récepteurs D2 active d'autres voies de signalisation et messagers intracellulaires : le calcium intracellulaire, l'acide arachidonique et la kinase sérine-thréonine Akt.

Certaines études démontrent que l'activation du récepteur D2 peut modifier les niveaux de calcium intracellulaire dans des cellules en lignées qui sur-expriment le récepteur D2. Par contre, des résultats controversés ont été obtenus tant au sujet du sens de cette modification que des voies de signalisation impliquées. Tout d'abord, l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire a été observée dans des systèmes de cellules transfectées et sur-exprimant le récepteur D2. Ces expériences suggèrent aussi l'implication de l'inositol trisphosphate dans l'augmentation des niveaux de calcium (Vallar et al., 1990; Tang et al., 1994). D'autres études menées dans des modèles de transfection ont montré que les récepteurs de type D2 peuvent causer une diminution des niveaux de calcium intracellulaires en inhibant les courants calciques entrant. Ce phénomène a été observé dans des cellules en lignées (Vallar et al., 1990; Seabrook et al., 1994; Seabrook et al., 1994), les cellules lactotrophes de la glande pituitaire (Lledo et al., 1992), les mélanotrophes (Williams et al., 1990) et dans des neurones dopaminergiques du mésencéphale en cultures (Jomphe et al., 2006). Les différences observées dans les résultats obtenus peuvent s'expliquer en partie par les différents modèles expérimentaux utilisés. Le changement de concentration du calcium intracellulaire peut modifier la physiologie du neurone en affectant la fonction de plusieurs effecteurs intracellulaires. Par exemple, il a été montré que l'augmentation de calcium secondaire à la stimulation du récepteur D2 dans des neurones du noyau accumbens fraîchement dissociés entraîne une augmentation des courants sodiques dépendants du voltage (Hu et al., 2005). Ainsi, une meilleure compréhension de l'impact de la stimulation du récepteur D2 sur les niveaux

intracellulaires de calcium est souhaitable, de même que l'utilisation de modèles expérimentaux se rapprochant davantage des neurones dopaminergiques *in vivo*.

Le récepteur D2 comme d'autres récepteurs se liant à une protéine Gi peut induire une augmentation de la production d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires via la cPLA2 (Vial and Piomelli, 1995; Nilsson et al., 1998; Hayakawa et al., 2001). Cette production d'acide arachidonique pourrait signifier que la dopamine est impliquée dans d'autres voies de signalisation que celle de l'AMPc. En effet, l'acide arachidonique est un acide gras libre qui peut interagir et affecter l'activité de plusieurs canaux ioniques et protéines kinases dans le neurone. Aussi l'acide arachidonique peut être métabolisé en eicosanoïdes, lesquelles peuvent affecter des cibles intracellulaires de même qu'extracellulaires étant donné leur liposolubilité.

Récemment, d'autres voies de signalisation activées par la stimulation du récepteur D2 et indépendantes de la voie de l'AMPc ont été mises à jour. Le récepteur D2 inhibe l'activité de la sérine-thréonine kinase Akt via un mécanisme dépendant de la β -arrestine 2 et de la phosphatase PP-2A (Beaulieu et al., 2004; Beaulieu et al., 2005). Un effecteur de l'Akt serait la kinase glycogène synthétase (GSK3 β). Il a été montré que, chez les patients schizophrènes, il y a une diminution du niveau d'expression de la protéine Akt1 et de la phosphorylation de GSK3 β . Cette enzyme pourrait donc être impliquée dans la schizophrénie (Emamian et al., 2004). L'ensemble des voies de signalisation décrites ci-haut témoigne de la complexité de la réponse cellulaire induite par la stimulation de l'autorécepteur D2.

1.4.5. Le récepteur D2 et la régulation de l'expression des gènes et des peptides

Il semble que l'activation du récepteur D2 puisse avoir des effets à long terme sur le neurone dopaminergique. En effet, le récepteur D2 peut activer la protéine kinase activée par un agent mitogène (MAPK) et la protéine liant l'élément de réponse de l'AMPc (CREB) dans les neurones. MAPK et CREB sont impliquées dans la régulation de

l'expression de gènes et dans d'autres effets à long terme de l'activation du récepteur D2 (Yan et al., 1999). L'activation des récepteurs dopaminergiques entraîne l'expression de certains peptides et de certains gènes à expression précoce. C-fos, qui est un gène précoce dont l'activation peut induire des modifications à long terme de l'expression d'autres gènes, est l'une des cibles finales de la cascade de signalisation des récepteurs dopaminergiques. À l'état basal, l'expression de c-fos dans le striatum est très basse. Par contre, des molécules antipsychotiques qui sont des antagonistes du récepteur D2 comme l'halopéridol (Robertson and Fibiger, 1992; Nguyen et al., 1992; Wirtshafter and Asin, 1995) et le raclopride (Deutch et al., 1995) stimulent l'expression de c-fos dans le noyau accumbens, l'amygdale, la partie dorsolatérale du striatum et la substance noire réticulée. Les mécanismes exacts induisant cette stimulation de l'expression de c-fos demeurent incompris.

1.5. Régulation de la fonction du récepteur D2

1.5.1. Phosphorylation et internalisation du récepteur D2

L'activité du récepteur D2 peut-être régulée par son activation par un agoniste, mais également par d'autres voies. En effet, la stimulation prolongée, de plusieurs dizaines de minutes, du récepteur D2 par son agoniste induit la phosphorylation du récepteur, ce qui entraîne son découplage de la protéine G. Cette phosphorylation du D2R se fait par la kinase du récepteur couplé à une protéine G (GRK2). Ensuite, il y a liaison de l'arrestine au récepteur et son internalisation (Gainetdinov et al., 2004; Beaulieu et al., 2005).

Le récepteur D2 peut être désensibilisé sans qu'il ne soit stimulé par un agoniste, mais via le concours d'une phosphorylation par des seconds messagers, comme la protéine kinase C (PKC). En effet, la PKC phosphoryle le récepteur D2 dans plusieurs domaines de la troisième boucle intracellulaire du récepteur (figure 5). Cette phosphorylation du

récepteur D2 par la PKC induit la désensibilisation et l'internalisation du récepteur via un mécanisme dépendant de l'arrestine et de la dynamine (Namkung and Sibley, 2004). Par contre, il faut mentionner que ces derniers résultats ont été obtenus dans un modèle de cellules en lignée et que leur pertinence physiologique reste à démontrer.

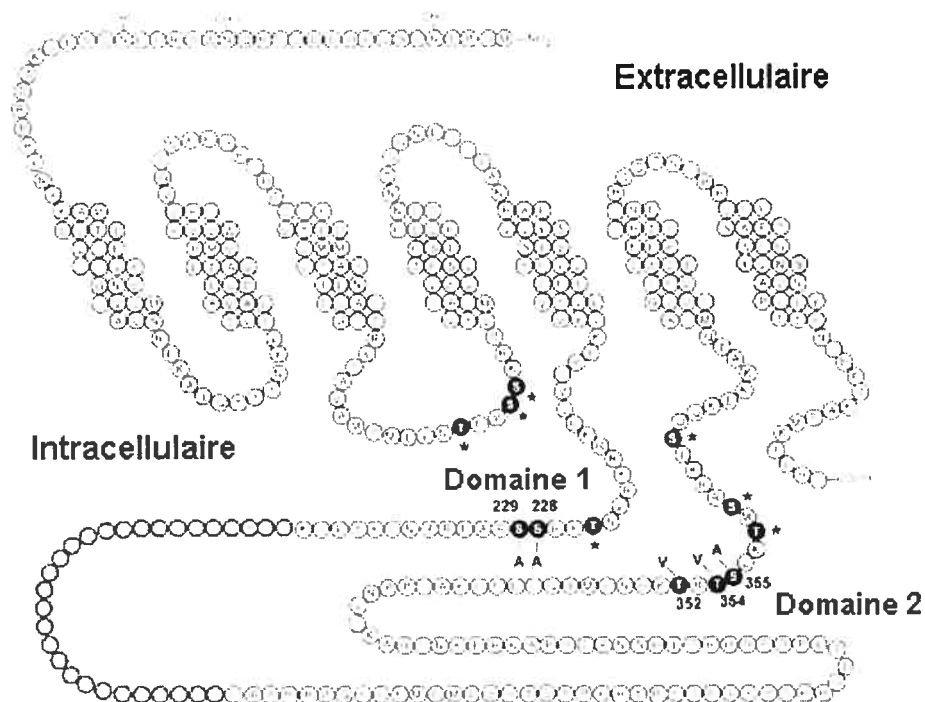


Figure 5. Schéma représentant la séquence d'acides aminés du récepteur D2L chez le rat. Les résidus en gris dans la troisième boucle intracellulaire représentent ceux qui sont absents dans l'isoforme D2S. Les résidus en noir et les astérisques représentent des sites potentiels de phosphorylation, les résidus en noirs numérotés correspondent aux sites de phosphorylation identifiés de façon fonctionnelle (modifié à partir de Namkung et Sibley, 2004).

1.5.2. Partenaires du récepteur D2 influençant son activité

Certaines molécules jouent le rôle de partenaire ou régulateur du récepteur D2. Parmi celles-ci on retrouve la Par-4 et NCS-1. Par-4 (prostate apoptosis response 4) est un partenaire se liant au récepteur D2 dont le rôle est inconnu. Par contre, à l'échelle cellulaire on lui connaît une fonction dans l'apoptose et la mort neuronale (Park et al., 2005). La calmoduline déplace Par-4 de sa liaison au récepteur D2 de façon dépendante du calcium. Ainsi, par suite d'un influx de calcium entraînant l'activation de la calmoduline, sa liaison au récepteur D2 est favorisée par rapport à la liaison de Par-4. La liaison de la calmoduline entraîne une inhibition de la fonction du récepteur D2 en bloquant la liaison de la protéine G (Bofill-Cardona et al., 2000) Le rôle de Par-4 pourrait donc être de faire compétition à cette inhibition de la fonction du récepteur D2 par la calmoduline. Pour sa part, le NCS-1 (neuronal calcium sensor-1) est une protéine qui a été co-immunoprécipitée avec le récepteur D2 et le GRK2 (G protein receptor kinase) à partir de membranes du striatum. De plus, l'utilisation de cellules en lignées transfectées avec le récepteur D2 a permis de montrer que NCS-1 est en mesure de réduire la phosphorylation et l'internalisation du récepteur, ce qui entraîne une facilitation de sa fonction et facilite l'inhibition de l'adénylate cyclase (Kabbani et al., 2002). Ces résultats montrent que la fonction du récepteur D2 peut être modifiée par certains de ses partenaires.

1.5.3. Oligomérisation du récepteur D2

En plus des voies de signalisation traditionnelles, il a été montré récemment que les récepteurs dopaminergiques, tout comme d'autres types de RCPG, peuvent s'associer et former des dimères ou des oligomères dans des lignées cellulaires ou des échantillons de cerveau. Le récepteur D2 exprimé en lignées cellulaires peut exister sous forme de dimères (Ng et al., 1994; Ng et al., 1995; Ng et al., 1997; George et al., 1998) et ce phénomène de dimérisation a été démontré pour le cerveau humain et le cerveau de rat (Zawarynski et al., 1998).

En plus de former des homodimères, le récepteur D2 peut s'associer à d'autres récepteurs, comme certains récepteurs de l'adénosine, de la somatostatine et du GABA, pour former des hétérodimères. Le récepteur D2 forme des hétérodimères avec les récepteurs de l'adénosine de type A1 et A2A (Fuxe et al., 1998; Salim et al., 2000). L'assemblage du récepteur D2 avec le récepteur sst5 de la somatostatine module la signalisation associée aux deux récepteurs. En effet, la formation de l'hétérodimère entraîne une augmentation de l'affinité pour la liaison de la dopamine et de la somatostatine et elle est associée à une augmentation du couplage aux protéines G et à leurs effecteurs (Rocheville et al., 2000). Les autres types de récepteurs dopaminergiques peuvent aussi former des dimères et des hétérodimères comme le récepteur de type D5 qui s'associe au récepteur GABA_A (Liu et al., 2000). Bien que la formation de ces complexes réceptoriels commence à être mise à jour, l'impact fonctionnel de ce type de dimérisation reste peu connu.

1.6. Pathologies associées au système dopaminergique

Un dérèglement du système dopaminergique est associé à plusieurs états pathologiques dont la maladie de Parkinson, la schizophrénie, la dépendance aux drogues d'abus et la dépression.

1.6.1. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une pathologie neurodégénérative progressive caractérisée par une diminution du nombre de neurones dopaminergiques dans la voie nigrostriée. La perte de neurones dopaminergiques est associée à la présence, dans la substance noire compacte, d'inclusions composées de neurofilaments, d'ubiquitine et d'alpha-synucléine appelées corps de Lewy (Goldman et al., 1983). Cette mort neuronale entraîne une diminution de la relâche de dopamine dans le striatum, qui est une structure

impliquée dans le contrôle de la motricité. Ainsi, les patients parkinsonniens présentent plusieurs difficultés motrices comme la bradykinésie et la rigidité des membres. Ils souffrent aussi de tremblements et de problèmes de posture (Gelb et al., 1999). En plus, de la neurodégénérescence de la voie nigrostriée, d'autres pertes neuronales affectent les neurones dopaminergiques de l'ATV, les neurones noradrénergiques du locus coeruleus et les neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert, ce qui se traduit par des troubles cognitifs et psychologiques (Candy et al., 1983; Aarsland et al., 1996). Bien que les dysfonctions motrices et les changements anatomiques soient très bien documentés, les causes de l'apparition de la maladie et de la mort neuronale restent à établir. En plus de causes environnementales, comme le fait d'entrer en contact avec certaines toxines, des anomalies génétiques pourraient aussi expliquer l'apparition de la maladie de Parkinson. Effectivement, plusieurs gènes comme celui de l'alpha-synucléine ont été identifiés comme étant des acteurs possibles dans l'induction de la maladie (Dawson and Dawson, 2003). Les traitements actuellement utilisés pour soulager les patients parkinsonniens s'attaquent exclusivement aux symptômes de la maladie et ne préviennent en rien la progression de la mort neuronale. On compense pharmacologiquement la diminution de la relâche de dopamine dans le striatum, le plus souvent par administration de L-DOPA, un précurseur de la dopamine qui possède la propriété de traverser la barrière hémato-encéphalique.

1.6.2. Schizophrénie

La schizophrénie est une psychose délirante chronique caractérisée par une rupture de contact avec la réalité qui affecte environ 1% de la population, ses symptômes sont classés en deux catégories : positifs et négatifs. Les symptômes apparaissent chez le jeune adulte et persistent pour le reste de sa vie. Les symptômes positifs correspondent à des hallucinations, des délires, des troubles de la pensée et du comportement. Les symptômes négatifs, correspondent à des problèmes affectifs; les patients font preuve de retrait social, d'apathie et d'un manque de motivation. Les causes du déclenchement de la maladie ne sont que partiellement connues. Des facteurs psychologiques, environnementaux et

développementaux pourraient être impliqués. Plus spécifiquement, on sait que des complications lors de la grossesse (diabète de grossesse, naissance prématurée, asphyxie lors de l'accouchement, infections de la mère lors de la gestation), la consommation importante de cannabis, une situation stressante peuvent augmenter les risque d'apparition de la maladie. Aussi, les résultats d'études épidémiologiques montrent que, dans une certaine proportion, une prédisposition génétique pourrait favoriser l'apparition de la maladie (Mueser and McGurk, 2004; Broome et al., 2005). Des gènes ont même été identifiés comme étant des facteurs de risque de la schizophrénie. Ainsi, des polymorphismes dans les gènes encodant la dysbindine, la neuréguline1, ainsi que DISC1 et DISC2, ont été identifiés chez certaines cohortes de patients schizophrènes (Millar et al., 2000; Ekelund et al., 2001; Stefansson et al., 2002; Schwab et al., 2003; van den Oord et al., 2003). Les gène encodant l'enzyme catéchol-O-méthyltransférase (COMT) impliquée dans la dégradation de la dopamine sont également des candidats importants pour la pathogénèse de la schizophrénie (Gogos et al., 1998).

Du point de vue cellulaire, l'étiologie de la schizophrénie pourrait s'expliquer par certaines modifications des systèmes dopaminergiques, sérotoninergiques et glutamatergiques (tableau 1). En effet, des observations ont permis de répertorier un certain nombre d'anomalies dans ces systèmes chez les patients schizophrènes. Par contre, il faut noter qu'il n'est pas certains que ces anomalies des systèmes de transmetteurs entraînent l'apparition de symptômes de la schizophrénie et ne sont pas plutôt des mécanismes de compensation.

Cependant, une hyperactivité du système dopaminergique mésolimbique semble jouer un rôle important dans la pathologie (Carlsson, 1988). Des données pharmacologiques appuient fortement cette thèse. En effet, les antipsychotiques, qui agissent en bloquant la fonction du récepteur dopaminergique D2, sont très efficaces dans le traitement des symptômes de la schizophrénie (Seeman, 1987). Au contraire, des molécules agonistes des récepteurs D2 peuvent induire des symptômes de type

psychotiques chez des sujets sains et précipiter des symptômes psychotiques chez les schizophrènes. Des études effectuées en imagerie cérébrale chez l'humain suggèrent aussi que la schizophrénie soit associée à une modification des niveaux de dopamine dans le striatum (Abi-Dargham and Laruelle, 2005; Laruelle et al., 1999). L'utilisation de techniques d'imagerie a aussi permis de montrer une augmentation du nombre de récepteurs D2 chez certains patients schizophrènes (Wong et al., 1986). Par contre, il faut mentionner que, plus récemment, une telle augmentation de la densité des récepteurs D2 n'a pas été confirmée chez des schizophrènes n'ayant pas été traités aux neuroleptiques, ce qui suggère que la pharmacothérapie pourrait avoir été responsable de la modification observée précédemment (Nordstrom et al., 1995). L'imagerie par tomographie d'émission de photon chez l'humain a toutefois permis de montrer plus spécifiquement qu'il y a une stimulation accrue du récepteur D2 par la dopamine chez les patients schizophrènes (Abi-Dargham et al., 2000).

L'hypothèse d'une implication possible de la sérotonine dans le développement de la schizophrénie est corroborée par des travaux portant sur des substances hallucinogènes tel que le LSD (diéthyl-lysergamide). Une partie des effets de cet hallucinogène serait médiée par des récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT₂, ce qui suggère que ce type de récepteurs pourrait être responsable de tels effets chez les schizophrènes. De plus, d'autres études montrent que le nombre de récepteurs sérotoninergiques de types 5-HT_{2A} est modifié dans le cerveau des schizophrènes, même si ces résultats restent actuellement controversés (Lieberman et al., 1998). Le système glutamatergique pourrait aussi être impliqué dans la schizophrénie, puisque des antagonistes des récepteurs NMDA, comme le phencyclidine (PCP), induisent chez des sujets sains des symptômes analogues à certains symptômes positifs de la schizophrénie et qu'ils augmentent l'intensité de ceux des patients schizophrènes (Hazlett et al., 1999; Hirayasu et al., 2001; Morris et al., 2005).

| Neuro-transmetteur | Modifications observées dans la schizophrénie | Médicaments | Mode d'action des médicaments |
|--------------------|--|--|-------------------------------|
| Dopamine | - ↑ expression récepteurs D2 dans le striatum - ↑ Concentration dopamine - ↑ accrue de la relâche de dopamine par amphétamines | Antipsychotiques (ex. haloperidol) | Antagoniste récepteur D2 |
| Sérotonine | ↓ récepteur 5-HT2 ↑ récepteur 5-HT1 | Antipsychotiques atypiques (ex. clozapine) | Liaison au récepteur 5-HT2 |
| Glutamate | - ↓ expression récepteur non-NMDA dans le cortex temporal et l'hippocampe - ↓ relâche de glutamate dans le cortex | Aucun | |

Tableau 1. Résumé des modifications des systèmes de neurotransmetteurs observées chez le schizophrène et des médicaments utilisés pour agir sur ces systèmes.

D'autres systèmes de neurotransmetteurs, comme les systèmes GABAergiques, cholinergiques et neurotensinergiques, sont des candidats qui pourraient également être impliqués dans le développement de la pathologie (Miyamoto et al., 2003).

1.6.3. Consommation de drogue d'abus

La dopamine et les neurones dopaminergiques font partie du circuit neuronal de récompense et de renforcement. Ce réseau est responsable du sentiment de plaisir (action

hédonique) ressenti lors de comportements essentiels à la survie de l'individu, comme la prise de nourriture et le comportement sexuel, et dans des comportements pathologiques reliés à la recherche de plaisir, comme la prise de drogue d'abus. Le stimulus hédonique est traité par le cortex sensoriel qui se projette à l'ATV. Une fois que l'ATV est stimulée, il y a libération de dopamine dans le noyau accumbens, mais aussi dans le septum, l'amygdale et le cortex préfrontal, via le faisceau médian télencéphalique.

Les stupéfiants utilisent ce circuit dopaminergique de récompense et de renforcement et de ce fait, produisent du plaisir et motivent l'individu vers un comportement compulsif de prise de drogue. En effet, les molécules consommées comme drogue d'abus, telles que la cocaïne, l'amphétamine, les opiacés, de même que la nicotine et l'alcool, accomplissent certaines de leurs actions en modifiant la transmission dopaminergique à la terminaison axonale. Par exemple, la cocaïne bloque les transporteurs de la dopamine responsables de la recapture de la dopamine, prolongeant et intensifiant ainsi son action. La nicotine, quant à elle, provoque une augmentation de la concentration extracellulaire de dopamine en inhibant la monoamine oxydase, alors que l'amphétamine utilise le transport inverse et empêche la recapture de la dopamine en empêchant les vésicules d'emmagasiner la dopamine pour en augmenter la concentration dans la fente synaptique (Schmitz et al., 2001). Malgré leur mode d'action différent, les psychostimulants entraînent tous une augmentation de la relâche de dopamine dans le complexe striatal (Kuczenski et al., 1991).

Il est évident qu'un comportement aussi complexe que le développement d'une dépendance à une drogue d'abus ne peut s'expliquer entièrement par son action sur les niveaux centraux de dopamine, mais l'implication de cette molécule dans la mise en place et la persistance de ce comportement est très probable.

1.6.4. Dépression

La dépression est une pathologie généralement associée à un déficit en sérotonine et en noradrénaline. Par contre, certaines modifications du système dopaminergique pourraient aussi être mis en cause. Le rôle possible de la dopamine dans la dépression est corroboré par le fait que des épisodes dépressifs soient associés à la fois à la schizophrénie et à la maladie de Parkinson (Kulhara and Avasthi, 2003; Merschdorf et al., 2003). La dopamine pourrait donc être responsable de certains symptômes observés chez les patients dépressifs comme l'anhédonie (incapacité à ressentir les sensations de plaisir) et la diminution de la motivation (pour revue, voir Dailly et al., 2004). Des données pharmacologiques appuient aussi l'hypothèse d'une implication du système dopaminergique dans la dépression. Des agonistes du récepteur dopaminergique D2, comme le pramipexole, ont des effets de type antidépresseur dans des modèles animaux et chez des patients (Willner et al., 1994; Gao and Calabrese, 2005). En plus de ces effets directs sur certains symptômes de la dépression, des agonistes du récepteur D2 agissent de façon synergique ou coopérative avec les antidépresseurs traditionnels qui font partie de la famille des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (Takahashi et al., 2003). En plus des études effectuées chez les animaux, des données cliniques supportent aussi un rôle de la dopamine dans la dépression, car certains types d'antidépresseurs comme les inhibiteurs de la monoamine oxydase (MAOI) ont pour principal effet d'inhiber le catabolisme de la dopamine (Levant and Bancroft, 1998; Baker and Prior, 2002). Il faut aussi indiquer que les inhibiteurs de la monoamine oxydase, en plus d'agir sur le système dopaminergique, agissent sur les systèmes noradrénergique et sérotoninergique. D'autres antidépresseurs ont un mode d'action qui cible principalement le système dopaminergique en bloquant la recapture de la dopamine (Ascher et al., 1995). Des études cliniques leur attribuent une efficacité comparable aux antidépresseurs de type inhibiteur sélectifs de la recapture de la sérotonine (Trivedi et al., 2001).

PARTIE II : LA NEUROTENSINE

La neurotensine fut découverte en 1973 par Carraway et Leeman, qui l'ont purifiée à partir d'hypothalamus de bovins. Ce peptide a été nommé ainsi à cause de sa localisation neuronale et de son effet hypotenseur (Carraway and Leeman, 1973). Il faut ensuite attendre 1988 pour que le gène de la neurotensine soit isolé chez le rat, puis séquencé (Kislauskis et al., 1988), et ce n'est que récemment que trois types de récepteurs neurotensinergiques ont été clonés (NTS1, NTS2 et NTS3). Très tôt, l'interaction entre la neurotensine et les neurones dopaminergiques a été montrée par le fait qu'une application de neurotensine au niveau du mésencéphale induit une augmentation de la relâche de dopamine dans le striatum, le noyau accumbens et le cortex (Kalivas et al., 1983; Cador et al., 1989; Stowe and Nemeroff, 1991). En plus de moduler la transmission dopaminergique, la neurotensine joue un rôle dans certains processus physiologiques comme la thermorégulation, la perception de la douleur, la prise de nourriture et la sécrétion de certaines hormones. Aussi, des arguments concordants suggèrent que ce peptide pourrait être impliqué dans certaines pathologies comme la schizophrénie et la maladie de Parkinson. Une revue exhaustive des implications physiologiques et pathologiques de la neurotensine au niveau central est présentée dans la section discussion de cette thèse.

2.1. La neurotensine

2.1.1. Structure de la neurotensine

La neurotensine est un peptide de 13 acides aminés, dont la masse moléculaire est de 1674 Da (Carraway and Leeman, 1973). Ce sont les acides aminés 8 à 13 (NT8-13).

situés dans la partie carboxy-terminale du peptide, qui sont responsables de son activité biologique (Kitabgi et al., 1985).

pGlu-Leu-tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH

Figure 6. Séquence des acides aminés composant la neurotensine. La partie terminale, en rouge, comprend les acides aminés responsables de l'activité du peptide.

2.1.2. Synthèse et dégradation de la neurotensine

Dans le cerveau, la neurotensine est synthétisée par certains neurones à partir d'un précurseur peptidique : la pro-neurotensine, qui est également responsable de la synthèse de la neuromédine N (NN) (Dobner et al., 1987; Kislauskis et al., 1988). Le gène de la pro-neurotensine NT/NN est très conservé à travers les espèces (Dobner et al., 1987; Bean et al., 1992). La maturation de ce précurseur par des pro-hormones convertases permet la synthèse des peptides neurotensine et neuromédine (Rovere et al., 1996; Barbero et al., 1998). Après sa synthèse, la neurotensine est emmagasinée dans des granules denses de sécrétion. Par suite de sa libération dans le milieu extracellulaire, la neurotensine est dégradée par différentes peptidases (Almenoff et al., 1981; Orłowski et al., 1983; Skidgel et al., 1984; Checler et al., 1986).

La neurotensine apparaît tôt au cours du développement du système nerveux du rat. En effet, le peptide est présent dans le bulbe olfactif, le cortex piriforme et l'amygdale à partir du 16^e jour embryonnaire (Hara et al., 1982). Les concentrations de neurotensine et de son ARNm, ainsi que le niveau d'expression des récepteurs neurotensinergiques, varient

en fonction du développement et de la localisation de ces derniers dans le cerveau (Sato et al., 1990; Sato et al., 1992). Bien que le rôle précis de la neurotensine dans l'ontogénie reste à définir, il est possible qu'elle joue un rôle dans le développement de réseaux neuronaux étant donné son apparition avant que les connexions synaptiques ne s'établissent.

2.1.3. Localisation de la neurotensine dans le SNC et le SNP

Des techniques de radio-immunologie ont permis de cartographier la présence de neurotensine dans le système nerveux central. Dans le mésencéphale, l'ATV et la substance noire, ces noyaux où l'on retrouve une grande proportion de neurones dopaminergiques (voir chapitre précédent) contiennent de la neurotensine. Aussi, on retrouve la neurotensine dans certaines régions impliquées dans le contrôle de la douleur; comme le noyau raphé magnus, la substance grise périaqueducale, l'aire préoptique de l'hypothalamus et la substance gélatineuse de la moelle épinière (Uhl et al., 1977; Uhl et al., 1979; Reinecke et al., 1983; Jakeman et al., 1989). La neurotensine est aussi présente dans certains noyaux du thalamus, le noyau parabrachial, le noyau du faisceau solitaire et la formation réticulée bulbaire (Loewy and McKellar, 1980; Ciriello et al., 1988). Ces dernières régions sont impliquées dans le contrôle du système cardiovasculaire. L'effet de la neurotensine sur la thermorégulation et sur les systèmes endocriniens s'explique par la présence du peptide dans l'aire préoptique, le noyau ventromédian et le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus et le noyau dorsomédian du thalamus.

Les neurones qui nous intéressent davantage sont ceux du mésencéphale et plus précisément ceux de l'ATV. Ces neurones, en plus de produire eux-mêmes la neurotensine, reçoivent des projections neurotensinergiques en provenance de plusieurs régions (figure 7). Une étude effectuée conjointement à l'aide d'un marquage axonal rétrograde à partir de l'ATV et d'une hybridation *in situ* dirigée contre l'ARNm de la neurotensine, a permis de mettre en évidence les projections neurotensinergiques innervant ce noyau.

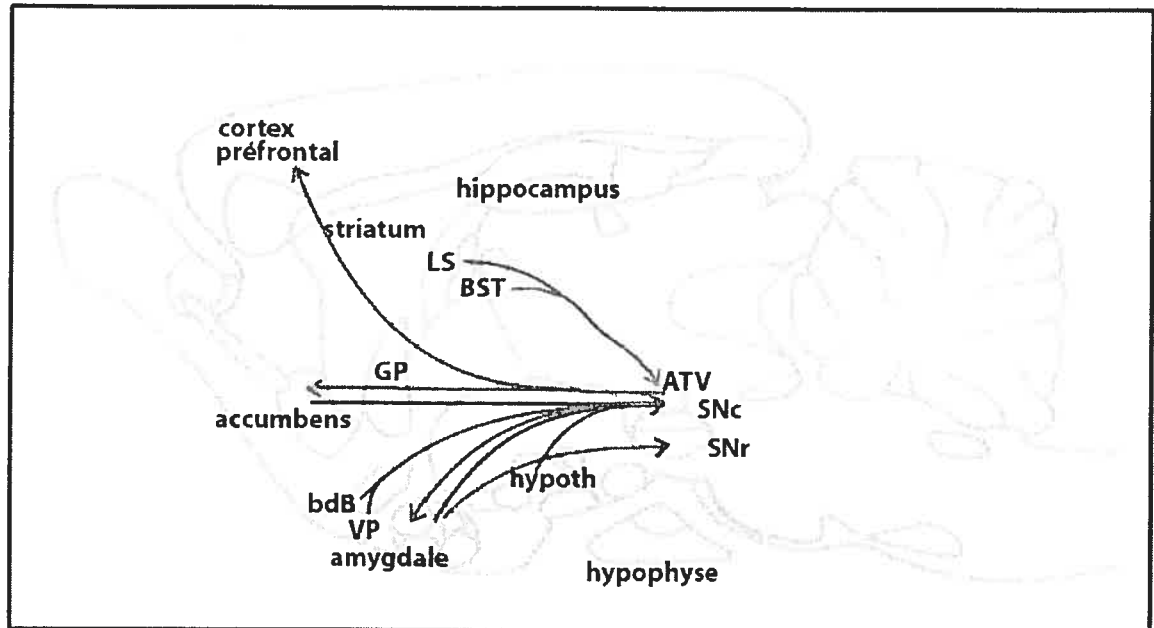


Figure 7. Représentation schématique des voies neurotensinergiques impliquant les neurones dopaminergiques du mésencéphale. Afférences en rouge et efférences en bleu. Abréviations : LS, septum latéral; BST, noyau du lit de la strie terminale; VP, pallidum ventral; bdB, bandelette diagonale de Broca; GP, globus pallidus; hypoth, hypothalamus; ATV, aire tegmentaire ventrale; SNc, substance noire compacte; SNr, substance noire réticulée (modifié à partir de St-Gelais et al., 2006).

Ainsi, il a été possible de déterminer que les projections neurotensinergiques à l'ATV proviennent de plusieurs régions : la partie rostrale du septum latéral, le noyau du lit de la strie terminale, le pallidum ventral, la bandelette diagonale de Broca, l'aire préoptique latérale et la partie rostro-latérale de l'hypothalamus. Aussi, quelques fibres neurotensinergiques arrivant à l'ATV tirent leur origine du noyau raphé dorsal et de la substance grise périaqueducule (Zahm et al., 2001). Une étude a aussi permis de montrer que la lésion mécanique ou chimique du striatum entraîne une diminution du marquage immunohistochimique de la neurotensine dans la substance noire réticulée ce qui suggère

une voie neurotensinergique striatonigrée (Castel et al., 1993). D'autres afférences du même type provenant de l'amygdale innervent la substance noire compacte et la substance noire réticulée (Gonzales and Chesselet, 1990; Vankova et al., 1992). Les neurones dopaminergiques situés dans le champs rétrosubstantiel reçoivent des afférences neurotensinergiques provenant du noyau central de l'amygdale et du noyau du lit de la strie terminale (Zahm et al., 2005).

D'autres projections qui n'ont pas encore été mises à jour font probablement partie du réseau neurotensinergique impliquant le mésencéphale. On retrouve, par exemple, une concentration importante de corps cellulaires exprimant la neurotensine dans le striatum et dans le globus pallidus et l'on sait que plusieurs neurones de cette région reçoivent des projections dopaminergiques en provenance du mésencéphale (Uhl et al., 1977; Jennes et al., 1982; Zahm et al., 2001).

Même si la neurotensine nous intéresse surtout dans le contexte de son action sur les neurones dopaminergiques, il faut mentionner sa présence, de façon importante en périphérie. Environ 90% de la neurotensine présente dans l'organisme se situe en périphérie. La neurotensine exerce une action paracrine et endocrine sur les systèmes digestifs et cardiovasculaires. Un certain nombre de données suggèrent aussi que la neurotensine joue un rôle dans la croissance cellulaire et la prolifération des cellules cancéreuses (Rostene and Alexander, 1997; Dal-Farra et al., 2001; Kitabgi 2002).

2.2. Les récepteurs de la neurotensine

2.2.1. Historique de la découverte des récepteurs de la neurotensine

L'étude des sites de liaison de la neurotensine a commencé par des expériences de liaison à l'aide d'un analogue tritié de la neurotensine, la [³H]NT. Ces expériences ont permis d'identifier un premier site de liaison pour la neurotensine, le récepteur de la

neurotensine de type 1 (NTS1) (Kitabgi et al., 1977; Uhl et al., 1977). Ensuite, la mise au point de marqueurs radioactifs plus spécifiques, comme [¹²⁵I]Trp11-NT (Mazella et al., 1983) et la [¹²⁵I]Tyr11-NT (Sadoul et al., 1984a; Sadoul et al., 1984b), a permis d'identifier un second type de sites de liaison ayant une moindre affinité pour la neurotensine, soit le récepteur de la neurotensine de type 2 (NTS2) (Kitabgi et al., 1984; Ahmad et al., 1987). En plus de sa différence d'affinité, le récepteur NTS2 se distingue du NTS1 par le fait qu'il est sensible à la lévocabastine, un agoniste histaminergique. Ces récepteurs, d'abord identifiés sur la base de leurs propriétés pharmacologiques, ont ensuite été clonés; NTS1 à partir d'une banque d'ADNc de cerveau de rat (Tanaka et al., 1990), puis NTS2 par homologie avec la séquence du NTS1 (Chalon et al., 1996). Depuis ce premier séquençage, ces 2 récepteurs ont également été clonés chez la souris et l'humain (Watson et al., 1993; Vita et al., 1993; Mazella et al., 1996; Vita et al., 1998). Les deux récepteurs de la neurotensine possèdent 7 domaines transmembranaires et font partie de la famille des récepteurs couplés à une protéine G.

La preuve de l'existence d'un troisième sous-type de récepteur (NTS3) est apparue au cours d'expériences de chromatographie d'affinité (Zsurger et al., 1994). Ce troisième récepteur, contrairement aux 2 premiers sous-types, n'est pas un récepteur couplé à une protéine G mais plutôt un récepteur à un seul passage transmembranaire (Mazella et al., 1998). Un quatrième récepteur de la neurotensine a récemment été identifié, NTS4/SorLA, qui est aussi un récepteur ayant un seul passage transmembranaire et qui avait été préalablement identifié comme étant le récepteur SorLA/LR11 (Jacobsen et al., 2001). On connaît peu de choses sur ce récepteur et sur ces fonctions, mais il a été montré qu'il est exprimé par les neurones de l'hippocampe et de certains noyaux du mésencéphale, ainsi que les cellules de Purkinje du cervelet et faiblement par des neurones du thalamus et de l'hypothalamus (Motoi et al., 1999).

2.2.2. Structure et fonction des sous-types de récepteurs de la neurotensine

2.2.2.1. Récepteur de la neurotensine de type 1 (NTS1)

NTS1 est le récepteur de la neurotensine dit de haute affinité. Chez le rat, NTS1 est une protéine composée de 424 acides aminés qui forment sept segments transmembranaires caractéristiques des récepteurs couplés à une protéine G (RCPG) (figure 8). Les récepteurs NTS1 humains partagent 84% d'homologie avec le récepteur NTS1 du rat (Watson et al., 1993; Vita et al., 1993).

La majorité des actions connues de la neurotensine sont le résultat de son effet sur le NTS1; il s'agit du moins du récepteur neurotensinergique ayant fait l'objet du plus grand nombre d'études. L'injection unilatérale de neurotensine dans le striatum induit un mouvement de rotation chez l'animal et la pré-application de SR48692, un antagoniste spécifique de NTS1, bloque cet effet moteur de la neurotensine (Gully et al., 1993). La production de souris dont le gène codant pour NTS1 a été invalidé (Remaury et al., 2002; Leonetti et al., 2004) a mis à jour un certain nombre de fonctions propres à NTS1. Ces souris transgéniques ont permis de vérifier l'implication de NTS1 dans l'induction d'un mouvement de rotation en montrant l'absence de cet effet de la neurotensine chez ces souris (Pettibone et al., 2002). De plus, l'injection intracérébroventriculaire de neurotensine, qui induit normalement une réponse hypothermique chez les animaux sauvages, n'a aucun effet chez les souris dont le gène pour NTS1 a été invalidé. Certaines données obtenues à l'aide de ces souris suggèrent aussi un rôle pour NTS1 dans l'analgésie (Shi and Bunney, 1991a; Jolas and Aghajanian, 1996), mais ces conclusions demeurent controversées (Araque et al., 2002).

2.2.2.2. Récepteur de la neurotensine de type 2 (NTS2)

NTS2 est le récepteur de basse affinité de la neurotensine. La séquence d'acides aminés du récepteur NTS2 possède 64% d'homologie avec celle de NTS1. NTS2 possède

une troisième boucle intracellulaire plus longue que NTS1 et une partie extracellulaire N-terminale plus courte (Vincent et al., 1999). Malgré le fait que l'on reconnaît que NTS2 fait partie de la famille des RCPG, on ne sait pas à quel type de protéine G il se lie et quelles voies de signalisation sont recrutées lors de son activation.

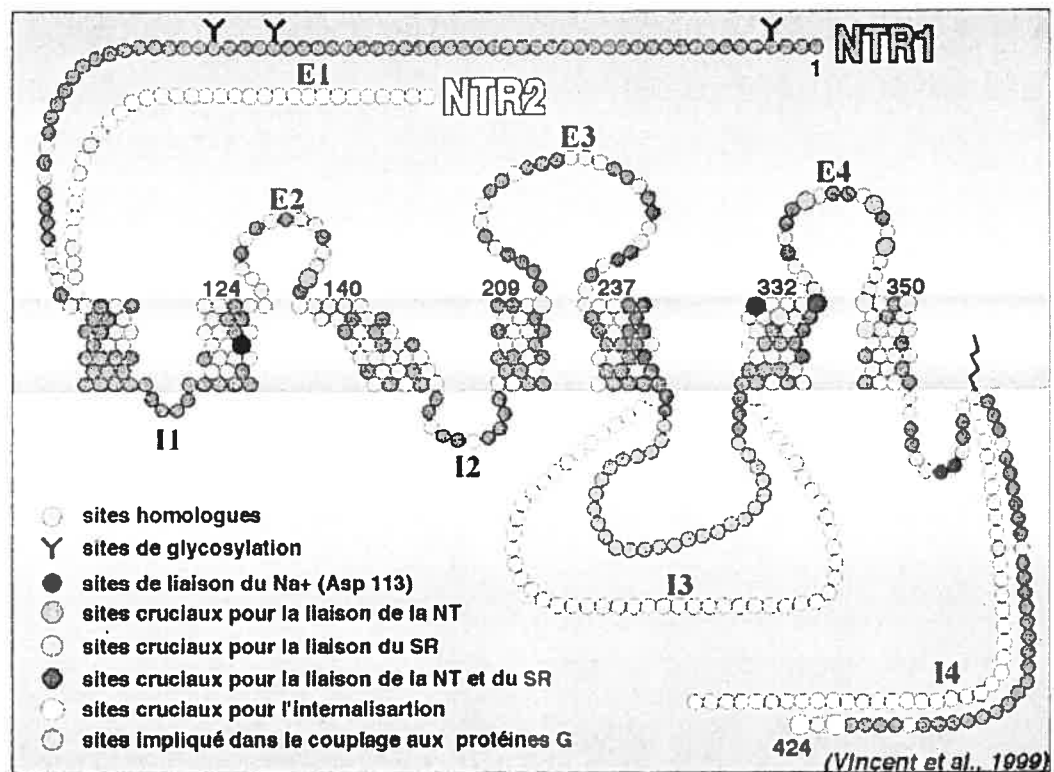


Figure 8. Représentation schématique des récepteurs rNTS1 et mNTS2 (Vincent et al., 1999).

Le rôle physiologique du récepteur NTS2 n'est pas complètement connu mais on lui attribue une certaine fonction analgésique. A l'aide d'oligonucléotides antisens spécifiques de NTS2, il a été possible de montrer qu'une diminution de la quantité d'ARNm de ce

récepteur produit une diminution de l'analgésie induite par la neurotensine (Dubuc et al., 1999). Cette spécificité pourrait éventuellement permettre le ciblage de ce récepteur dans le traitement de la douleur.

2.2.2.3. Récepteur de la neurotensine de type 3 (NTS3)

NTS3 est un récepteur de 100kDa possédant un seul passage transmembranaire, une courte extrémité cytoplasmique et une longue portion extracellulaire (Mazella et al., 1998) (figure 9). Ce récepteur est exprimé par les cellules gliales, les neurones et les adipocytes (Chabry et al., 1993; Morris et al., 1998). La purification et le séquençage de l'extrémité amino-terminale de ce récepteur chez l'homme (Zsurger et al, 1994) a permis de révéler qu'il partageait 100% d'homologie avec la gp95/sortiline qui avait été préalablement clonée (Mazella et al., 1998).

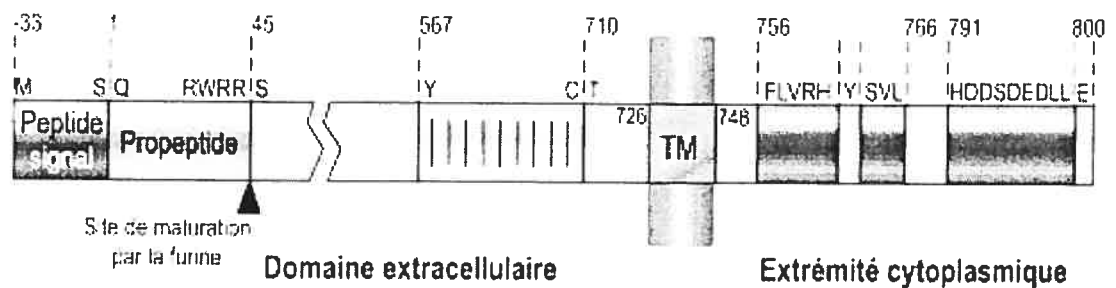


Figure 9. Représentation schématique du récepteur neurotensinergique de type 3 (hNTS3). En jaune, domaine riche en cystéine, homologue à la protéine de levure Vsp10p; en rouge, domaine homologue du récepteur du mannose-6 phosphate. TM : domaine transmembranaire (d'après Vincent et al., 1999).

Le rôle physiologique de NTS3 est jusqu'à maintenant peu connu. Le récepteur NTS3 serait impliqué dans le tri des protéines luminales du trans-golgi aux endosomes tardifs (Petersen et al., 1997), de même que dans la modulation de l'arrêt du signal neurotensinergique via la médiation de la recapture de la neurotensine et de sa dégradation (Mazella et al., 1998; Navarro et al., 2001; Mazella, 2001). En lignées cellulaires, il a été montré que NTS3 peut induire une certaine forme de migration de cellules gliales (Martin et al., 2003).

2.2.3. Localisation des récepteurs neurotensinergiques dans le cerveau

Les premières tentatives de localisation des récepteurs neurotensinergiques effectuées il y a environ 25 ans ne permettaient pas de différencier les récepteurs NTS1 des NTS2. À cette époque, la présence des sites de liaisons de la neurotensine a été montrée dans le bulbe olfactif, les cortex préfrontal, cingulaire et entorhinal, le septum latéral, le tubercule olfactif, la bandelette diagonale de Broca et le noyau du lit de la strie terminale, le striatum, l'habenula médiane, les corps mammillaires, la substance noire compacte et l'ATV, le pons, le plancher du IV^e ventricule, le noyau raphé magnus, le noyau du tractus solitaire et la substance gélatineuse de la moelle épinière (Young and Kuhar, 1981; Quirion et al., 1982).

Des études subséquentes effectuées à l'aide de la lévocabastine, une molécule qui reconnaît spécifiquement les récepteurs NTS2, a permis de préciser la localisation spécifique de NTS2. Son marquage à l'aide de la [³H]lévocabastine est retrouvé dans plusieurs régions : le cortex, l'hippocampe, le thalamus, l'amygdale, le septum, les corps mamillaires, le collicule supérieur, le tubercule olfactif et la substance grise périaqueducale. Un marquage un peu moins fort se retrouve aussi dans l'ATV et la substance noire (Kitabgi et al., 1987; Asselin et al., 2001).

Les récepteurs NTS1 ont été localisés par immunohistochimie chez le rat grâce à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la 3^e boucle intracellulaire du récepteur (Boudin et al., 1996). La localisation des récepteurs détectés à l'aide d'un anticorps est semblable à ce qui avait préalablement été décrit dans les expériences de liaison ligand-récepteur, en particulier dans la bandelette de Broca, la substance noire, l'ATV, le subiculum ou le pons. En revanche, certaines aires riches en sites de liaison ne sont pas immunoréactives, en particulier le noyau de l'amygdale, la substance grise périaqueducale, la couche externe des tubercules quadrijumeaux antérieurs et le noyau dorsal du tegmentum (Nicot et al., 1994; Fassio et al., 2000).

Par hybridation *in situ*, l'ARNm de NTS1 est retrouvé dans le cerveau de rat au niveau de la bandelette diagonale de Broca, du septum médian, des noyaux supra-chiasmatique et supra-mamillaire, de la substance noire compacte et de l'ATV, de l'hypothalamus, du thalamus ventral et de la formation réticulaire (Leeman and Carraway, 1982; Elde et al., 1990; Nicot et al., 1994). La colocalisation des sites de liaison de NTS1 et de son ARNm n'est pas parfaite. Ces différences peuvent s'expliquer par un transport des récepteurs vers les territoires de projection axonale. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'une lésion de la substance noire induit une perte de 30% des récepteurs neurotensinergiques dans le striatum, de même qu'une lésion du cortex préfrontal induit une perte de 20 % des récepteurs de la neurotensine dans le striatum (Goedert et al., 1984b).

Le niveau d'expression du récepteur NTS1 varie au cours du développement et selon les régions du cerveau. Chez le rat, l'expression de NTS1 dans le mésencéphale débute au cours du développement embryonnaire (18^e jour) et augmente par la suite pour atteindre une valeur maximale 15 jours après la naissance, laquelle sera maintenue tout au long de la vie adulte (Kiyama et al., 1987; Palacios et al., 1988).

2.2.4. Localisation cellulaire des récepteurs de la neurotensine

À l'échelon cellulaire, le NTS1 est localisé sur les neurones et certaines données suggèrent qu'il soit aussi exprimé par les astrocytes. Une étude de liaison avec le [¹²⁵I]Tyr3NT sur coupe de cerveau de rat, suivie d'examen en microscopie électronique du noyau magnocellulaire basal, a permis de montrer que les sites de liaisons de haute affinité sont situés essentiellement dans les corps cellulaires neuronaux (80 à 89 %). Les récepteurs situés sur la membrane étaient répartis de façon diffuse, et aucunement concentrés dans les zones de jonction synaptique avec des axones, ce qui confirme le mode de transmission paracrine du peptide (Szigethy et al., 1990; Boudin et al., 1998). Des études anatomiques et fonctionnelles ont aussi permis de démontrer que le NTS1 est exprimé par les astrocytes et que le peptide induit une hyperpolarisation de leur potentiel membranaire, laquelle est bloquée par le SR48692 (Hosli et al., 1995). Les récepteurs NTS2 sont eux aussi exprimés dans les cellules gliales, du moins dans des cultures de ces cellules (Nouel et al., 1997).

2.2.5. Pharmacologie des récepteurs neurotensinergique

Les récepteurs NTS1 et NTS2 diffèrent l'un de l'autre par certaines de leurs propriétés pharmacologiques. NTS1 possède une haute affinité pour la neurotensine (Kd : 0,1-0,3 nM); il est inhibé par le Na⁺ (Kitabgi, Kwan, Fox, and Vincent, 1984) et le GTP (Bozou et al., 1986) et est insensible à la lévocabastine, une molécule agissant comme antagoniste du récepteur de l'histamine H1 (Schotte et al., 1986). Au contraire, NTS2 a une plus faible affinité pour ses agonistes (Kd : 3-10 nM), est peu sensible au Na⁺, insensible au GTP (Mazella et al., 1987), et la liaison de la neurotensine à NTS2 est déplacée par la lévocabastine (Schotte et al., 1986) (voir tableau 2).

Un certain nombre de molécules, agonistes et antagonistes, a été synthétisé et permet d'étudier les propriétés fonctionnelles des récepteurs de la neurotensine (tableau 2). Premièrement, le SR48692 et le SR142948A, deux antagonistes non peptidiques des

récepteurs de la neurotensine, ont été développés (Gully et al., 1993; Gully et al., 1997). SR142948A possède une affinité similaire pour NTS1 et NTS2. SR48692, quant à lui, possède une plus grande affinité pour NTS1 ($IC_{50} = 5,6 \text{ nM}$) que pour NTS2 ($IC_{50} = 300 \text{ nM}$). Aucune donnée quant à l'affinité de ces molécules pour NTS3 n'a été rapportée jusqu'à maintenant. Grâce à ces différences d'affinité, SR48692 est un outil précieux pour différencier le rôle des récepteurs NTS1 de celui des NTS2 lors des effets de la neurotensine. Par contre, il existe une certaine controverse concernant les propriétés de ces molécules. En effet, dans certaines conditions, SR48692 agit comme un agoniste de NTS2 et induit une entrée de Cl^- dans des oocytes exprimant NTS2 (Botto et al., 1997).

| | NTS1 | NTS2 | NTS3 | NTS4 |
|---------------|----------------------|----------------------|-------------|-------|
| Kd | 0,1-0,3 nM | 3-5 nM | 0,1-0,3 nM | ~30nM |
| SR48692 | Antagoniste (+++) | Antagoniste (+) | Aucun effet | ? |
| SR142978A | Antagoniste (+++) | Antagoniste (+++) | ? | ? |
| Lévocabastine | aucun effet | Agoniste (+) | ? | ? |
| Sodium | inhibe | aucun effet | ? | ? |
| GTP | inhibe | aucun effet | ? | ? |

Tableau 2 : Caractéristiques pharmacologiques des récepteurs neurotensinergiques. +++ : interaction forte, + : interaction faible, ? : aucune référence bibliographique sur l'interaction.

La lévocabastine quant à elle, est une molécule qui a la propriété de lier le NTS2. La pharmacologie de cette molécule est complexe, et dépend de l'espèce du récepteur. La lévocabastine agit comme agoniste sur le récepteur NTS2 de la souris transfecté dans des

cellules en lignées alors qu'elle agit comme antagoniste sur le récepteur NTS2 de l'humain (Mazella et al., 1996; Richard et al., 2001).

Bien que les caractéristiques pharmacologiques précédentes permettent, dans une certaine mesure, de discriminer les effets des récepteurs NTS1 et NTS2, aucun outil n'est disponible pour distinguer les effets médiés par NTS3 de ceux du récepteur de la neurotensine le plus récemment identifié, NTS4.

Le principal agoniste des récepteurs neurotensinergiques est la neurotensine, dont le fragment actif, comprenant les acides aminés 8 à 13, est souvent utilisé expérimentalement pour stimuler ces récepteurs (Cusack et al., 1993; Tyler et al., 1999; Cusack et al., 2000). Comme la plupart des peptides, la neurotensine n'est pas en mesure de traverser la barrière hémato-encéphalique et est rapidement dégradée lorsqu'elle est administrée de façon systémique. Une série d'agonistes neurotensinergiques ont été développés à partir du fragment 8-13 de la neurotensine. Certaines de ces molécules peuvent être administrées par voie systémique et traverser la barrière hémato-encéphalique (Machida et al., 1993). Plusieurs molécules analogues à la neurotensine (composé Eisai, NT66L, NT67L et NT69), connues pour traverser la barrière hémato-encéphalique, causent également des effets caractéristiques de la neurotensine, comme l'hypothermie et l'antinociception (Labbe-Jullie et al., 1994; Tyler et al., 1999). Le potentiel antipsychotique de ces molécules a été étudié, du fait qu'une diminution de la concentration de neurotensine dans le liquide céphalo-rachidien a été détectée chez un sous-groupe de patients schizophrènes (Widerlov et al., 1982; Garver et al., 1991).

PARTIE III : EFFETS DE LA NEUROTENSINE SUR LES NEURONES DOPAMINERGIQUES

La neurotensine est largement distribuée à travers le système nerveux central et agit sur plusieurs systèmes de neurotransmetteurs. Elle interagit en effet avec les neurones glutamatergiques, sérotoninergiques, GABAergiques, mais surtout avec les neurones qui nous intéressent davantage : les neurones dopaminergiques. La neurotensine module l'activité des neurones dopaminergiques de façon directe, en agissant sur eux tant au niveau terminal (Hetier et al., 1988; Faggin et al., 1990; Heaulme et al., 1997; Legault et al., 2002) qu'au niveau somatodendritique (Pinnock, 1985; Chung et al., 2005) mais aussi de façon indirecte, en modulant les afférences aux noyaux qui les contiennent (pour revue voir Binder et al., 2001; St-Gelais et al., 2006). L'action de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques est d'activer différentes voies de signalisation intracellulaires, ce qui entraîne ultimement une modulation de l'activité de ces neurones.

3.1. Effets de la neurotensine sur l'activité des neurones dopaminergiques

La neurotensine a un effet général excitateur sur l'activité électrique des neurones dopaminergiques. Cet effet excitateur se traduit par une augmentation du taux de décharge, de la relâche de dopamine et des conductances membranaires.

3.1.1. Effets de la neurotensine sur la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques

Le potentiel membranaire d'une cellule est une caractéristique de la nature même d'un type de neurone, de même que de son état d'excitation. La valeur du potentiel membranaire est le résultat de la différence de concentration des différents ions situés de part et d'autre de cette membrane et de la perméabilité sélective de la membrane pour ces ions. Ce gradient de concentration est maintenu grâce à l'action de protéines membranaires agissant comme pompes ioniques. Cette concentration peut être modifiée par l'ouverture ou la fermeture des différents canaux ioniques situés sur la membrane du neurone. Le potentiel de repos d'un neurone dopaminergique est généralement de -50 à -60mV. Les neurones dopaminergiques présents *in vivo* peuvent présenter plusieurs états d'activation : ils peuvent être hyperpolarisés et ne pas décharger spontanément de potentiels d'action, peuvent avoir un taux de décharge régulier ou en bouffées et finalement être dépolarisés à un point qu'ils ne déchargent plus. L'activité spontanée des neurones dopaminergiques résulte en partie de l'alternance entre deux courants : un courant dépolarisant spontané induit par des canaux calciques de type-T qui amène le potentiel membranaire au seuil d'activation du potentiel d'action et un courant potassique activé par le calcium, médié par les canaux de type SK (Grace et Bunney, 1984; Wolfart and Roeper, 2002; Waroux et al., 2005).

La neurotensine a un effet dépolarisant sur les neurones dopaminergiques via l'activation des récepteurs neurotensinergiques (Pinnock, 1985; Mercuri et al., 1993). Cet effet dépolarisant entraîne une augmentation de la fréquence des potentiels d'action. L'action de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques serait le résultat d'une activation de conductances cationiques non-spécifiques accompagnée d'une réduction de conductances potassiques (Mercuri et al., 1993; Jiang et al., 1994; Farkas et al., 1996). L'effet excitateur de la neurotensine sur la décharge des neurones dopaminergiques est bloqué par l'antagoniste neurotensinergique à large spectre, SR142948A (Pinnock, 1985;

Werkman et al., 2000). Le sous-type de récepteur neurotensinergique impliqué dans cet effet n'est cependant pas clairement identifié.

3.1.2. Effet de la neurotensine sur la relâche de dopamine

La dopamine est synthétisée et relâchée par les neurones dopaminergiques du mésencéphale qui innervent le striatum, le cortex et le système limbique. Dans le neurone, la dopamine est emmagasinée dans des vésicules de la terminaison axonale et relâchée dans la fente synaptique ou l'espace extracellulaire par suite de l'arrivée d'un potentiel d'action. Cette arrivée du potentiel d'action à la terminaison entraîne une augmentation du calcium intracellulaire laquelle entraîne l'exocytose de la vésicule contenant le neurotransmetteur.

De façon générale, la neurotensine induit une augmentation de la relâche de dopamine ce qui concorde avec l'effet excitateur du peptide observé en électrophysiologie. En effet, il a été montré que l'injection de neurotensine dans l'ATV induit une augmentation de la libération terminale de dopamine. Cette démonstration a été faite en mesurant la concentration des métabolites de la dopamine dans le noyau accumbens, le tubercule olfactif et le striatum (Kalivas et al., 1983; Cador et al., 1989; Kalivas and Duffy, 1990) ou plus directement, en mesurant la concentration de dopamine relâchée dans le noyau accumbens et le cortex préfrontal à l'aide de la voltamétrie (Steinberg et al., 1995; Sotty et al., 1998; Sotty et al., 2000). Par contre, la neurotensine peut également induire une diminution de la transmission dopaminergique dans certaines régions du cerveau. Une perfusion de neurotensine dans le noyau accumbens entraîne une nette diminution de la libération de dopamine dans cette région et cet effet semble dépendant, du moins en partie, du fait que la neurotensine augmente la relâche de GABA (Tanganelli et al., 1994). De plus, l'administration intracérébroventriculaire d'anticorps dirigés contre la neurotensine provoque une augmentation de l'activité locomotrice corrélée à une augmentation de la libération de dopamine mesurée par microdialyse dans le noyau accumbens (Wagstaff et al., 1994). Le sous-type de récepteur neurotensinergique responsable de cette libération

terminale de dopamine n'a pas clairement été identifié, mais SR48692, un antagoniste spécifique du NTS1, ne bloque pas la relâche de dopamine induite dans le noyau accumbens par injection de neurotensine dans l'ATV (Steinberg et al., 1994).

Évidemment l'augmentation de l'excitabilité des neurones dopaminergiques peut expliquer en bonne partie l'augmentation de la libération de dopamine induite par la neurotensine. Certaines études ont exploré d'autres mécanismes par lesquels la neurotensine pourrait agir, de même que les voies de signalisation impliquées dans le phénomène. Lors de la mesure de la concentration extracellulaire de dopamine en voltamétrie dans le striatum, la neurotensine induit une augmentation de la relâche de dopamine lors d'un train de stimulations, mais aucun changement n'est observé si la stimulation électrique est simple. Il a été récemment montré dans notre laboratoire que l'augmentation de la libération terminale de dopamine par la neurotensine exigerait par une inhibition de la fonction du récepteur D2. En effet, le blocage du récepteur D2 inhibe la facilitation de la relâche de dopamine induite par la neurotensine (Fawaz et al., communication personnelle). De plus, dans les cellules mésencéphaliques en culture l'augmentation de la relâche de dopamine induite par la neurotensine est bloquée lorsque la PKC est préalablement activée par un traitement au phorbol ester; ce qui suggère un rôle de cet enzyme dans cet effet de la neurotensine (Brouard et al., 1994).

En résumé, on peut conclure que l'activation des neurones dopaminergiques par la neurotensine entraîne une augmentation de leur relâche de dopamine, et que plusieurs mécanismes pourraient être à l'origine de cet effet.

3.1.3. Effets de la neurotensine sur les conductances ioniques

L'augmentation de la fréquence de décharge et l'augmentation de la relâche de dopamine résultent du fait que la neurotensine module l'activité de certains canaux ioniques des neurones dopaminergiques du mésencéphale (Pinnock, 1985; Seutin et al., 1989; Stowe and Nemeroff, 1991).

Par suite d'une application de neurotensine, les neurones dopaminergiques de l'ATV et de la SNc montrent un courant entrant résultant de l'augmentation de conductances cationiques non sélectives et d'une diminution de conductances potassiques (Jiang et al., 1994; Kirkpatrick and Bourque, 1995; Farkas et al., 1996; Farkas et al., 1997). L'activation des récepteurs neurotensinergiques réduit également de façon réversible des courants entrants induits par l'hyperpolarisation (I_h) dans les neurones dopaminergiques de la SNc (Cathala and Paupardin-Tritsch, 1997). Ce courant entrant est composé de plusieurs conductances cationiques et pourrait moduler l'excitabilité cellulaire en limitant la durée et l'amplitude de l'hyperpolarisation des neurones dopaminergiques (Mercuri et al., 1995). La résultante physiologique de cet effet de la neurotensine demeure inconnu et n'est pas claire, puisque la neurotensine a un effet général excitateur. En plus de son effet sur le potentiel membranaire, l'entrée de cations dans le neurone dopaminergique pourrait exercer des effets sur la signalisation intracellulaire. Ainsi, l'entrée de calcium peut activer plusieurs enzymes. De plus, il n'a pas été démontré que l'entrée de cations est responsable de l'effet excitateur de la neurotensine.

Des études suggèrent que l'activation de conductances cationiques entrantes seraient le résultat de la production d'inositol triphosphate (IP3), alors que le blocage de conductances potassiques résulterait de l'activation de la PKC (Wu and Wang, 1995; Wu et al., 1995; Wang and Wu, 1996). Le courant entrant induit par la neurotensine dans les neurones dopaminergiques est bloqué par le SR48692, ce qui suggère une implication directe du récepteur NTS1 (Wu and Wang, 1995; Farkas et al., 1996). Malheureusement, ces études n'ont pas été effectuées avec une rigueur scientifique adéquate. En effet, les données présentées dans ces articles ne sont pas supportées par des analyses quantitatives ni statistiques et l'échantillonnage est parfois faible. De plus, aucun critère valable pour n'a été utilisé pour s'assurer que les enregistrements étaient effectués sur des neurones dopaminergiques.

D'autres études suggèrent que la dépolarisation des neurones dopaminergiques induite par la neurotensine puisse être divisée en deux composantes : une phase rapide et une phase lente. Les deux composantes seraient médiées par des mécanismes intracellulaires distincts. La phase rapide serait le résultat de conductances cationiques non sélectives induites par l'activation de protéines G de type $G_{\alpha q}$ et/ou $G_{\alpha 11}$ et de la voie de l'IP3 (Wu and Wang, 1995; Wang and Wu, 1996). La phase lente serait médiée par une diminution du courant I_h , composé de conductances cationiques activées par l'hyperpolarisation, et serait dépendante de l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Wu and Wang, 1995; Wang and Wu, 1996; Cathala and Paupardin-Tritsch, 1997). Cependant, encore ici, certaines faiblesses expérimentales doivent amener à considérer les conclusions avec prudence. Ces articles ne présentent pas d'analyse statistique des résultats. De plus, dans l'étude de Cathala et Paupardin-Tritsch (1997) aucun critère n'a été utilisé pour identifier les neurones dopaminergiques : on considère que les neurones présents dans la SNc sont tous dopaminergiques ce qui est inexact, alors que dans les études de Wu et Wang, seuls des critères morphologiques ont été utilisés.

3.2. Voies de signalisation activées par la neurotensine

3.2.1. Voies moléculaires activées par la neurotensine

3.2.1.1. Voies de signalisation activées par la stimulation de NTS1

NTS1 est un récepteur couplé à une protéine G de type Gq et induit donc l'activation de la phospholipase C (PLC) (Wu and Wang, 1995; Wu et al., 1995). Le couplage entre NTS1 et la protéine Gq se fait au niveau de la troisième boucle intracellulaire du récepteur (Yamada et al., 1994). Ce couplage a pour conséquence l'hydrolyse du phospholipide membranaire, phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate (PIP2), qui induit à son tour la production de deux seconds messagers l'inositol triphosphate (IP3)

et le diacylglycérol (DAG), ce dernier étant un activateur de la protéine kinase C (PKC) (voir figure 10). La production d'IP3 provoque une mobilisation du calcium à partir des réserves intracellulaires (Hermans et al., 1992; Slusher et al., 1994; Chabry et al., 1994; Liu et al., 2000). L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium serait responsable de l'activation d'autres messagers cellulaires. Dans un système de cellules en lignée transfectées avec les sites de liaison de haute affinité de la neurotensine, le calcium induit une activation de la guanylate cyclase responsable de la production de GMPc (Gilbert and Richelson, 1984; Amar et al., 1985; Donato di Paola et al., 1993).

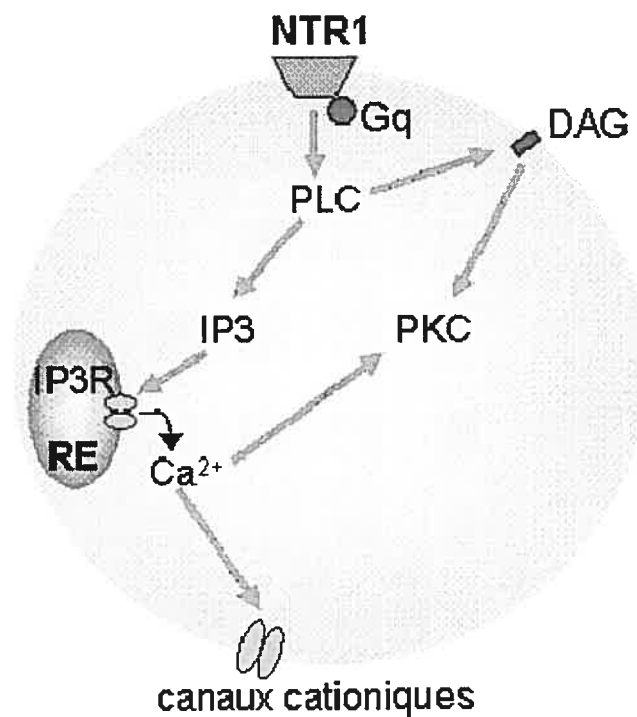


Figure 10 : schéma des voies de signalisation du récepteur neurotensinergique NTS1

Le calcium mobilisé par la neurotensine se lie à la calmoduline, qui est alors en mesure de produire du NO par activation de la NO synthétase via la calmoduline (Marsault and Frelin, 1992). Le NO est un gaz qui traverse les membranes cellulaires et on lui attribue la possibilité d'agir de façon indirecte sur les cellules environnantes (Marsault and Frelin, 1992). La neurotensine induit également l'activation de la MAPK dans un système de transfection, via un mécanisme dépendant de la PKC et qui serait médié par le sous-type de récepteur NTS1, cet effet étant bloqué par le SR48692 (Poinot-Chazel et al., 1996).

En plus d'activer une protéine de type Gq, la neurotensine peut activer une protéine Gs. Cette voie permettrait la formation d'adénylate cyclase, laquelle conduit à la formation d'AMP cyclique (AMPc) à la fois de façon positive et négative dans des modèles de cellules en culture (Bozou et al., 1986; Yamada et al., 1993; Slusher et al., 1994). Le véritable effet de la neurotensine sur l'AMPc demeure controversé étant donné que la neurotensine n'affecte pas les niveaux d'AMPc dans des tranches de cerveau de rat (Goedert et al., 1984a) ou les cellules C1.16E (dérivées de cellules HT29) (Augeron et al., 1992).

3.2.1.2. Voies activées par la stimulation du NTS2

Les voies de signalisation activées par NTS2 demeurent controversées en raison des résultats contradictoires qui ont été obtenus dans différents modèles de transfection où le récepteur est surexprimé, ainsi que des modèles de tranches. De plus, les caractéristiques de liaison de NTS2 varient d'un modèle à l'autre. L'activation de NTS2 peut entraîner une mobilisation calcique, la production d'inositol phosphate et la phosphorylation de la MAPK (Vita et al., 1998; Sarret et al., 2002b; Gendron et al., 2004).

3.2.1.3. Voies activées par la stimulation du NTS3

La stimulation du NTS3, un récepteur ne possédant qu'un seul passage transmembranaire, entraîne l'activation de voies de signalisation qui sont peu connues et

peu étudiées. Malgré cette méconnaissance, certaines pistes de recherche intéressantes ont été investiguées. Parmi celles-ci, l'hétérodimérisation entre le NTS1 et le NTS3 a été observée par immunoprécipitation dans un modèle de cellules en lignées. Le rôle exact de ce dimère est inconnu, mais il induit une modification de certaines voies de signalisation induite par l'activation du NTS1 (Martin et al., 2002). La formation de ce complexe *in vivo* et sa fonction physiologique restent à démontrer.

Une autre observation intéressante concernant le NTS3 est que son extrémité cytoplasmique est fortement homologue à celle des récepteurs «insulin-like growth factor-II» et «mannose-6-phosphate», des récepteurs à un seul passage transmembranaire qui induisent l'activation d'une protéine G sans avoir la structure conforme à la famille de récepteurs couplés à une protéine G (Hawkes et al., 2006). Par contre, cette possibilité intéressante est improbable pour le NTS3 malgré sa structure analogue au récepteur mannose-6-phosphate puisqu'il a été montré expérimentalement qu'il n'est pas en mesure de lier le GTP (Mazella et al., 1989; Zsurger et al., 1994).

3.2.2. Internalisation du complexe ligand-récepteur (NT- récepteur NT)

Outre la fonction reconnue des RCPG d'induire l'activation de voies de signalisation moléculaire, la liaison de l'agoniste à son récepteur peut entraîner l'internalisation de ce complexe. Ce phénomène induit une désensibilisation de la réponse à l'agoniste, puisque moins de récepteurs sont présents à la membrane.

Plusieurs études ont montré que la neurotensine induit l'internalisation de son récepteur dans des modèles de cellules en lignées transfectées avec NTS1 (Mazella et al., 1991; Donato di Paola et al., 1993; Hermans et al., 1994; Chabry et al., 1994; Faure et al., 1995; Vandenbulcke et al., 2000). D'abord, la liaison de la neurotensine au récepteur NTS1 entraîne la phosphorylation de ce dernier, ce qui mène à une liaison de la β -arrestine-2 à NTS1. Il y a ensuite internalisation du récepteur par un mécanisme dépendant de la clathrine (Oakley et al., 2001) (figure 11). NTS2 peut lui aussi être internalisé par un

mécanisme dépendant de la clathrine, tel que démontré par une étude menée sur des cellules granulaires du cervelet en culture (Sarret et al., 2002a).

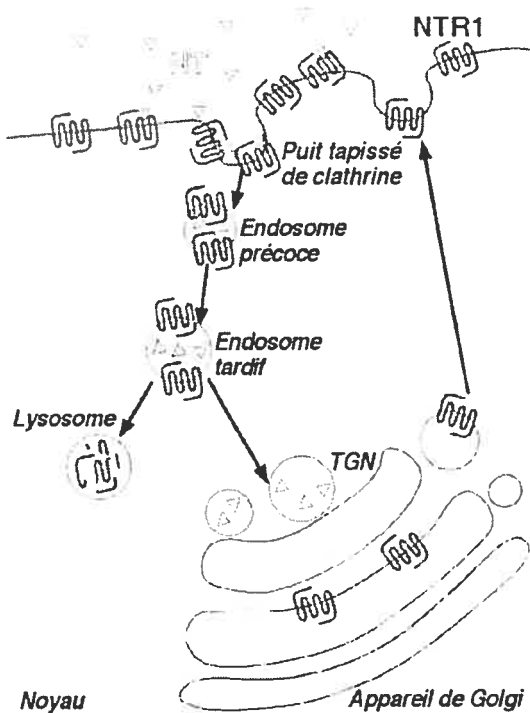


Figure 11. Représentation schématique de l'internalisation du complexe neurotensine-NTS1 via un mécanisme dépendant de vésicules tapissées de clathrine. TNG : transgolgi (adapté de Vandebulcke et al., 2000)

L'internalisation du récepteur NTS1 a été étudiée par microscopie confocale sur des cellules en lignée transfectées avec NTS1 (Vandebulcke et al., 2000). Cette technique a permis de montrer que, par suite de son internalisation, le complexe ligand-récepteur passe du compartiment endosomal précoce aux endosomes tardifs où la neurotensine est dissociée de son récepteur. La microscopie confocale, effectuée sur des coupes de mésencéphale de rat a permis d'observer le transport de la neurotensine dans les neurones dopaminergiques de la substance noire et l'ATV, à partir des terminaisons axonales et dendritiques jusqu'au corps cellulaire des neurones (Faure et al., 1995). Une certaine proportion de la neurotensine se retrouve finalement à proximité du noyau, dans le transgolgi. Pendant ce temps, le récepteur internalisé est dégradé par les lysosomes.

3.2.3. Effet de la neurotensine sur les niveaux de calcium intracellulaire

Un des effets de la neurotensine est l'augmentation du calcium intracellulaire qu'elle entraîne dans certains types de cellules. La neurotensine induit l'augmentation du calcium intracellulaire dans des cellules corticales en culture (Sato et al., 1991), mais également dans les neurones du raphé et de la substance grise périaqueducale (Li et al., 2001a; Li et al., 2001b). Elle induit également une mobilisation calcique dans les astrocytes du mésencéphale en culture, dans des cellules en lignée transfectées et dans des cellules amacrines en culture (Parpura et al., 1994; Hermans et al., 1995; Borges et al., 1996). Bien que l'interaction entre la neurotensine et les neurones dopaminergiques ait été bien étudiée, il n'a jamais été démontré que la neurotensine puisse induire une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire dans ces neurones.

La mobilisation intracellulaire de calcium peut provenir soit du milieu extracellulaire, qui est plus concentré en calcium que l'intérieur de la cellule, soit des réserves intracellulaires de calcium. L'entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire se fait via des canaux calciques ou cationiques non sélectifs. Mais des réserves de calcium sont aussi présentes à l'intérieur même de la cellule. En effet, le réticulum endoplasmique contient une grande concentration de calcium, qui peut être libéré dans le cytoplasme lors de la stimulation des récepteurs de l'IP3 et de la ryanodine présents sur la membrane du réticulum.

3.3. Introduction de l'article 1

Une mobilisation intracellulaire de calcium par la neurotensine a été démontrée dans plusieurs types cellulaires comme les astrocytes, les cellules amacrines de la rétine et des cellules en lignées exprimant NTS1. Par contre, la démonstration de l'induction d'une réponse calcique par la neurotensine dans les neurones dopaminergiques reste à venir. Une

augmentation de la concentration intracellulaire de calcium induite par la neurotensine est plausible dans les neurones dopaminergiques. En effet, la neurotensine induit l'activation de conductances cationiques, qui pourraient être à l'origine d'une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, mais elle active également la production d'IP₃, qui a la capacité de libérer les stocks intracellulaires de calcium. Une autre source potentielle de calcium est l'effet dépolarisant de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques; ceci qui pourrait entraîner l'ouverture de canaux cationiques dépendant du voltage en ainsi participer à l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire.

L'implication potentielle du calcium dans l'effet excitateur de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques est aussi à démontrer. En plus de pouvoir contribuer directement à modifier le potentiel membranaire du neurone en le dépolarisant, une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium pourrait activer certaines enzymes et certains canaux impliqués dans l'effet excitateur de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques.

Nous avons voulu répondre à ces questions dans le premier article de la section résultats de cette thèse.

PARTIE IV : INTERACTION ENTRE LA NEUROTENSINE ET LE RÉCEPTEUR DOPAMINERGIQUE D2

Les effets de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques passent par les voies métaboliques décrites précédemment, soit l'activation de la PKC et de l'IP3 via la protéine Gq, l'activation de conductances cationiques, et le blocage de conductances potassiques. En plus de l'activation de ces voies de signalisation, la neurotensine régule l'activité des neurones dopaminergiques de façon indirecte, en diminuant la fonction de l'autorécepteur dopaminergique D2.

L'effet d'une activation des récepteurs de la neurotensine sur la fonction du récepteur dopaminergique D2 a été mis en évidence de différentes façons. En plus de la colocalisation des deux récepteurs, qui suggère que leur interaction est anatomiquement possible, des données comportementales, électrophysiologiques, pharmacologiques et moléculaires ont montré leur interaction fonctionnelle. Par contre, le mécanisme responsable de cette interaction reste à élucider.

4.1. Colocalisation anatomique de la neurotensine et de la dopamine dans le mésencéphale

Le système neurotensinergique est anatomiquement associé de très près au système dopaminergique (Quirion et al., 1992; Kinkead and Nemeroff, 1994). En effet, des études histologiques ont permis de montrer une colocalisation de la neurotensine avec les neurones dopaminergiques, entre autre, dans la SN et l'ATV. Par contre, on a aussi constaté que la distribution des cellules neurotensinergiques n'est pas uniforme dans le mésencéphale. En

effet, alors que beaucoup de cellules exprimant la neurotensine se trouvent dans l'ATV, très peu sont présents dans la SN et le RRF (Uhl et al., 1977; Uhl, 1982; Jennes et al., 1982). La majorité des neurones de l'ATV exprimant la neurotensine expriment aussi la tyrosine hydroxylase (Hökfelt et al., 1984; Seroogy et al., 1987). De plus, les neurones dopaminergiques reçoivent eux-mêmes des afférences neurotensinergiques provenant de diverses régions du cerveau (voir section 2.1.3.).

L'étude de la localisation des récepteurs neurotensinergiques suggère que la neurotensine puisse moduler les neurones dopaminergiques. En effet, la combinaison d'études autoradiographiques et histochimiques a permis de montrer que les récepteurs neurotensinergiques sont exprimés par une forte proportion des neurones dopaminergiques de la SN et de l'ATV (Palacios and Kuhar, 1981; Szigethy and Beaudet, 1989; Bachelet et al., 1997).

En résumé, ces études neuroanatomiques laissent croire qu'une certaine proportion des neurones dopaminergiques du mésencéphale est en mesure de produire et de libérer la neurotensine, et d'exprimer des récepteurs neurotensinergiques.

4.2. Données comportementales à l'appui d'une interaction entre la neurotensine et le système dopaminergique

Lorsqu'elle est injectée directement dans le système nerveux central, la neurotensine produit plusieurs effets comportementaux, qui sont similaires à ceux observés lors de l'administration d'antipsychotiques, lesquels sont des antagonistes des récepteurs dopaminergiques D2. Parmi ces effets comportementaux, on retrouve le blocage de l'hyperactivité locomotrice induite par des psychostimulants comme l'amphétamine et la cocaïne, aussi qu'une diminution du taux d'autostimulation électrique intracrânienne (Nemeroff et al., 1983; Ford and Marsden, 1990; Nemeroff et al., 1992; Jolicoeur et al.,

1993). Ces observations comportementales d'effets de type antipsychotique de la neurotensine sont en accord avec une action de la neurotensine sur la fonction du récepteur D2.

4.3. Données biochimiques à l'appui d'une interaction entre la neurotensine et le récepteur D2

Différents modèles expérimentaux ont servi à démontrer, que la neurotensine induit une diminution de l'affinité du récepteur D2 pour ses agonistes, dans le striatum, le noyau accumbens, le tubercule olfactif et la glande pituitaire. Les résultats obtenus sont variables, mais les valeurs de la constante de dissociation (K_d) d'un agoniste du récepteur D2 augmente de 10 à 200% en présence de neurotensine, selon les conditions expérimentales (von Euler et al., 1989; von Euler et al., 1990b; Fuxe et al., 1992; Tanganelli et al., 1993; Li et al., 1995). Il faut noter que ces expériences ont été effectuées en autoradiographie sur des préparations membranaires et ne permettent pas de déterminer si l'effet observé a lieu dans les corps cellulaires de ces régions ou dans les terminaisons dopaminergiques qu'on y trouve. L'effet de la neurotensine semble sélectif pour le récepteur D2, puisque la neurotensine réduit son affinité du récepteur D2, mais non celle du récepteur D1, dans des préparations membranaires du noyau accumbens, du tubercule olfactif et dans le néostriatum (Fuxe and Agnati, 1985; von Euler, 1991). Des expériences *in vivo* et *in vitro* montrent également que la neurotensine augmente la valeur de la constante de dissociation des agonistes aux récepteurs D2 et D3. Par contre, la valeur du B_{max} , c'est-à-dire la concentration totale de récepteurs ne serait pas affectée par la neurotensine (Agnati et al., 1983b; von Euler et al., 1990a; von Euler et al., 1990b; von Euler et al., 1991; Liu et al., 1994).

Une interaction entre la neurotensine et ses récepteurs et le récepteur D2 est également suggérée par des mesures en microdialyse de la relâche de dopamine. La

perfusion de neurotensine dans le striatum a permis de montrer que la neurotensine bloque l'effet inhibiteur d'un agoniste du récepteur D2 sur les concentrations extracellulaires de dopamine mesurées en microdialyse (Fuxe et al., 1992a,b; Diaz-Cabiale et al., 2002) et d'acide γ -aminobutyrique (GABA) (Fuxe et al., 1992a,b; Li et al., 1995). Ces résultats indiquent que la neurotensine affecte la fonction du récepteur D2 tant au niveau pré-synaptique que post-synaptique. L'effet de la neurotensine sur l'affinité de l'autorécepteur D2 pré-synaptique se traduit par une augmentation de dopamine extracellulaire. Quant à la relâche de GABA, elle est le résultat d'une stimulation des neurones GABAergiques du striatum dotés de récepteurs D2 post-synaptiques (Girault et al., 1986). Ces résultats concernant une interaction post-synaptique entre les récepteurs de la neurotensine et le récepteur D2 ont été confirmés par d'autres études arrivant à des conclusions similaires (Agnati et al., 1983a; Nemeroff, 1986; O'Connor et al., 1992).

Même si cet ensemble de données démontre une interaction entre la neurotensine et la fonction du récepteur D2. Les mécanismes impliqués restent mal connus. La combinaison d'expériences d'autoradiographie et de microdialyse suggère cependant de façon indirecte que, dans le striatum, l'activation de NTS1 par la neurotensine régule la relâche de dopamine via la modulation des récepteurs D2. En effet, la relâche de dopamine bloquée par un agoniste D2 est restaurée en présence de neurotensine *in vivo* et cet effet est bloqué par le SR48692 (Diaz-Cabiale et al., 2002).

4.4. Données électrophysiologiques à l'appui d'une interaction entre la neurotensine et le récepteur D2

4.4.1. Interaction impliquant des conductances ioniques

Il est possible d'utiliser des outils électrophysiologiques pour étudier le mécanisme d'action de la neurotensine sur la fonction du récepteur D2, puisque l'activation des

récepteurs dopaminergiques et neurotensinergiques entraîne l'activation de conductances membranaires. Ainsi, le quinpirole, un agoniste du récepteur D2, inhibe l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV en entraînant l'ouverture de canaux potassiques, lesquels sont des conductances à rectification entrantes (Lacey et al., 1987; Kim et al., 1995). La neurotensine, pour sa part, peut inhiber la conductance potassique induite par le quinpirole (Farkas et al., 1997). Il est donc possible que l'action de la neurotensine sur la fonction du récepteur D2 soit le résultat d'une action opposée de l'une et l'autre sur des conductances potassiques.

4.4.2. Interactions affectant la décharge des neurones

D'autres études électrophysiologiques ont montré une diminution de la fonction du récepteur D2 sous l'effet de la neurotensine. L'enregistrement extracellulaire dans des tranches de mésencéphale permet de mesurer la fréquence des potentiels d'action d'un neurone dopaminergique et d'évaluer ainsi son activité de décharge. La fréquence de décharge des neurones dopaminergiques est considérablement diminuée lors de l'application d'un agoniste de l'autorécepteur D2. Cette diminution est partiellement bloquée par une pré-application de neurotensine (Shi and Bunney, 1991a; Werkman et al., 2000). Il a aussi été constaté que le blocage de la fonction du récepteur D2 par la neurotensine est de même amplitude dans l'ATV et dans la SN (Werkman et al, 2000). Ces données électrophysiologiques montrant l'effet de la neurotensine sur la fonction du récepteur D2 apportent la preuve d'une interaction fonctionnelle et appuient les résultats obtenus par les autres approches.

4.5. Hypothèse proposée pour expliquer le mécanisme d'interaction entre la neurotensine et ses récepteurs et le récepteur D2

Bien que les études décrites et discutées dans ce chapitre aient démontré l'existence d'interactions entre la neurotensine et ses récepteurs et le récepteur D2, le mécanisme cellulaire et moléculaire responsable de la diminution de fonction du récepteur D2 demeure inconnu.

En se liant à ses récepteurs, la neurotensine entraîne l'activation de plusieurs voies enzymatiques dont celles de la PLC et de la PKC. Parallèlement, il a été montré que la phosphorylation du récepteur D2 par la PKC entraîne sa désensibilisation (Rogue et al., 1990; Namkung and Sibley, 2004). L'hypothèse principale dans le deuxième article de la section résultats de cette thèse est que la PKC médie l'action de la neurotensine sur la fonction du récepteur D2, puisque cet enzyme est activé par la neurotensine. Nous avons combiné l'utilisation d'outils électrophysiologiques et pharmacologiques pour tester cette hypothèse.

RÉSULTATS

Contribution des co-auteurs

Les articles qui suivent sont le résultat du travail expérimental que j'ai réalisé au cours de mon doctorat. Je suis auteur principal des deux articles de recherche présentés dans cette section, ainsi que de l'article de revue de littérature présenté dans la section discussion. J'ai donc effectué la majorité du travail expérimental présenté dans ces articles et rédigé les manuscrits. Mon directeur de recherche, le Dr Louis-Éric Trudeau, a supervisé les travaux et la rédaction des articles. D'autres personnes ont également participé à ces études et à la rédaction des manuscrits :

Article 1 :

Mark Legault a réalisé les expériences en imagerie calcique présentées aux figures 2 et 3B.

Marie-Josée Bourque a effectué les cultures primaires de neurones ayant été utilisées dans les expériences et déterminé les conditions de culture où les astrocytes répondent ou non à une application de neurotensine.

Pierre-Paul Rompré a supervisé les travaux de Mark Legault et révisé le manuscrit.

Article 2 :

Jean-Claude Lacaille a révisé le manuscrit et participé à la mise en place du projet. J'ai bénéficié de ses conseils dans le cadre de mon comité de parrainage et de l'accès à certains appareils de son laboratoire.

Article 3 :

La rédaction de cet article de revue a été partagé entre les 3 auteurs. En tant qu'auteur principal j'ai rédigé les sections 2, 5, 6, 7 et 8.

Claudia Jomphe a contribué à la rédaction de cet article en rédigeant sa première partie et en révisant le manuscrit dans son entier.

ARTICLE 1

Role of Calcium in Neurotensin-Evoked Enhancement in Firing in Mesencephalic Dopamine Neurons

Fannie St-Gelais^{1,2}, Mark Legault^{1,3}, Marie-Josée Bourque¹, Pierre-Paul Rompré^{2,3} and Louis-Eric Trudeau^{1,2,3}

¹Département de Pharmacologie, ²Centre de Recherche en Sciences Neurologiques and ³Centre de Recherche Fernand Seguin, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4

Journal of Neuroscience, 2004, 24(10): 2566-74.

Abstract

Neurotensin (NT) increases neurotransmission within the mesolimbic dopamine system by enhancing the firing rate of dopaminergic (DAergic) neurons and by acting at the nerve terminal level. The signal transduction pathways involved in these effects have not been characterized, but NT receptors are coupled to the phospholipase C pathway and Ca^{2+} mobilization. However, an enhancement of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) evoked by NT in DAergic neurons has yet to be demonstrated. Furthermore, the hypothesis that the excitatory effects of NT in DAergic neurons are Ca^{2+} dependent is currently untested. In whole-cell recording experiments, DAergic neurons in culture were identified by their selective ability to express a cell-specific green fluorescent protein reporter construct. These experiments confirmed that NT increases firing rate in cultured DAergic neurons. This effect was Ca^{2+} dependent because it was blocked by intracellular dialysis with BAPTA. Using Ca^{2+} imaging, we showed that NT caused a rapid increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in DAergic neurons. Most of the Ca^{2+} originated from the extracellular medium. NT-induced excitation and Ca^{2+} influx were blocked by SR48692, an antagonist of the type 1 NT receptor. Blocking IP3 receptors using heparin prevented the excitatory effect of NT. Moreover, Zn^{2+} and SKF96365 both blocked the excitatory effect of NT, suggesting that nonselective cationic conductances are involved. Finally, although NT can also induce a rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in astrocytes, we find that NT-evoked excitation of DAergic neurons can occur independently of astrocyte activation.

Key words: neurotensin; dopamine; ventral tegmental area; patch clamp; intracellular calcium; calcium imaging; primary culture

Introduction

Neurotensin (NT) and its receptors are present in high density in the ventral mesencephalon (Palacios and Kuhar, 1981; Szigethy and Beaudet, 1989; Dana et al., 1991). They are also present on astrocytes (Nouel et al., 1999; Trudeau, 2000). Although the physiological role of this peptide is unclear, it may play a role in regulating dopaminergic (DAergic) neuronal pathways involved in reward (Rompre et al., 1992) and may be perturbed in schizophrenia (Govoni et al., 1980; Kinkead et al., 2000).

NT generally enhances dopamine release (Kalivas et al., 1983; Cador et al., 1989; Stowe and Nemeroff, 1991). It acts both at the nerve terminal (Hetier et al., 1988; Faggin et al., 1990; Heaulme et al., 1997; Legault et al., 2002) and at the somatodendritic level in which it enhances firing rate (Pinnock, 1985; Seutin et al., 1989; Jiang et al., 1994; Nalivaiko et al., 1998; Werkman et al., 2000). The effects of NT on DAergic neurons are thought to be primarily mediated by NTS1, a G-protein-coupled receptor that is highly expressed in DAergic neurons (Mazella et al., 1996). In the mesencephalic brain slice preparation, the enhancement in firing rate caused by NT is blocked by SR142948A, a wide-spectrum NT receptor antagonist that blocks both NTS1 and NTS2, the latter being the second major brain NT receptor (Nalivaiko et al., 1998).

The depolarizing effect of NT on DAergic neurons has been suggested to require activation of nonspecific cationic conductances, perhaps accompanied by a reduction in a K^+ conductance (Mercuri et al., 1993; Jiang et al., 1994; Farkas et al., 1996). The inward current induced by NT in DAergic neurons is blocked by the selective NTS1 antagonist SR48692 (Wu et al., 1995; Farkas et al., 1996). How NTS1 modulates such ionic currents is unknown. However, the best characterized signal transduction pathway for this receptor implicates phospholipase C (PLC) (Tanaka et al., 1990; Hermans et al., 1992; Chabry et al., 1994; Wang and Wu, 1996; Martin et al., 1999; Grisshammer and Hermans, 2001). A link between PLC-generated second messengers and the depolarizing effect of NT remains to be

established. A preliminary report has proposed that Ca^{2+} mobilization and IP_3 receptor activation are necessary for the enhancement by NT of a nonselective cationic current (Wu et al., 1995); however, NT reportedly still excites DAergic neurons in low external Ca^{2+} (Seutin et al., 1989). Finally, it has been reported previously that NT causes a rise in intracellular Ca^{2+} in cultured cortical cells (Sato et al., 1991), in cultured mesencephalic astrocytes (Trudeau, 2000), and in neurons acutely dissociated from the raphe and periaqueductal gray nuclei (Li et al., 2001a,b). However, an NT-evoked increase in intracellular Ca^{2+} in DAergic neurons has not yet been described.

In the present experiments, we tested the hypothesis of a relationship between NT-evoked enhancement in firing and NT-evoked increases in intracellular Ca^{2+} . Our results suggest that an increase in intracellular Ca^{2+} is necessary for NT-induced firing rate increase and that the IP_3 pathway and nonselective cationic channels are involved.

Materials and Methods

Cell culture. Primary cultures of ventral mesencephalon were prepared from rats aged from 1 to 3 d according to previously described protocols (Bourque and Trudeau, 2000; Michel and Trudeau, 2000; Congar et al., 2002) derived from Cardozo (1993) and Sulzer et al. (1998). Briefly, animals were cryoanesthetized, brains were rapidly removed, and a coronal section (1 mm thick) was prepared at the level of the midbrain flexure. Bilateral tissue blocks containing substantia nigra and a medial block containing the ventral tegmental area (VTA) were then dissected. The blocks were incubated in papain for 30 min and dissociated. After trituration in a solution containing 10% fetal bovine serum, cells were centrifuged. The supernatant was removed, and the cells were resuspended and plated on 15 mm coverslips that had been seeded previously with mesencephalic astrocytes.

Two astrocyte culture protocols were used. In most experiments, mesencephalic astrocytes were grown in flasks for 48 hr and then washed with cold medium to eliminate neurons and many astrocytes, conserving only highly adherent astrocytes. Such purified astrocytes were then transferred to coverslips before plating neurons. A subset of experiments was also performed on primary astrocytes, which were directly plated on coverslips, without selection and growth in flasks. We reported previously that a proportion of primary mesencephalic astrocytes respond to NT by a rise in $[Ca^{2+}]_i$ (Trudeau, 2000). In preliminary experiments, we discovered that purified astrocytes grown in flasks fail to respond to NT. As indicated, experiments were performed to determine whether the effect of NT on DAergic neurons was the same under conditions in which astrocytes respond or not to NT.

Cultures were maintained in Neurobasal A/BMEM (2:1) supplemented with penicillin-streptomycin, glutaMAX-1, B27 serum extender (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), and 10% fetal calf serum (HyClone, Logan, UT). Cultures matured for at least 9 d before experimentation.

Immunolabeling and transfection. After each experiment, a small injection of fluorescent microspheres (FluoSpheres; Molecular Probes, Eugene, OR) was made into the glial layer near the tested cells to locate the neurons after immunolabeling. Identification of DAergic neurons was made using an antibody directed against tyrosine hydroxylase (TH). Briefly, cells were fixed in 4% paraformaldehyde and then incubated with a mouse monoclonal TH antibody (Sigma, St. Louis, MO). Fluorescent secondary antibodies (Alexa-488 or Alexa-546; Molecular Probes) were used to visualize the primary antibody on an epifluorescence microscope (Eclipse TE-200; Nikon, Montreal, Quebec, Canada).

A selective transfection strategy was developed to identify DAergic neurons for patch-clamp recordings. This was required because DAergic neurons represent only 15-25% of the cells in postnatal mesencephalic cultures. Cells were transfected using the Ca^{2+} phosphate coprecipitation technique with a plasmid containing the coding sequence of enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the control the dopamine transporter promoter (hDAT-6250EGFP plasmid kindly provided by Dr. Michael Bannon, Faculty of Medicine, Wayne State University, Detroit, MI). Although this permitted preferential transfection of DAergic neurons, TH immunolabeling was nonetheless always performed to confirm the DAergic phenotype of the recorded neurons. Approximately 85% of neurons showing strong GFP expression after transfection were confirmed to be DAergic (see Fig. 1A). This technique thus allowed us to greatly improve the success of patch-clamp recording experiments.

Electrophysiology. Electrophysiological experiments were performed in a recording perfusion chamber mounted on an inverted fluorescence microscope. Neurons were perfused using a gravity flow system (2.5 ml/min) with standard saline at room temperature. The standard saline contained the following (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 HEPES, 6 sucrose, and 10 glucose, pH 7.35 (300 mOsm). Action potential firing was measured using the ruptured or perforated (amphotericin B, 150-200 mg/ml) patch-clamp technique. No differences were noted between recordings obtained

with the two techniques. All results were thus pooled. Patch pipettes were made from borosilicate capillary tubes (resistance 3-6 M) filled with a potassium methylsulfate solution containing the following (in mM): 120 potassium methylsulfate, 20 KCl, 5 NaCl, 0.1 EGTA, 2 MgATP, 0.5 GTP (Tris salt), 10 HEPES, and 10 phosphocreatine, pH 7.35 (300 mOsm). To evaluate the effect of NT(8-13) in the presence of BAPTA, the pipette solution contained the following (in mM): 100 potassium methylsulfate, 20 KCl, 5 NaCl, 0.1 EGTA, 2 MgATP, 0.5 GTP (Tris salt), 10 HEPES, 10 phosphocreatine, and 10 BAPTA-4K⁺, pH 7.35 (300 mOsm). The electrophysiological signal was amplified and filtered at 1 kHz using a PC-505 patch-clamp amplifier (Warner Instruments, Hamden, CT). This signal was digitized at 5 kHz using a Digidata 1200 analog-to-digital converter and Clampex 8.0 software (Axon Instruments, Foster City, CA). Neurons were recorded under current-clamp mode. Basal firing rate varied significantly between cells and between cultures, which explains the differences of this parameter between experiments (for details, see figure legends). This variability could be attributable to a number of factors, such as the density of plated neurons and the extent of connectivity between neurons, both of which change during maturation of the cultures. Action potential firing rate was analyzed using Mini Analysis 5.2 software (Synaptosoft, Leona, NJ). Firing rates were analyzed as the number of action potentials per 15 sec bin. Data are expressed in delta, which is the difference between numbers of action potentials per bin compared with the average number of action potentials during the control bins. Data in the text and figures are expressed as mean \pm SEM.

Fluorescence calcium imaging. Fluorescence imaging experiments were performed using an inverted Olympus Optical (Tokyo, Japan) IX50 microscope and a Hamamatsu (Bridgewater, NJ) ORCA-100 digital camera. The camera was attached to a multi-purpose optical workbench from Prairie Technologies (Middleton, WI). Images were captured using Stack Function software by Prairie Technologies. Images were captured at a rate of 0.5 Hz. Except otherwise indicated, for Ca²⁺ imaging experiments, neurons were loaded with Calcium Green-1 AM (5 μ M) (Molecular Probes) at room temperature, for at least 30 min.

In a series of experiments, the contribution of Ca^{2+} influx was determined by testing some cells in Ca^{2+} -free saline containing the following (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 4 MgCl_2 , 6 sucrose, 10 glucose, 10 HEPES, and 1 EGTA. This solution was perfused for 3 min before the application of NT(8-13). At the end of each experiment, saline containing 40 mM potassium was perfused for 30 sec to determine whether the cell was healthy and had the ability to show a rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

For data analysis, baseline was taken as the mean fluorescence intensity of a cell over the 10 sec (five images) immediately preceding NT(8-13) application. Neurotensin-evoked Ca^{2+} fluorescence change for each individual cell was expressed as the change in fluorescence intensity relative to the baseline signal of each individual cell. Neurons were determined to have responded to NT(8-13) with changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ if they met the following criteria: a cell had to have a change in its fluorescent ratio of at least 5%; that change had to be sustained for at least 20 sec, and, finally, the neurons had to respond to high potassium saline.

Statistical analysis. NT(8-13)-evoked changes in cell firing involved simple two-group comparisons and were thus analyzed by Student's paired t-tests. To quantify maximal effects, the mean value of control and wash periods was compared with the mean of the two bins showing the highest change in firing frequency in the 2 min after the beginning of NT(8-13) application. Analyses were performed in this way because the effect of NT(8-13) on firing rate occurred after variable delays.

Neurotensin-evoked changes in Calcium Green-1 fluorescence were assessed by two-way ANOVAs and Tukey's *post hoc* tests. Statistical analyses were performed on data from baseline to the first 90 sec after the initiation of NT perfusion. Analyses were limited to this time range because the effects of NT(8-13) and other treatments were clearly evident within this period.

Drugs. Tetrodotoxin (TTX) was purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). Unless otherwise mentioned, all other drugs and products were purchased from Sigma. In all experiments, the 8-13 active fragment of NT [NT(8-13); thereafter NT] was used as an NT receptor agonist. Neurotensin receptor antagonists were generously provided by Dr. Danièle Gully (Sanofi-Synthélabo, Paris, France).

Results

NT-evoked enhancement in firing in DAergic neurons

In patch-clamp recording experiments, DAergic neurons were recognized by their selective ability to express GFP after transfection with a plasmid allowing expression of GFP under the control of the dopamine transporter (DAT) promoter (Fig. 1A). Although only a minority of neurons were transfected (1-5% transfection efficiency), the majority of transfected neurons showing strong expression of GFP were confirmed to be DAergic by post-recording immunolabeling for TH (Fig. 1A) (see Materials and Methods). NT is recognized to increase the excitability of DAergic neurons. As expected, current-clamp recordings from identified DAergic neurons showed that NT (100 nM) induced an increase in firing rate (Fig. 1B,C). The basal firing rate of dopamine neurons was, on average, 1.05 ± 0.05 Hz ($n = 10$). Because basal firing rate was low in some cells, results were expressed as a relative change from baseline firing rate. Typically, the excitatory effect of NT was delayed; in most cells, the increase in firing rate occurred after a delay of 30-45 sec. Although the average effect of NT was excitatory, some response variability was observed: of 10 DAergic neurons recorded, 7 showed an increase in firing rate in response to NT, 2 showed no change, and 1 neuron showed a decrease in firing rate. In the seven neurons that showed an increase in firing rate, NT-evoked excitation was accompanied by a small depolarization of the resting membrane potential (2.7 ± 0.2 mV) (data not shown), compatible with previous reports of NT-evoked inward currents and depolarization in DAergic neurons (Mercuri et al., 1993).

The role of Ca^{2+} in NT-evoked increase in firing was evaluated using BAPTA, a Ca^{2+} chelator. NT failed to enhance firing rate when BAPTA (10 mM) was included in the patch pipette ($n = 10$) (Fig. 1C). These results show that the mechanism by which NT increases firing rate in DAergic neurons depends on intracellular Ca^{2+} .

Effects of NT on intracellular calcium

The Ca^{2+} dependency of NT-induced increase in firing rate suggests that NT increases intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in DAergic neurons. It has been shown previously that NT can increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in other cell types, such as in astrocytes (Trudeau, 2000), cortical cells (Sato et al., 1991), and amacrine cells of the retina (Borges et al., 1996). However, such an effect has never been demonstrated in DAergic neurons. To investigate the hypothesis of NT-evoked elevation in Ca^{2+} in DAergic neurons, variations in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were monitored by fluorescence imaging using Calcium Green-1 AM. We found that NT rapidly and robustly increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cultured DAergic neurons (Fig. 2A). The magnitude of the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ produced by NT was dose dependent, with a plateau being reached after 1 nM (Fig. 2B) (one-way ANOVA; $F(4,43) = 3.68$; $p < 0.05$). Although average increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were slightly smaller at 10 and 100 nM, there was no statistically significant difference between the response obtained at 1 nM and the responses obtained at 10 or 100 nM ($p > 0.05$). The rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was detectable within 6 sec after the beginning of drug application at 10 and 100 nM, whereas at 0.1 and 1 nM, 10-12 sec were required (data not shown). At concentrations from 0.1 to 100 nM, a significant NT-evoked increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was detectable in 90% of neurons tested (45 of 50), whereas only 23% of neurons responded to 0.01 nM NT (3 of 13). To minimize response delays, all additional experiments were performed with 100 nM NT.

To determine whether NT-evoked intracellular Ca^{2+} elevation was dependent on NT-evoked enhanced firing, imaging experiments were performed in the presence of TTX (0.5 μM), a blocker of voltage-gated sodium channels that abolishes the propagation of action potentials in most neurons, including DAergic neurons (data not shown) (Grace and Onn, 1989; Hausser et al., 1995). NT-evoked elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was still detectable and not significantly decreased after 3 min in the presence of TTX ($n = 13$ for control; $n = 11$ for TTX) (t test; $t = 0.36$; $p > 0.05$) (Fig. 2C). The Ca^{2+} elevation evoked by NT was therefore not activity dependent.

Ca^{2+} -free saline was used to evaluate the relative contribution of intracellular and extracellular Ca^{2+} sources to the elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by NT. We observed that, although NT still caused a small increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ when applied after 3 min perfusion with Ca^{2+} -free saline, the major part of the response was blocked ($n = 13$ for control; $n = 15$ for Ca^{2+} -free) (t test; $t = 4.37$; $p < 0.05$) (Fig. 2D). This finding shows that, although both extracellular and intracellular Ca^{2+} pools can contribute, most of the Ca^{2+} elevation caused by NT resulted from influx from the extracellular medium. Compatible with a minor involvement of intracellular Ca^{2+} stores, thapsigargin, a Ca^{2+} ATPase blocker ($1 \mu\text{M}$) that leads to the depletion of intracellular Ca^{2+} stores, did not cause a significant decrease in the magnitude of NT-evoked increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in DAergic neurons ($n = 17$) (t test; $t = 0.72$; $p > 0.05$) (Fig. 2D). The same result was obtained by using heparin, an IP3 receptor antagonist. Heparin (1 mg/ml) was introduced in individual neurons through whole-cell dialysis during patch-clamp recording. In these experiments, Calcium Green-1 was simultaneously introduced in the recorded neuron as a membrane-impermeant dextran conjugate. The ability of NT to cause an elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was unimpaired in heparin-loaded neurons ($n = 5$) (t test; $t = 0.69$; $p > 0.05$) (Fig. 2D). However, both heparin and thapsigargin caused a significant delay of the onset of NT-evoked Ca^{2+} elevation (Fig. 2E): the time required to reach maximal response amplitude (T_{max}) increased from $28 \pm 5 \text{ sec}$ in control conditions to $43 \pm 5 \text{ sec}$ in the presence of thapsigargin (t test; $t = 2.20$; $p < 0.05$) and to $44 \pm 3 \text{ sec}$ in the presence of heparin (t test; $t = 2.07$; $p < 0.05$). These results confirm the predominant, although not exclusive, role of extracellular Ca^{2+} influx in mediating NT-evoked $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in DAergic neurons.

The effect of NT is mediated by NTS1

We next wanted to determine which subtype of NT receptor mediates the excitatory effect of NT on DAergic neurons. Because NTS1 is expressed at high level in DAergic neurons, we hypothesized that most of the effects of NT observed in our experiments should be mediated by this receptor. Compatible with this hypothesis, SR48692 ($1 \mu\text{M}$), an

antagonist that preferentially blocks NTS1, abrogated the enhancement in firing rate caused by 100 nM NT in DAergic neurons ($n = 8$; t test; $t = 3.25$; $p > 0.05$) (Fig. 3A). This antagonist also blocked the increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by NT in most neurons, indicating that most of the $[Ca^{2+}]_i$ elevation is mediated by NTS1 (Fig. 3B). Although all of the 15 neurons tested showed an increase $[Ca^{2+}]_i$ in response to NT under control conditions, only 4 of 13 showed an increase above criterion level (see Materials and Methods) in the presence of SR48692 (Fig. 3B). SR142948A (100 nM), a nonselective NTS1 and NTS2 antagonist, also abolished the effect of NT on $[Ca^{2+}]_i$ increase (2 responsive neurons out of 17 tested) (Fig. 3B). The average increase in $[Ca^{2+}]_i$ across all neurons tested in the presence of SR48692 or SR142948A was also significantly smaller than in control neurons (0.02 ± 0.03 and 0.010 ± 0.005 F/Fo, respectively, compared with 0.24 ± 0.04 for the control group; one-way ANOVA, $F(2,42) = 19.52$, $p < 0.05$; pairwise comparisons; Tukey's test, $p < 0.05$). There was no significant difference between the rise in $[Ca^{2+}]_i$ induced by NT in the presence of the two antagonists (Tukey's test; $p < 0.05$).

Neurotensin-evoked excitation of DAergic neurons occurs independently of astrocyte activation

We reported previously that NT can induce a rise in $[Ca^{2+}]_i$ in astrocytes (Trudeau, 2000). Because $[Ca^{2+}]_i$ elevation can induce the release of excitatory messengers from astrocytes (Araque et al., 1998), we evaluated whether NT-evoked excitation of DAergic neurons requires astrocyte activation. We discovered in preliminary experiments that purified astrocytes grown in flasks only rarely respond to NT by an increase in $[Ca^{2+}]_i$: only $4 \pm 2\%$ of astrocytes show a detectable response (Fig. 4A). However, in primary cultures of mesencephalic astrocytes, a response to NT can be detected in $39 \pm 4\%$ of astrocytes (Fig. 4A). The response of neurons to NT under conditions in which astrocytes are responsive or not to NT was thus compared. We found that NT increased the firing rate of DAergic neurons under both conditions (Fig. 4B). This finding demonstrates that activation of astrocytes is not required for excitation of DAergic neurons by NT. However, a quantitative

comparison of firing rate increases revealed that, when neurons are plated on responding astrocytes, there is a significantly greater increase in the firing rate in response to NT (two-way ANOVA; $F(1,240) = 5.108$; $p < 0.05$).

Intracellular pathway mediating the excitatory effect of NT

It is known that NTS1 is a Gq-coupled receptor and that it activates PLC (Yamada et al., 1994). This activation generates IP3 and DAG, which, respectively, lead to Ca^{2+} mobilization from intracellular pools and to the formation of PKC. Selective antagonists were used to evaluate the implication of IP3 and PKC in the excitatory effects of NT. Preincubation with the PKC inhibitor bisindolylmaleimide (1 μ M) did not prevent NT from significantly increasing the firing rate of DAergic neurons ($n = 8$; t test; $t = 2.47$; $p < 0.05$) (Fig. 5A). However, intra-pipette inclusion of heparin (1 mg/ml), an IP3 receptor antagonist, completely blocked the excitatory effect of NT ($n = 6$; t test; $t = 1.55$; $p > 0.05$) (Fig. 5B). We conclude that some step implicating the IP3 receptor is required for NTS1 to cause excitation of DAergic neurons.

Although a number of steps may be involved between IP3 receptor activation and excitability changes, it has been shown previously that NT can cause the opening of cationic channels in DAergic neurons. Considering recent findings suggesting direct links between the IP3 receptor and cationic channels of the TRP (transient receptor potential) family (Boulay et al., 1999; Kiselyov et al., 1999), we evaluated the implication of such channels using Zn^{2+} , an inorganic cation shown recently to block a subset of TRP channels in neurons (Kaneko et al., 2002). Compatible with the implication of cationic channels, ZnCl (10 μ M) completely antagonized the increase in cell firing induced by NT, actually revealing a small decrease in firing ($n = 6$; t test; $t = 2.77$; $p < 0.05$) (Fig. 5C). Moreover, SKF96365 (1 μ M), another broadly used blocker of cationic channels (Merritt et al., 1990), completely blocked the excitatory effect of NT ($n = 5$; t test; $t = 1.09$; $p < 0.05$) (Fig. 5D).

Discussion

Our results provide new insight into the mechanism mediating the well known excitatory effect of NT on DAergic neurons. We demonstrate that this effect is Ca^{2+} dependent and implicates IP_3 receptors and SKF96365 sensitive channels. Our selective transfection strategy coupled with immunohistochemical identification of DAergic neurons represents an advantage over previous studies of NT action in the VTA in which neurons were presumed to be DAergic solely on the basis of morphology and electrophysiological characteristics (Seutin et al., 1989; Jiang et al., 1994; Farkas et al., 1996; Werkman et al., 2000).

Effects of NT on intracellular calcium in DAergic neurons

DAergic neurons express NTS1 protein and mRNA (Nicot et al., 1995; Boudin et al., 1998). Considering the coupling of this receptor to PLC and IP_3 production (Bozou et al., 1989; Tanaka et al., 1990; Hermans et al., 1992), the hypothesis that its activation causes intracellular Ca^{2+} elevation in DAergic neurons is reasonable but was untested. Calcium mobilization by NT has been demonstrated previously in other cell types (Sato et al., 1991; Hermans et al., 1995; Schaeffer et al., 1995; Borges et al., 1996; Trudeau, 2000). The present experiments provide the first detailed characterization of NT-evoked intracellular Ca^{2+} increase in DAergic neurons. We conclude that NT-evoked intracellular Ca^{2+} elevation mostly results from extracellular Ca^{2+} influx. This may be considered surprising because of the predicted activation of IP_3 -dependent intracellular Ca^{2+} stores by NTS1 (Bozou et al., 1989; Tanaka et al., 1990; Hermans et al., 1992) (for review, see Vincent et al., 1999). However, NT-evoked intracellular Ca^{2+} elevation is blocked in Ca^{2+} -free saline, and the Ca^{2+} -ATPase blocker thapsigargin and the IP_3 receptor antagonist heparin only delayed NT-evoked Ca^{2+} elevation. It should be noted that our observation that heparin prevents NT-evoked enhancement in firing rate in DAergic neurons

demonstrates that activation of the IP₃ pathway by NT is nonetheless critical for this excitatory effect of NT.

One possible mechanism explaining NT-activated Ca²⁺ entry in DAergic neurons is that NT-evoked increase in firing leads to the opening of voltage-dependent Ca²⁺ channels. However, this possibility can be ruled out because TTX did not prevent NT-evoked elevation in [Ca²⁺]_i. In addition, there was a clear temporal discordance between NT-evoked enhancement in firing and intracellular Ca²⁺ elevation. We can conclude that other Ca²⁺ influx pathways, such as nonselective cationic channels, are likely to be involved. This hypothesis is consistent with the evidence showing that, in VTA DAergic neurons, NT activates cationic channels (Jiang et al., 1994; Wu et al., 1995; Farkas et al., 1996). Such channels are likely to be Ca²⁺ permeable and could mediate NT-evoked Ca²⁺ influx. In addition, the partial involvement of channels activated by intracellular Ca²⁺ store depletion cannot presently be excluded. However, our finding that thapsigargin and heparin do not prevent NT-evoked Ca²⁺ elevation shows that most Ca²⁺ influx is not dependent on Ca²⁺ store depletion. This finding contrasts with our previous demonstration in mesencephalic astrocytes in which NT-evoked activation of thapsigargin-sensitive stores was absolutely required to trigger secondary Ca²⁺ influx (Trudeau, 2000).

Mechanism mediating the excitatory effect of NT on DAergic neurons

We showed that NT increases the firing rate of DAergic neurons. This result confirms previous studies. Indeed, when injected into the ventral mesencephalon, NT increases the firing rate of DAergic neurons (Werkman et al., 2000) and extracellular dopamine in terminal regions (Kalivas and Duffy, 1990; Laitinen et al., 1990; Sotty et al., 1998). In the current experiments, although the average effect of NT was an increase in cell firing, some response heterogeneity was noted. Of the 10 neurons tested, 2 showed no change in their firing frequency in response to NT, and 1 showed a decrease. The significance of such variability is unclear, but it could result from differential expression of NT receptors. This would fit with our observation that NT receptor antagonists did not

completely block NT-evoked Ca^{2+} elevation in a few neurons. Previous work in brain slices also showed that SR48692 only produces a partial attenuation of NT-induced excitation in DAergic neurons (Nalivaiko et al., 1998). Our results suggest that, although NTS1 may play the major role in NT-evoked excitation of DAergic neurons, some other NT receptor subtype that displays lower sensitivity to SR48692 or SR142948A could also be partly involved and perhaps cause opposite changes in excitability. It should be noted, however, that no clear demonstration is yet available for the ability of NTS2 to mediate Ca^{2+} elevation. In fact, it has been shown recently that NT does not cause Ca^{2+} elevation in cultured cerebellar neurons, cells that express high levels of NTS2 but no NTS1 (Sarret et al., 2002). However, a paradoxical Ca^{2+} mobilization by SR48692 has been demonstrated in these neurons, as well as in Chinese hamster ovary cells transfected with NTS2 (Yamada et al., 1998). Although NTS2 is not expressed at high levels in DAergic neurons (Mazella et al., 1996), evidence for its presence in astrocytes has been provided (Boudin et al., 1998). This leaves open the possibility that NT could also act indirectly on DAergic neurons through astrocytes (Trudeau, 2000). However, our finding that NT-evoked excitation of DAergic neurons can occur under conditions in which astrocytes are unresponsive to NT excludes an obligatory role of astrocytes. Our observation that NT-evoked excitation of DAergic neurons is enhanced under conditions in which astrocytes respond to NT leaves open the possibility that simultaneous activation of NT receptors on neurons and astrocytes is synergistic.

Our results suggest that the excitatory effect of NT on DAergic neurons is mediated by the PLC- IP_3 pathway. Indeed, the blockade of NT-evoked firing by heparin demonstrates that activation of the IP_3 receptor is a required step. This is in agreement with previous work showing that heparin or BAPTA blocks NT-evoked cationic currents in acutely isolated DAergic neurons (Wu et al., 1995). The Ca^{2+} dependency of this excitatory effect and of cationic channel activation could result from the partial Ca^{2+} dependency of PLC (Billah et al., 1980; Lund et al., 2000). Calcium could also be required because of the involvement of Ca^{2+} -activated nonselective cationic conductances. Previous experiments

have revealed that NT increases the firing rate of DAergic neurons by activating nonselective cationic conductances (Seutin et al., 1989; Mercuri et al., 1993; Farkas et al., 1996). In addition to NT receptors, it is known that other Gq-coupled receptors can enhance Ca^{2+} -activated nonselective cationic conductances through an IP_3 - and Ca^{2+} -dependent signaling pathway (Wu and Wang, 1996; Congar et al., 1997; Lee et al., 1999).

Within the context of the possible involvement of Ca^{2+} -activated nonselective cationic conductances, it should be noted that there is partial temporal discordance between the NT-evoked increase in firing rate and calcium elevation (compare Fig. 1C with Fig. 2A). Together with our finding that BAPTA blocks NT-evoked firing, this observation demonstrates that Ca^{2+} elevation is necessary but not sufficient to promote firing. This argues against a simple mechanism whereby NT leads directly to activation of Ca^{2+} -activated cationic channels. If this were the case, one would expect firing rate increases to closely follow intracellular Ca^{2+} elevation. Our results suggest that Ca^{2+} does not act directly to cause an increase in excitability. Rather, our findings favor a more indirect hypothesis implicating, for example, the sequential activation of receptor-operated Ca^{2+} channels, followed by some Ca^{2+} -activated pathway leading to delayed enhancements in membrane excitability. Considering that NT can also inhibit potassium channels (Kirkpatrick and Bourque, 1995; Farkas et al., 1997), delayed inhibition of such channels appears like a possible mechanism.

The molecular identity of the receptor-operated cationic channels activated by NT in DAergic neurons remains to be established. A candidate family of channels is TRP nonselective cationic channels, first identified in *Drosophila* (Hardie and Minke, 1992) but recently showed to be widely expressed in mammalian neurons (Wes et al., 1995; Zhu et al., 1996; Boulay et al., 1997; Philipp et al., 1998). Such channels are highly permeable to Ca^{2+} and are activated through Gq-coupled receptors. Interestingly, it has been reported that TRP channels can be activated through the IP_3 receptor (Boulay et al., 1999; Ma et al., 2000). The expression of TRP channels in DAergic neurons has not yet been closely

examined, but preliminary immunocytochemical experiments have allowed us to determine that a number of TRP channels are present in cultured DAergic neurons (G. Fortin, F. J. Michel, F. St. Gelais, and L.-E. Trudeau, unpublished results). Our finding that Zn^{2+} and SKF96365 block NT-evoked enhancement in firing in DAergic neurons is compatible with the involvement of TRP-like channels because these agents have been known previously to block nonselective cationic conductances (Merritt et al., 1990; Denning et al., 1994; Guse et al., 1997). Zinc has been shown recently to block channels formed by TRP6 in neurons (Kaneko et al., 2002).

In summary, our findings provide a better understanding of the mechanism mediating the well known excitatory effect of NT on DAergic neurons. Future experiments will have to be directed toward explaining the delayed nature of NT-evoked firing rate increase. In addition, an investigation of the possible activation of TRP-like channels by NT may lead to a more complete understanding of the NT-evoked Ca^{2+} -influx pathway.

This work was funded by grants from the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and from the National Alliance for Research on Schizophrenia and Depression. M.L. was supported by a postdoctoral fellowship from NSERC. The plasmid (hDAT-6250EGFP) was kindly provided by Dr. Michael Bannon (Faculty of Medicine, Wayne State University, Detroit, MI). The NT receptor antagonists were kindly provided by Dr. Danièle Gully (Sanofi-Synthélabo, Paris, France). We thank Marie-Josée Bourque and Isabel Jutras for preparation of cell cultures.

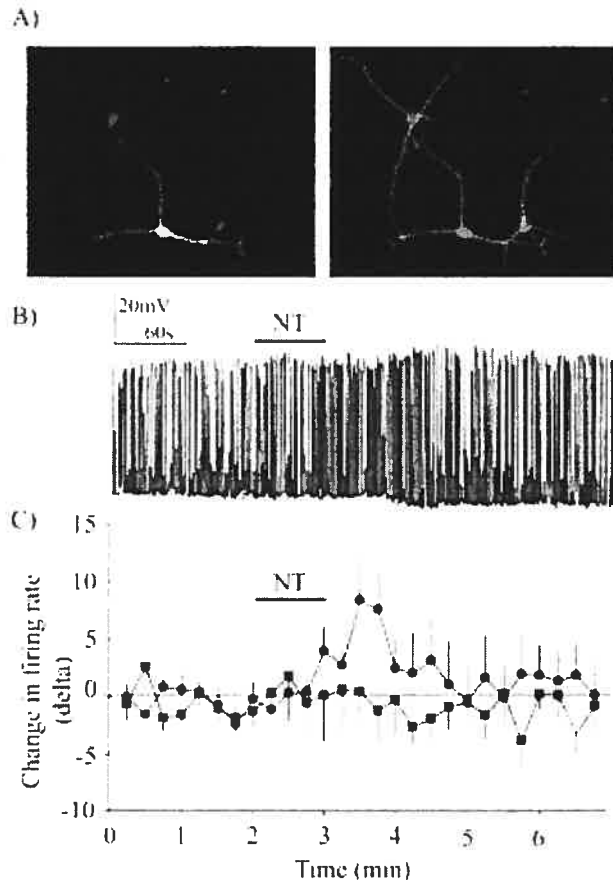


Figure 1. Neurotensin induces a Ca^{2+} -dependent increase in firing rate in DAergic neurons. A, DAergic neurons were identified before patch-clamp recording using a selective transfection strategy allowing the expression of GFP under the control of the dopamine transporter promoter (green neuron; left image). The phenotype of recorded neurons was always confirmed after patch-clamp recording or Ca^{2+} imaging by detecting TH immunoreactivity (red signal; right image). Note that the field contained three DAergic neurons, but that only one was transfected with GFP. Scale bar, 15 μm . B, Whole-cell current-clamp recording of spontaneous action potentials in a DAergic neuron. Perfusion of 100 nM NT for 1 min (black bar) caused a delayed increase in firing rate. Basal firing rate was, on average, 1.05 ± 0.05 Hz in control condition and 1.6 ± 0.2 Hz in the presence of

neurotensin. C. Summary data showing the change in action potential firing rate caused by bath-applied NT in DAergic neurons under control conditions (black circles) or when the patch pipette contained BAPTA (black squares). The change in firing rate over time is expressed as a difference score (Δ) representing the variation in average firing rate within 15 sec bins compared with the average firing rate within the eight initial bins acquired before peptide application. Basal firing rate was, on average, 1.5 ± 0.1 Hz in the presence of BAPTA. For statistical comparisons, the average number of action potentials during the control period was compared with the average number of action potentials during the minute after the application of NT (in which the maximal effect was detected in experiments without BAPTA). There was a significant increase in firing in control experiments (t test; $t = 4.21$; $p < 0.05$) but not in experiments in which neurons were loaded with BAPTA (t test; $t = 0.20$; $p > 0.05$).

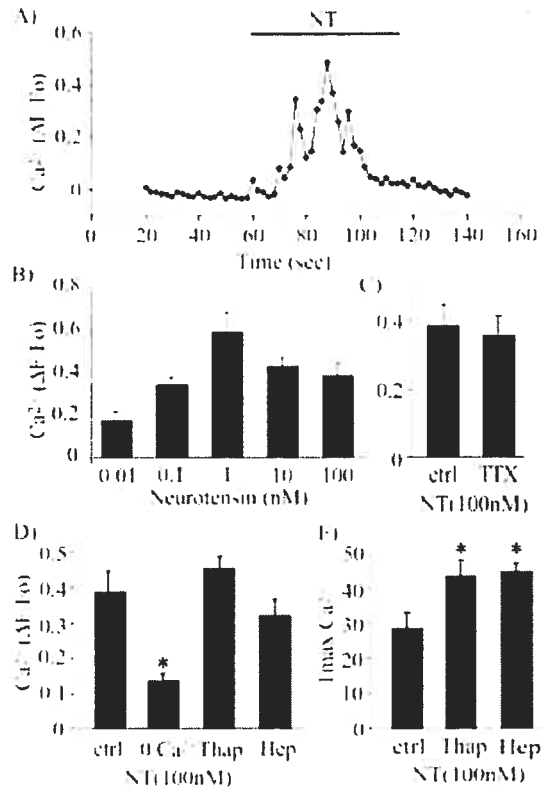


Figure 2. Neurotensin induces calcium influx in DAergic neurons. A, Typical time course of the rise in $[Ca^{2+}]_i$ in a DAergic neuron during a 1 min exposure to NT (100 nM). Intracellular Ca^{2+} concentration was estimated using Calcium Green-1 AM. Data are represented as the mean fluorescence ratio as a function of time (F/F_0). Images were acquired at a rate of 0.5 Hz. B, Dose-response effect of NT on $[Ca^{2+}]_i$ for NT concentrations ranging from 0.01 to 100 nM (0.01 nM, $n = 3$; 0.1 nM, $n = 12$; 1 nM, $n = 11$; 10 nM, $n = 9$; 100 nM, $n = 13$). Each bar represents the mean \pm SEM value. C, The effect of NT on $[Ca^{2+}]_i$ persists in the presence of TTX. D, NT-evoked intracellular Ca^{2+} elevation in DAergic neurons is mostly blocked in the absence of extracellular Ca^{2+} (0 Ca^{2+}) but is maintained after treatment with thapsigargin (Thap) to deplete intracellular Ca^{2+} stores or after blockade of IP3 receptors with heparin (Hep). E, Thapsigargin and heparin cause a delay in the time-to-peak (T_{max}) of NT-evoked intracellular Ca^{2+} elevation. Ctrl, Control.

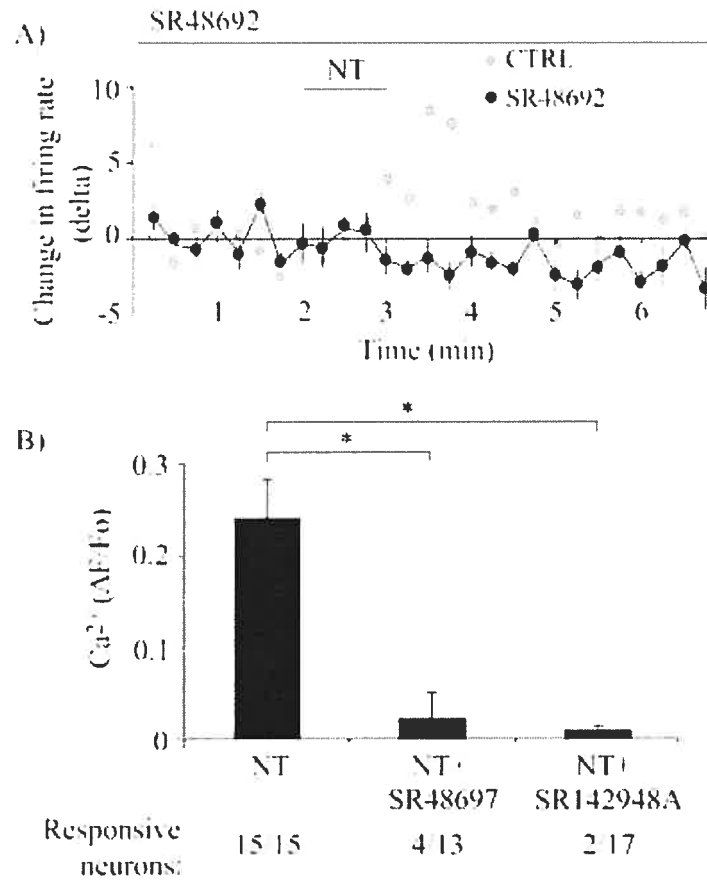


Figure 3. The effect of NT on firing rate is mediated by the NTS1 receptor. A, SR48692 (1 μ M), an NTS1 receptor antagonist, blocked the effect of NT (100 nM) on the firing rate of DAergic neurons (black circles). The response of the control group (CTRL) (from Fig. 1C) is shown for comparison (gray circles). Basal firing rate in the presence of SR48692 was, on average, 0.6 ± 0.1 Hz. B, The elevation in $[Ca^{2+}]_i$ induced by NT was also blocked by SR48692 and by SR142948A, a broader-spectrum NT receptor antagonist. The number of neurons responding to NT as a function of the total number of neurons tested is indicated below each column (Responsive neurons).

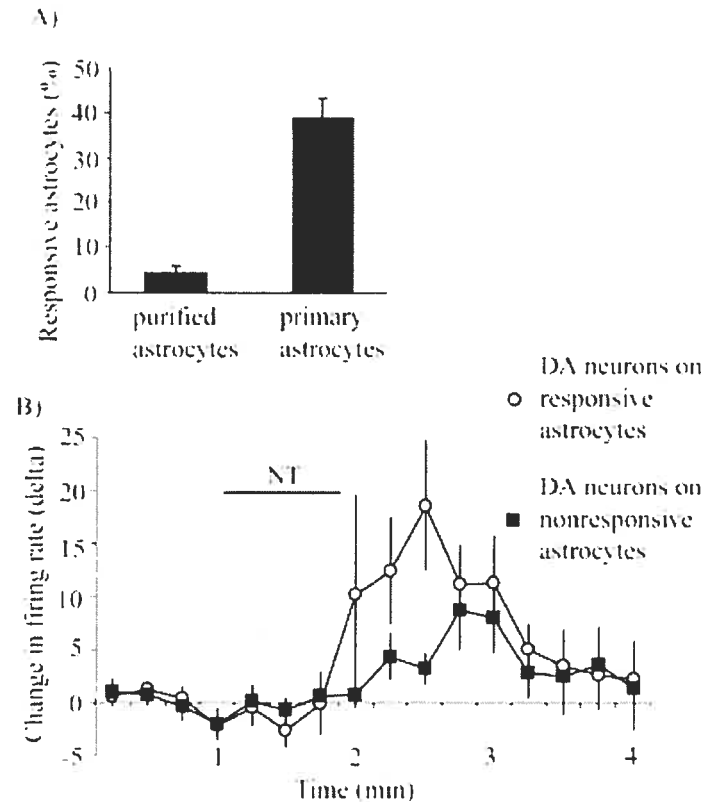


Figure 4. Neurotensin-evoked excitation of DAergic neurons occurs independently of astrocyte activation. A, Graph representing the proportion of astrocytes that demonstrate an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in response to NT (100 nM). Whereas a response was obtained in a significant proportion of primary mesencephalic astrocytes in culture, this was almost never observed in purified astrocyte cultures initially grown in flasks. B, Comparison of the NT-evoked enhancement in firing rate in DAergic neurons when grown together with responsive (open circles) ($n = 7$) or nonresponsive (dark squares) astrocytes ($n = 10$). The time course of the change in firing rate over time is expressed as a difference score (delta) representing the variation in average firing rate within 15 sec bins compared with the average firing rate within the eight initial bins acquired before peptide application. Basal firing rate was, on average, 0.40 ± 0.05 Hz in neurons grown on responsive astrocytes and 1.05 ± 0.05 in neurons grown on nonresponsive astrocytes. NT was used at 100 nM.

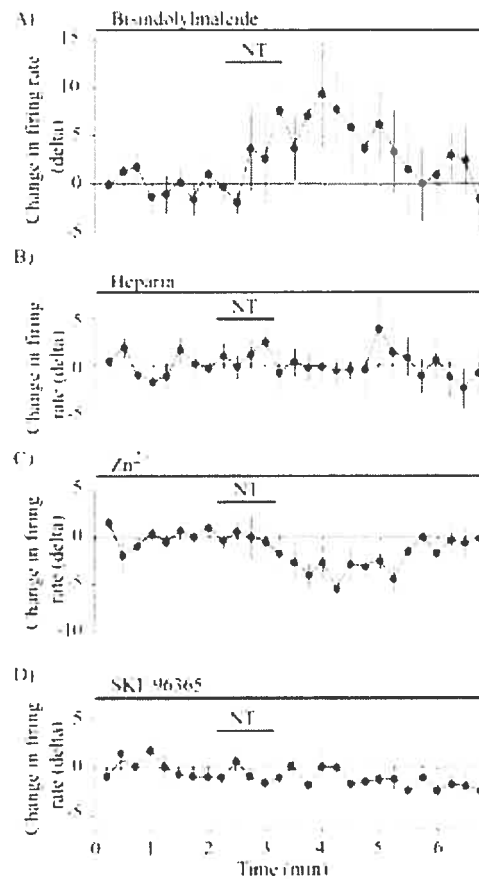


Figure 5. NT-evoked increase in firing rate requires IP₃ receptors and cationic channels. A, Lack of effect of the PKC inhibitor bisindolylmaleimide on NT-evoked change in firing rate over time. Basal firing rate was, on average, 1.2 ± 0.1 Hz. B, Intra-pipette dialysis of the IP₃ receptor antagonist heparin blocked the ability of NT (100 nM) to enhance firing rate. Basal firing rate was, on average, 0.75 ± 0.05 Hz. C, Extracellular Zn²⁺ (10 μ M), a blocker of nonselective cationic channels, prevented NT(8-13)-evoked enhancement in firing rate in DAergic neurons. Basal firing rate was, on average, 0.7 ± 0.1 Hz. D, Extracellular SKF96365 (1 μ M), a different blocker of nonselective cationic channels, also prevented NT(8-13)-evoked enhancement in firing rate in DAergic neurons. Basal firing rate was, on average, 0.6 ± 0.2 Hz.

References

- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG (1998) Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18: 6822-6829.
- Billah MM, Lapetina EG, Cuatrecasas P (1980) Phospholipase A2 and phospholipase C activities of platelets. Differential substrate specificity, Ca^{2+} requirement, pH dependence, and cellular localization. *J Biol Chem* 255: 10227-10231.
- Borges S, Gleason E, Frerking M, Wilson M (1996) Neurotensin induces calcium oscillations in cultured amacrine cells. *Vis Neurosci* 13: 311-318.
- Boudin H, Pelaprat D, Rostene 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.
- Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem* 272: 29672-29680.
- Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang M, Dietrich A, Zhu MX, Chen Z, Birnbaumer M, Mikoshiba K, Birnbaumer L (1999) Modulation of Ca^{2+} entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5- trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca^{2+} entry. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14955-14960.
- Bourque MJ, Trudeau LE (2000) GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. *Eur J Neurosci* 12: 3172-3180.

- Bozou JC, Rochet N, Magnaldo I, Vincent JP, Kitabgi P (1989) Neurotensin stimulates inositol trisphosphate-mediated calcium mobilization but not protein kinase C activation in HT29 cells. Involvement of a G-protein. *Biochem J* 264: 871-878.
- Cador M, Rivet JM, Kelley AE, Le Moal M, Stinus L (1989) Substance P, neurotensin and enkephalin injections into the ventral tegmental area: comparative study on dopamine turnover in several forebrain structures. *Brain Res* 486: 357-363.
- Cardozo DL (1993) Midbrain dopaminergic neurons from postnatal rat in long-term primary culture. *Neuroscience* 56: 409-421.
- Chabry J, Labbe-Jullie C, Gully D, Kitabgi P, Vincent JP, Mazella J (1994) Stable expression of the cloned rat brain neurotensin receptor into fibroblasts: binding properties, photoaffinity labeling, transduction mechanisms, and internalization. *J Neurochem* 63: 19-27.
- Congar P, Leinekugel X, Ben-Ari Y, Crepel V (1997) A long-lasting calcium-activated nonselective cationic current is generated by synaptic stimulation or exogenous activation of group I metabotropic glutamate receptors in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 17: 5366-5379.
- Congar P, Bergevin A, Trudeau LE (2002) D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K⁺ channels. *J Neurophysiol* 87: 1046-1056.
- Dana C, Pelaprat D, Vial M, Brouard A, Lhiaubet AM, Rostene W (1991) Characterization of neurotensin binding sites on rat mesencephalic cells in primary culture. *Brain Res Dev Brain Res* 61: 259-264.

- Denning GM, Clark RA, Welsh MJ (1994) cAMP and inositol 1,4,5-trisphosphate increase Ca^{2+} in HT-29 cells by activating different Ca^{2+} influx pathways. *Am J Physiol* 267: C776-C783.
- Faggin BM, Zubieta JK, Rezvani AH, Cubeddu LX (1990) Neurotensin-induced dopamine release in vivo and in vitro from substantia nigra and nucleus caudate. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 817-825.
- 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.
- Govoni S, Hong JS, Yang HY, Costa E (1980) Increase of neurotensin content elicited by neuroleptics in nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 215: 413-417.
- Grace AA, Onn SP (1989) Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci* 9: 3463-3481.
- Grisshammer R, Hermans E (2001) Functional coupling with Galpha(q) and Galpha(i1) protein subunits promotes high-affinity agonist binding to the neurotensin receptor NTS- 1 expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 493: 101-105.
- Guse AH, de Wit C, Klokow T, Schweitzer K, Mayr GW (1997) Unique properties of the capacitative Ca^{2+} -entry antagonist LU 52396: its inhibitory activity depends on the activation state of the cells. *Cell Calcium* 22: 91-97.

- Hardie RC, Minke B (1992) The *trp* gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8: 643-651.
- Hausser M, Stuart G, Racca C, Sakmann B (1995) Axonal initiation and active dendritic propagation of action potentials in substantia nigra neurons. *Neuron* 15: 637-647.
- Heaulme M, Leyris R, Le Fur G, Soubrie P (1997) Involvement of potentially distinct neurotensin receptors in neurotensin-induced stimulation of striatal. *Neuropharmacology* 36: 1447-1454.
- 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. *Brain Res Mol Brain Res* 15: 332-338.
- Hermans E, Gailly P, Gillis JM, Octave JN, Maloteaux JM (1995) Lack of rapid desensitization of Ca²⁺ responses in transfected CHO cells expressing the rat neurotensin receptor despite agonist-induced internalization. *J Neurochem* 64: 2518-2525.
- 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 Schmiedebergs 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, 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.
- Kaneko S, Higuchi S, Kawakami S, Kume T, Akaike A, Satoh M, Mori Y (2002) Expression and function of TRP channels in cultured cerebral cortical neurons from fetal rat. *Soc Neurosci Abstr* 28: 341.9.
- Kinkead B, Shahid S, Owens MJ, Nemeroff CB (2000) 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.
- Kirkpatrick K, Bourque CW (1995) Effects of neurotensin on rat supraoptic nucleus neurones in vitro. *J Physiol (Lond)* 482: 373-381.
- Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX, Muallem S (1999) The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell* 4: 423-429.
- Laitinen K, Crawley JN, Mefford IN, De Witte P (1990) Neurotensin and cholecystokinin microinjected into the ventral tegmental area modulate microdialysate concentrations of dopamine and metabolites in the posterior nucleus accumbens. *Brain Res* 523: 342-346.
- Lee K, Dixon AK, Gonzalez I, Stevens EB, McNulty S, Oles R, Richardson PJ, Pinnock RD, Singh L (1999) Bombesin-like peptides depolarize rat hippocampal interneurons through interaction with subtype 2 bombesin receptors. *J Physiol (Lond)* 518: 791-802.
- Legault M, Congar P, Michel FJ, Trudeau LE (2002) Presynaptic action of neurotensin on cultured ventral tegmental area dopaminergic neurones. *Neuroscience* 111: 177-187.

- Li AH, Hwang HM, Tan PP, Wu T, Wang HL (2001a) Neurotensin excites periaqueductal gray neurons projecting to the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 85: 1479-1488.
- Li AH, Yeh TH, Tan PP, Hwang HM, Wang HL (2001b) Neurotensin excitation of serotonergic neurons in the rat nucleus raphe magnus: ionic and molecular mechanisms. *Neuropharmacology* 40: 1073-1083.
- Lund PE, Shariatmadari R, Uustare A, Detheux M, Parmentier M, Kukkonen JP, Akerman KE (2000) The orexin OX1 receptor activates a novel Ca^{2+} influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *J Biol Chem* 275: 30806-30812.
- Ma HT, Patterson RL, van Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K, Gill DL (2000) Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Science* 287: 1647-1651.
- Martin S, Botto JM, Vincent JP, Mazella J (1999) Pivotal role of an aspartate residue in sodium sensitivity and coupling to G proteins of neurotensin receptors. *Mol Pharmacol* 55: 210-215.
- Mazella J, Botto JM, Guillemare E, Coppola T, Sarret P, 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.
- Mercuri NB, Stratta F, Calabresi P, Bernardi G (1993) Neurotensin induces an inward current in rat mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci Lett* 153: 192-196.
- Merritt JE, Armstrong WP, Benham CD, Hallam TJ, Jacob R, Jaxa-Chamiec A, Leigh BK, McCarthy SA, Moores KE, Rink TJ (1990) SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem J* 271: 515-522.

- Michel FJ, Trudeau LE (2000) Clozapine inhibits synaptic transmission at GABAergic synapses established by ventral tegmental area neurones in culture. *Neuropharmacology* 39: 1536-1543.
- Nalivaiko E, Michaud JC, Soubrie P, Le Fur G (1998) Electrophysiological evidence for putative subtypes of neurotensin receptors in guinea-pig mesencephalic dopaminergic neurons. *Neuroscience* 86: 799-811.
- Nicot A, Rostene W, Berod A (1995) Differential expression of neurotensin receptor mRNA in the dopaminergic cell groups of the rat diencephalon and mesencephalon. *J Neurosci Res* 40: 667-674.
- Nouel D, Sarret P, Vincent JP, Mazella J, Beaudet A (1999) Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors. *Neuroscience* 94: 1189-1197.
- Palacios JM, Kuhar MJ (1981) Neurotensin receptors are located on dopamine-containing neurones in rat midbrain. *Nature* 294: 587-589.
- Philipp S, Hambrecht J, Braslavski L, Schroth G, Freichel M, Murakami M, Cavalie A, Flockerzi V (1998) A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J* 17: 4274-4282.
- Pinnock RD (1985) Neurotensin depolarizes substantia nigra dopamine neurones. *Brain Res* 338: 151-154.
- Romppe PP, Bauco P, Gratton A (1992) Facilitation of brain stimulation reward by mesencephalic injections of neurotensin-(1-13). *Eur J Pharmacol* 211: 295-303.
- Sarret P, Gendron L, Kilian P, Nguyen HM, Gallo-Payet N, Payet MD, Beaudet A (2002) Pharmacology and functional properties of NTS2 neurotensin receptors in cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 277: 36233-36243.

- Sato M, Shiosaka S, Tohyama M (1991) Neurotensin and neuromedin N elevate the cytosolic calcium concentration via transiently appearing neurotensin binding sites in cultured rat cortex cells. *Brain Res Dev Brain Res* 58: 97-103.
- Schaeffer P, Laplace MC, Savi P, Pflieger AM, Gully D, Herbert JM (1995) Human umbilical vein endothelial cells express high affinity neurotensin receptors coupled to intracellular calcium release. *J Biol Chem* 270: 3409-3413.
- 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.
- Sotty F, Souliere F, Brun P, Chouvet G, Steinberg R, Soubrie 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.
- Stowe ZN, Nemeroff CB (1991) The electrophysiological actions of neurotensin in the central nervous system. *Life Sci* 49: 987-1002.
- Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* 18: 4588-4602.
- 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.
- 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.
- Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P (1999) Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 20: 302-309.
- Wang HL, Wu T (1996) G alpha q/11 mediates neurotensin excitation of substantia nigra dopaminergic neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 36: 29-36.
- 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.
- Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C (1995) TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9652-9656.
- Wu T, Wang HL (1996) The excitatory effect of cholecystinin on rat neostriatal neurons: ionic and molecular mechanisms. *Eur J Pharmacol* 307: 125-132.
- Wu T, Li A, Wang HL (1995) Neurotensin increases the cationic conductance of rat substantia nigra dopaminergic neurons through the inositol 1,4,5-trisphosphate-calcium pathway. *Brain Res* 683: 242-250.
- Yamada M, Yamada M, Watson MA, Richelson E (1994) Deletion mutation in the putative third intracellular loop of the rat neurotensin receptor abolishes polyphosphoinositide hydrolysis but not cyclic AMP formation in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol* 46: 470-476.

Yamada M, Yamada M, Lombet A, Forgez P, Rostene W (1998) Distinct functional characteristics of levocabastine sensitive rat neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Life Sci* 62: PL375-PL380.

Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1996) trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell* 85: 661-671.

ARTICLE 2

Neurotensin Inhibits the Function of the D2 Autoreceptor by a PKC-Dependent Mechanism

Fannie St-Gelais^{1,3}; Jean-Claude Lacaille^{2,3} and Louis-Eric Trudeau^{1,3}

¹Department of pharmacology, ²Department of physiology, ³Center for Research in Neurological Sciences, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Soumis à *Journal of Neurophysiology*, 2006.

Abstract

The peptide neurotensin (NT) interacts in numerous ways with dopaminergic (DAergic) neurons of the ventral mesencephalon. Among these, it has been shown that NT can inhibit the function of the dopamine (DA) D2 receptor. To further elucidate the mechanism of interaction between NT and D2 receptors, we recorded from rat ventral tegmental area (VTA) DAergic neurons using the patch clamp technique in horizontal brain slices. Quinpirole (100 nM), a D2 receptor agonist, greatly inhibited the firing rate of DAergic neurons ($90.3 \pm 6.6\%$). Applied alone, NT had an excitatory effect and increased firing rate via a receptor sensitive to the broad-spectrum antagonist SR142948A. Applied prior to quinpirole, NT strongly reduced the inhibitory action of quinpirole on firing rate. Furthermore, this effect could be obtained at concentrations of NT (1 and 10 nM) that produced little if any excitatory action. NT thus induced some form of heterologous desensitization of D2 receptor function. This interaction was completely blocked by the NTS1 receptor antagonist SR48692. It was also receptor-specific since GABA_B receptor function was not inhibited by NT. Considering the coupling of NTS1 to G-proteins of the Gq sub-type and to PKC, we next investigated the role of this kinase. We found that the PKC activator PMA mimicked the effect of NT and that two PKC blockers, BIS1 and PKC19-36, introduced through the patch pipette, blocked the NT-D2 interaction. Together our data suggest that activation of PKC via NTS1 is required for the functional interaction between NT and D2 receptors.

Key words: neurotensin, dopamine D2 receptor, midbrain, patch clamp, PKC

Introduction

Neurotensin (NT) is a peptide tightly associated with the DAergic system. In addition to being innervated by a dense plexus of NT-containing fibers (Zahm et al. 2001; Jennes et al. 1982), midbrain DAergic neurons also express NT receptors and synthesize NT (Palacios and Kuhar 1981; Bean et al. 1989). The regulation of DAergic neurons by NT has attracted much interest due to the potential role of this neuropeptide in DA-related pathological conditions such as schizophrenia, as well as in physiological functions like nociception and hypothermia (for review see Kinkead and Nemeroff 2002; St-Gelais et al. 2006).

The effects of NT are known to be mediated by at least three types of receptors NTS1, NTS2 and NTS3. The first two are G-protein coupled receptors (Mazella et al. 1996; Tanaka et al. 1990; Chalon et al. 1996; Vita et al. 1993), while NTS3 is a single transmembrane domain protein (Mazella et al. 1998). Actions mediated by NTS1 or NTS2 can be discriminated with SR48692, an antagonist specific for NTS1, while SR14298A is a broader-spectrum antagonist that blocks both receptors subtypes (Nalivaiko et al. 1998; Dubuc et al. 1994; Gully et al. 1993). DAergic neurons express NTS1 and NTS2 receptors that can modulate several physiological effects (Szigethy and Beaudet 1989; Lepeu-Lorgeoux et al. 1999).

One of the better-known actions of NT on DAergic neurons is a depolarizing effect associated with an increase in firing rate (Seutin et al. 1989; Pinnock 1985). NT is also known to enhance DA release in the striatum, nucleus accumbens and prefrontal cortex by acting on terminal receptors (Sotty et al. 2000; Leonetti et al. 2002). In addition to these electrophysiological effects, NT has many intracellular effects on DAergic neurons: activation of the phospholipase C (PLC) pathway leading to activation of PKC and production of IP3 (Hermans et al. 1992), intracellular calcium mobilization (St-Gelais et al.

2004), activation of cationic currents (Jiang et al. 1994; Mercuri et al. 1993; St-Gelais et al., 2004) and inhibition of potassium currents (Wang and Wu 1996).

In addition to such direct effects, NT is known to modulate the function of the dopamine D2 autoreceptor. Binding studies have previously shown that NT can cause a small reduction of the affinity of the D2 receptor for DA (Diaz-Cabiale et al. 2002; von Euler et al. 1989; Fuxe et al. 1992; Tanganelli et al. 1993; Li et al. 1995). Such regulation could have a major physiological impact. Compatible with this, (Werkman et al. 2000) showed that NT strongly decreases the inhibitory effect of D2 agonists on the firing rate of DAergic neurons in a mesencephalic slice preparation.

In the present study we investigated the mechanism by which NT affects D2 autoreceptor function. Using electrophysiological recordings in a VTA slice preparation, we show that NT reduces D2 receptor function through NTS1-mediated activation of PKC.

Materials and methods

Brain slices

In order to prepare midbrain slices, a Sprague-Dawley rat (P14-P25) was anesthetized with halothane (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada) and sacrificed by decapitation. The brain was then quickly removed and placed in a sucrose solution gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ at 4°C. The sucrose solution contained (in mM): sucrose (250), KCl (2), MgCl₂ (7), CaCl₂ (0.5), NaHPO₄ (1.2), glucose (11), NaHCO₃ (26), pH 7.35, 340-350 mOsm. Horizontal slices (250 µm) were then cut in cold sucrose solution with a Leica VT1000S vibratome (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). Immediately after cutting, each slice was transferred to a holding chamber containing artificial cerebrospinal fluid (ACSF) at room temperature which contained (in mM): NaCl (126), KCl (3.5), MgCl₂ (1.3), CaCl₂ (2), NaHPO₄ (1.2), glucose (11), NaHCO₃ (26), pH 7.35, 300 mOsm. Slices were incubated in this oxygenated ACSF for at least one hour before recording. A slice was then placed in a recording chamber which was continuously perfused with ACSF (2 ml/min) heated at 27°C. Recordings were initiated after an equilibration period of 20 min in the recording chamber.

Patch clamp recording

For patch clamp recordings, electrodes (4-5 MΩ) were pulled from borosilicate capillary tubes (outer diameter 1 mm, WPI, FL, USA) with a P-97 Flaming-Brown micropipette puller (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA). Electrodes were filled with an intrapipette solution containing (in mM): potassium methylsulfate (120), KCl (20), NaCl (5), EGTA (0.1), MgATP (2), GTP (Tris salt) (0.5), HEPES (10), phosphocreatine (10), pH 7.35, 300 mOsm. Biocytin (1%) was added to electrode solutions for post-hoc identification of the recorded neuron following immunocytochemistry.

Current-clamp recordings were performed on neurons using a MultiClamp amplifier and Axograph acquisition software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Drugs were applied using bath perfusion or directly placed in the pipette solution.

Immunohistochemistry

After each experiment an immunolabelling was performed in order to determine if the recorded neuron, previously loaded with 1% biocytin, was DAergic and to insure its localisation in the ventral mesencephalon. Briefly, slices were fixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde and then incubated for 24 hours at room temperature with a mouse monoclonal antibody directed against tyrosine hydroxylase (TH) (Sigma Chemicals, St.Louis, MO, USA). Slices were subsequently incubated for 2 hours with a fluorescent secondary antibody (1:500) (Alexa 546, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) to visualize the TH primary antibody. Thirty minutes before the end of this incubation, streptavidin-conjugated Alexa 488 (1:500) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was added to visualize biocytin. An epifluorescence microscope (Eclipse TE-200, Nikon, Montreal, Canada) was used to visualize labelled neurons in order to verify the colocalisation of biocytin and TH labelling and to localise the recorded neuron in the slice.

Drugs

Unless otherwise mentioned, all drugs and products were purchased from Sigma (St.Louis, MO). In all experiments, the 8-13 active fragment of NT, NT (8-13), was used as NT receptor agonist. NT receptors antagonists SR48692 and SR142948A were provided by Sanofi-Synthélabo (France). Levocabastine was obtained from the Janssen Research Foundation (Belgium).

Experimental procedure and data analysis

In order to evaluate the activity of neurons, we measured their spontaneous firing rate in current clamp mode. After rupturing the membrane, a control period (7-15 minutes)

was recorded and then quinpirole was applied for 3 minutes. Considering that only DAergic neurons in the VTA express somatodendritic D2 receptors and that electrophysiological criteria such as expression of a hyperpolarization-induced current (I_h) current or broad action potentials are not as reliable criteria to identify DAergic neurons (Jones and Kauer 1999; Margolis et al. 2003), we relied on a pharmacological criterion to select neurons for further analysis; only cells which presented an inhibition of at least 50 % of their firing rate in response to the D2 agonist quinpirole (100 nM) were kept for further experimentation and analysis. This criterion was also used because we wanted to measure a change in this inhibition so it was important to measure a clear inhibition in firing rate. After a first application of quinpirole and a wash period, the main experiment was performed. In experiments with NT, the peptide was pre-applied during 3 min, followed by 3 min of both NT and quinpirole, a washout period with NT alone (3 min) and a final washout period of at least 10 min with normal ACSF.

Firing rate was quantified in 30 s bins and presented as percentage of control, relative to the average of the control and washout periods (to account for any rundown). The control period was measured from the average firing rate during the 3 min preceding the application of quinpirole. For the effect of drugs, the 2 min period presenting the maximal effect within the 5 min following drug application was selected. Data were presented as mean \pm SEM and analyzed using paired t-tests on normalized data, as indicated. We normalized firing rate since the basal firing rate in the neurons we recorded was relatively variable. The mean basal firing rate among all the recorded neurons was 0.65 ± 0.05 Hz (n=96).

Results

Experiments were performed on rat horizontal VTA slices. DAergic neurons were identified based on their ability to show a robust inhibition in firing rate in response to quinpirole (100 nM), a selective D2 agonist. They were also systematically loaded with biocytin (Fig. 1A) to subsequently confirm localization in the VTA after immunocytochemistry (Fig. 1B). In horizontal slices the boundary between VTA and substantia nigra (SN) is not clearly defined. In our experiments, we considered neurons to be part of the VTA if they were located between the midline and the optic tract.

Effect of quinpirole and NT on the firing rate of DAergic neurons

Our initial objective was to evaluate the effect of NT on quinpirole-induced firing rate inhibition in DAergic neurons. We first evaluated the reproducibility of quinpirole's effect on cellular excitability. Patch-clamp recordings were obtained from DAergic neurons in current-clamp mode and firing rate was measured. As expected from autoreceptor activation, quinpirole (100 nM) robustly decreased firing rate by $90.3 \pm 6.6 \%$ (Fig. 2B). This response showed little if any acute desensitization since a second application of quinpirole induced a decrease in firing rate comparable to the first ($86.7 \pm 11.2 \%$, $n = 5$, t -test, $t = 0.57$, $p > 0.05$) (Fig. 2B). In parallel to the decrease in firing rate, quinpirole also hyperpolarized membrane potential. This effect was more variable, but on average, membrane potential was decreased by 7.2 ± 2.6 mV for the first application and by 3.8 ± 1.5 mV for the second (Fig. 2C). There was thus a tendency for the second response to be smaller, but this difference was not statistically significant (t -test; $t = 1.27$; $p > 0.05$).

The hyperpolarization caused by D2 autoreceptor activation is thought to be mediated by activation of G-protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels (Davila et al. 2003; Lacey et al. 1987; Lacey et al. 1988; Mercuri et al. 1992; Kim et al. 1995; Guatteo et al. 2004). However, whether this is sufficient to explain the decrease in

firing rate has not been established. We first tested barium (300 μ M), a blocker of GIRK channels. In the presence of barium, quinpirole failed to inhibit the firing rate of DAergic neurons (quinpirole alone: decrease of 74.7 ± 10.1 %, vs. quinpirole with barium: increase of 9.1 ± 21.0 %) ($n = 5$, t-test, $t = 2.99$, $p > 0.05$) (Fig. 2D). However, the GIRK1/4 channel blocker tertiapine failed to block the effect of quinpirole (quinpirole alone: decrease of 85.0 ± 6.9 %, vs. quinpirole with tertiapine: decrease of 85.2 ± 9.2 %, $n = 5$, t-test, $t = 0.02$, $p > 0.05$, data not shown). This is compatible with the idea that GIRK channel activation is sufficient to explain firing rate inhibition by quinpirole and that GIRK2 subtype channels, known to be expressed by DAergic neurons (Liao et al. 1996; Guatteo et al. 2000), are involved.

NT is known to have an excitatory effect on DAergic neurons. Although at 1 nM NT caused only a minimal enhancement in firing (22.9 ± 5.7 % increase) ($n = 6$; t-test, $t = 4.26$, $p < 0.05$), at 10 nM it caused a robust increase of 79.3 ± 18.9 % ($n = 5$; t-test, $t = 4.82$, $p < 0.05$) (Fig. 3B, 3D). When applied twice to the same neuron (with an interval of 10-20 min), the second application of NT again produced an increase in firing (34.8 ± 17.7 %, t-test, $t = 1.90$, $p > 0.05$), but which was significantly smaller than the first (t-test, $t = 3.45$, $p < 0.05$) (Fig. 3B), suggesting desensitization of the receptor mediating the excitatory effect. Depolarization of the membrane potential accompanied the excitatory effect of NT. The first application of NT (10 nM) induced an increase in membrane potential of 3.67 ± 1.5 mV while the second application produced a depolarization which was more variable and had a tendency to be smaller (1.3 ± 0.6 mV, t-test, $t = 2.27$; $p = 0.085$) (Fig. 3C). To evaluate the NT receptor subtype involved, we tested the effect of the NTS1 antagonist SR48692, the NTS2 ligand levocabastine and the broad-spectrum antagonist SR142948A on the excitatory effect of 10 nM NT. Both SR48692 (1 μ M) (86.3 ± 17.7 % increase, $n = 6$, t-test, $t = 4.34$, $p < 0.05$) and levocabastine (1 μ M) (52.4 ± 12.0 % increase, $n = 6$, t-test, $t = 3.93$, $p < 0.05$) failed to prevent the increase in firing rate. However, SR142948A at both 100 nM ($n = 5$, t-test, $t = 0.28$, $p > 0.05$) and 1 μ M ($n = 6$, t-test, $t = 0.55$, $p > 0.05$)

completely blocked the excitatory effect of NT (Fig. 3D). The NT receptors antagonists did not have any effect by themselves on the basal firing rate of dopaminergic neurons (SR48692: 91.0 ± 11.3 % of baseline, t-test, $t = 0.80$, $p > 0.05$; SR142948A 100 nM: 89.4 ± 22.1 % of baseline, t-test, $t = 0.58$, $p > 0.05$; SR142948A 1 μ M: 99.3 ± 10.4 % of baseline, t-test, $t = 0.07$, $p > 0.05$ and levocabastine: 122.5 ± 18.6 % of baseline, t-test, $t = 1.60$, $p > 0.05$).

NT reduces the quinpirole-induced decrease in firing rate

Pre-application of NT (10 nM) strongly reduced the inhibitory effect of the D2 receptor agonist quinpirole (100 nM) on firing rate (Fig 4A). In the presence of NT the effect of quinpirole (43.1 ± 18.3 % decrease) was significantly smaller than in its absence (78.8 ± 9.0 % decrease) ($n = 5$, t-test, $t = 3.13$, $p < 0.05$) (Fig 4B). A very similar effect was obtained with 1 nM NT (48.2 ± 11.3 % decrease in comparison to 83.3 ± 7.3 % in the absence of NT) ($n = 6$, t-test, $t = 4.47$, $p < 0.05$) (Fig 4C), a dose that by itself caused only a small increase in firing. This finding suggests that the excitatory effect of NT is independent of its ability to reduce D2 receptor function. In support of this hypothesis, we found that unlike the direct excitatory effect of NT, the ability of this peptide to inhibit D2 receptor function is blocked by the NTS1 antagonist SR48692 (Fig. 4D). In the presence of this antagonist together with NT, quinpirole inhibited firing by 90.8 ± 4.3 % in comparison to 94.9 ± 2.9 % when quinpirole was applied alone ($n = 6$, t-test, $t = 0.84$, $p > 0.05$).

Although our results are likely due to inhibition of D2 receptor function following NTS1 activation, an alternate possibility is that NTS1 signalling leads to inhibition of GIRK channel function. If this were the case, NT would also inhibit the functional effects of other activators of such channels. To evaluate this we next examined the effect of a GABA_B receptor agonist, another Gi-coupled GPCR. Pre-application of NT failed to reduce the ability of the GABA_B receptor agonist baclofen to inhibit the firing rate of DAergic neurons (Fig 4E). There was no difference between the inhibition induced by baclofen in

absence or in the presence of NT (1nM) (97.9 ± 1.8 % and 96.3 ± 2.8 % inhibition, respectively) ($n = 6$, t-test, $t = 1.32$, $p > 0.05$). This result suggests that the interaction between NTS1 and D₂ receptor is specific and not generalized to all Gi-coupled GPCRs.

Implication of PKC in the NTS1-D₂ receptor interaction

The best characterized intracellular signalling pathway activated by the NTS1 receptor is the PLC-PKC cascade. Considering the recent demonstration that a PKC phosphorylation site can contribute to heterologous desensitization of the D₂ receptor (Namkung and Sibley 2004) a logical hypothesis is that NTS1 inhibits D₂ receptor function through a PKC-dependent mechanism. To test for a role of PKC in this interaction, both a PKC activator and PKC inhibitors were tested. The PKC inhibitors bisindolylmaleide and PKC19-36, introduced in DAergic neurons through the patch pipette, blocked the ability of NT to reduce quinpirole-induced inhibition of firing (Fig 5A, 5B, 5C, 5E). There was indeed no significant difference in the inhibitory effect of quinpirole in the absence or presence of NT (1 nM): in the presence of BIS1, quinpirole decreased firing rate by 88.7 ± 8.6 % when applied alone and by 76.0 ± 15.3 % when co-applied with NT ($n = 5$, t-test, $t = 1.85$, $p > 0.05$). In the presence of the peptidic inhibitor PCK19-36 (1 μ M), quinpirole decreased firing rate by 82.9 ± 9.4 % when applied alone and by 75.1 ± 10.6 % when co-applied with NT ($n = 6$, t-test, $t = 0.89$, $p > 0.05$). However, the inhibitory effect of quinpirole was significantly smaller after pre-application of the PKC activator PMA (100 nM) (Fig 5D, 5E): quinpirole reduced firing rate by 84.5 ± 8.0 % when applied alone and by only 26.9 ± 8.1 % when applied in the presence of PMA ($n = 6$, t-test, $t = 3.69$; $p < 0.05$). The phorbol ester PMA thus essentially mimicked the ability of NT to reduce D₂ receptor function. Together these data suggest that activation of PKC is necessary for the interaction between NTS1 and D₂ receptors.

Contribution of D2R functional inhibition to the excitatory effect of NT

Although previous studies suggest that the excitatory effect of NT is mediated by inhibition of potassium currents and activation of cationic currents (Jiang et al., 1994; Farkas et al. 1996; Mercuri et al., 1993; St-Gelais et al., 2004), inhibition of D2 receptor function could in principle also contribute if there is some basal tone of D2 autoreceptor activation in the VTA. To test this, we evaluated the effect of the D2 receptor antagonist sulpiride. First, sulpiride, applied at a saturating concentration (10 μ M) caused a significant increase in firing rate (increase of 54.1 ± 19.3 %; $n=6$, t-test, $t = 2.81$, $p > 0.05$). This result argues for the existence of a basal tone of D2 receptor activation in our slice preparation. However, subsequent addition of NT (10 nM) still caused an enhancement in firing (increase of 45.3 ± 19.1 % above the firing rate in the presence of sulpiride; $n = 6$, t-test, $t = 2.46$, $p = 0.057$) (Fig 6). This suggests that although D2 receptor inhibition could contribute to NT-induced increase in firing rate in some neurons, this is not absolutely required for the excitatory effect of NT.

Discussion

Using a VTA brain slice preparation we investigated the mechanism mediating the interaction between NT and the DA D2 receptor. Although a functional interaction between these two transmitter systems had been previously described, the work presented here extends these earlier results in three ways. First, we provide a characterization of the signalling pathway implicated in this receptor interaction. Our main conclusion is that NT, through a NTS1-like receptor, reduces the ability of the D2 receptor to inhibit cell firing through a PKC-dependent mechanism. Second, we provide evidence for the selectivity of this regulation by showing that it is at least in part GPCR-selective in that it does not extend to the GABA_B receptor. Finally, we evaluated the contribution of the D2/NTS1 interaction to the excitatory effects of NT. We found that NT can excite DA neurons independently of this functional interaction.

In order to ensure the DAergic phenotype of the recorded neurons in our experiments, we only kept for further experimentation neurons that showed at least 50% inhibition of their firing rate in response to the D2 autoreceptor agonist quinpirole. A growing body of evidence suggests that traditional electrophysiological criteria such as the presence of an inwardly rectifying hyperpolarization-activated current (I_h), although more frequently observed in DAergic neurons, may not allow to fully discriminate between DAergic and non-DAergic neurons in the VTA (Jones et al., 1999; Margolis et al., 2003; Cameron et al. 1997). In the present study we also observed the presence of I_h currents in non-DAergic neurons (i.e. cells presenting negative immunolabeling for TH and which were not responsive to quinpirole) and the lack of clear I_h current in confirmed DAergic neurons, (data not shown). Considering this, we suggest that identification of DAergic neurons using pharmacological and/or immunolabelling criteria is more reliable to guaranty the phenotype of the recorded neuron.

Effect of NT and quinpirole on the excitability of DAergic neurons

Quinpirole decreased the spontaneous firing rate of DAergic neurons and hyperpolarised their membrane potential. This is in line with the standard effect of D2 autoreceptor activation. Previous studies made in cell lines transfected with the D2 receptor have suggested a role of GIRK-channels in the inhibitory effect of D2 receptor activation on cellular excitability (Pillai et al. 1998; Kuzhikandathil et al. 1998). Although previous work has conclusively determined that a GIRK-like current is activated in DAergic neurons by D2 receptor agonists, whether this is necessary and sufficient to mediate the decrease in firing rate had never been demonstrated. Here we used two GIRK-channels blockers, barium, a non selective GIRK blocker and tertiapin a more selective toxin known to block GIRK channel heteromultimers containing GIRK1 or GIRK4 (Jin and Lu 1998; Kitamura et al. 2000; Kanjhan et al. 2005), but with undetermined effects on GIRK2 homomers, such as found in DAergic neurons (Davila et a., 2003; Inanobe et al. 1999; Liss et al. 1999; Murer et al. 1997; Liao et a., 1996). Our results show that barium completely blocked the inhibitory effect of quinpirole while tertiapin had no effect. We conclude that activation of GIRK-like channels is required for the decrease in firing rate induced by quinpirole in DAergic neurons and that this is specifically due to activation of GIRK2 channels that are insensitive to tertiapin.

The excitatory effect of NT on DAergic neurons is well documented and known to be due to activation of non-selective cationic channels and inhibition of K⁺ channels (Jiang et a., 1994; Farkas et a., 1996; Seutin et a., 1989; Mercuri et a., 1993; St-Gelais et a., 2004). Whether D2 receptor inhibition also contributes to NT-mediated excitation had however not been previously evaluated. Here we found that sulpiride, a D2 receptor antagonist, caused by itself an increase in firing. However, this excitation was of a magnitude that was more modest than that induced by NT. More importantly, in the presence of sulpiride, NT still caused an increase in firing. We thus conclude that at least in our VTA slice preparation. D2 receptor inhibition is not required for the NT-induced excitation of

DAergic neurons. Our finding that the NTS1 receptor antagonist SR48692 prevents the D2/NTS1 interaction but does not prevent NT from causing an increase in firing also argues in favour of the idea that D2 receptor inhibition is not required for NT-induced excitation.

In addition to our finding that the excitatory effect of NT was not blocked or reduced by the preferential NTS1 receptor antagonist SR48692, we report that the NTS2 receptor agonist levocabastine fails to enhance firing or to change NT-induced responses. However, the broad-spectrum NT receptor antagonist SR142948A completely prevented the increase in the firing induced by NT. This result is in accordance with the work of Werkman et al. (2000) who showed that SR142948A completely blocked the excitatory effect of low concentrations of NT (1-30 nM). Our findings thus suggest that activation of NTS1 or NTS2 alone is insufficient to explain the excitatory effect of NT in our model. Although this is currently untested, one potential explanation is that excitation is mediated by activation of NTS1/NTS2 heterodimers in DAergic neurons. Such a dimer could potentially express a differential pharmacology such as a lower affinity for SR48692. Such influences of GPCR heterodimerization on pharmacological profile has been previously reported for other receptors (Jordan and Devi 1999; Terrillon and Bouvier 2004; Waldhoer et al. 2005). Further experiments will be required to test this hypothesis. Our finding of a lack of effect of SR48692 on NT-mediated excitation is also compatible with some previous results (Pinnock and Woodruff 1994) but not with others (St-Gelais et al., 2004). In a previous report using cultured DAergic neurons, we found that SR48692 effectively blocked the excitatory effect of NT (St-Gelais et al., 2004). This discrepancy suggests the possibility that in culture the relative abundance of NT receptor isoforms could be different than in vivo, perhaps leading to differential pharmacological profiles. Direct measurements of receptor or mRNA abundance would be required to evaluate this hypothesis.

Interaction between NT and D2 receptors

Our finding that NT strongly reduces the effect of a D2 receptor agonist on the firing of DAergic neurons is in accordance with previous results using different approaches or models. Indeed, previous work using extracellular recordings showed that NT attenuates the inhibition of firing rate induced by the D2 receptor agonist quinpirole and by dopamine itself (Nalivaiko et al., 1998; Werkman et al., 2000). Using combinations of *in vivo* recordings and microionophoretic techniques it was also possible to demonstrate that intracerebroventricular application of NT attenuates DA-induced inhibition of the firing rate of midbrain DAergic neurons (Shi and Bunney 1991; Shi and Bunney 1990). In addition to electrophysiological results, microdialysis data has been provided showing that following activation of NT receptors, a D2 receptor agonist does not lead to a reduction in extracellular DA levels in the striatum (Diaz-Cabiale et al., 2002). In addition, binding studies demonstrated that NT causes a small reduction of the affinity of the D2 receptor for its agonists (von Euler et al. 1991).

Here we showed that the interaction between NT and D2 receptors is mediated by NTS1 since it was blocked by SR48692. Consistent with this finding, Werkman et al. (2000) showed that the broad-spectrum antagonist SR142948A blocks the interaction between NT and D2 receptors and allows restoration of initial effect of D2 receptor agonist. It was also previously shown that SR48692 counteracted the ability of NT to reduce D2 receptor-mediated inhibition of DA levels in the striatum (Diaz-Cabiale et al., 2002).

The mechanism mediating the interaction between NT and D2 receptors had previously not been directly investigated. Here we used PKC blockers and activators to demonstrate that this kinase is required for this interaction. Indeed, blockade of PKC with either PKC19-36 or BIS1 blocked the ability of NT to inhibit D2 receptor function. In addition, activating PKC with PMA mimicked the effect of NT and reduced D2 receptor function. This finding is particularly interesting in the context of the recent demonstration

that the D2 receptor expresses PKC phosphorylation sites in its third intracellular loop, the activation of which leads to receptor desensitization (Namkung et al., 2004; Rogue et al. 1990). Further experiments will however be required to demonstrate that the D2 receptor is indeed directly phosphorylated by PKC after activation of NTS1. GIRK channels, the downstream effectors of the D2 mediating the inhibition of cell firing can also be a target for PKC (Mao et al. 2004; Sharon et al. 1997). However, our finding that NT fails to reduce GABA_B receptor-mediated inhibition of firing provide strong evidence that GIRK channels are not likely to be the target of NTS1 activation.

Since NT enhances the firing of DAergic neurons, another important question is whether the enhancement in firing is required for the NT-D2 interaction to occur. We found that NT is able to strongly reduce the ability of the D2 agonist quinpirole to inhibit firing even at a low concentration (1 nM) that induced only modest direct excitation. In addition, analysing together all experiments performed with 1 and 10 nM NT, we found no significant correlation between the ability of NT to elevate the firing frequency and its ability to reduce the effect of quinpirole on firing ($r = 0.36$, $p > 0.05$). Our results, consistent with those of Werkman et al. (2000), therefore show that the interaction is independent of NT-induced excitation.

In summary our work provides the first analysis of the mechanism mediating the functional interaction between NT and D2 receptors. We show that this interaction is independent of the ability of NT to excite DAergic neurons and that it depends on activation of PKC through a NTS1-like receptor. We propose that the ability of NTS1 to inhibit D2 receptor function could be one of the predominant physiological effects of NT *in vivo* when it is released at low physiological concentrations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by a grant from the Canadian Institutes of Health Research. Fannie St-Gelais was supported by a fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). We thank Marie-Josée Bourque for help with immunohistochemistry.

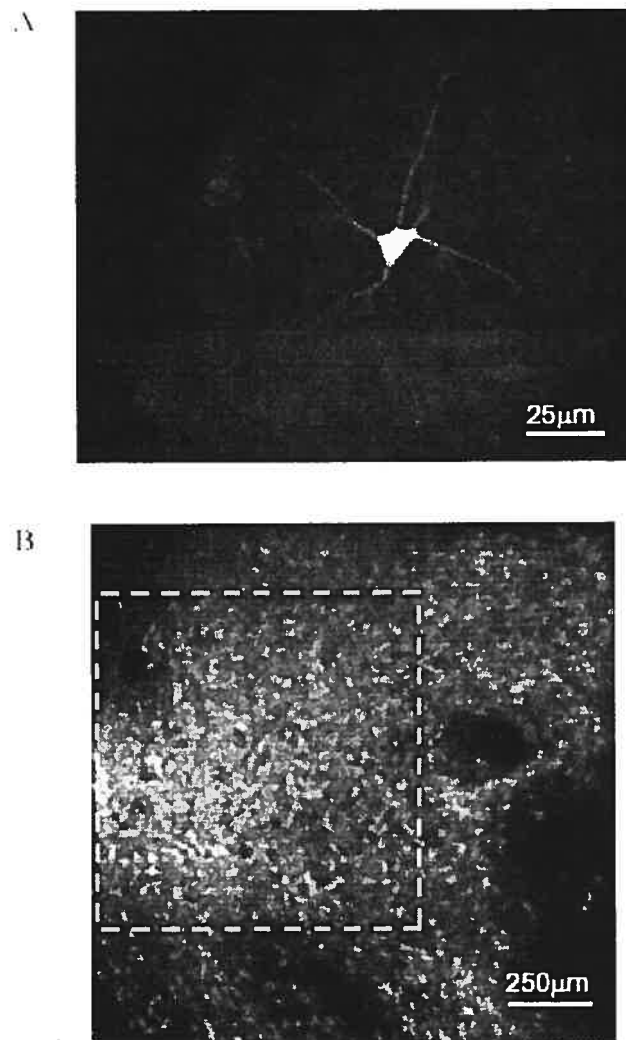


Figure 1. Identification of DAergic neurons in the VTA after recording

A) Recorded neurons were loaded during patch-clamp recordings through intra-pipette dialysis of biocytin. This label was visualized by post-recording staining using Alexa488-labelled streptavidin. **B)** TH immunolabelling of a mesencephalic hemi-slice showing both VTA and SN. Neurons located within region delimited by the grey dashed line were considered to be located in VTA.

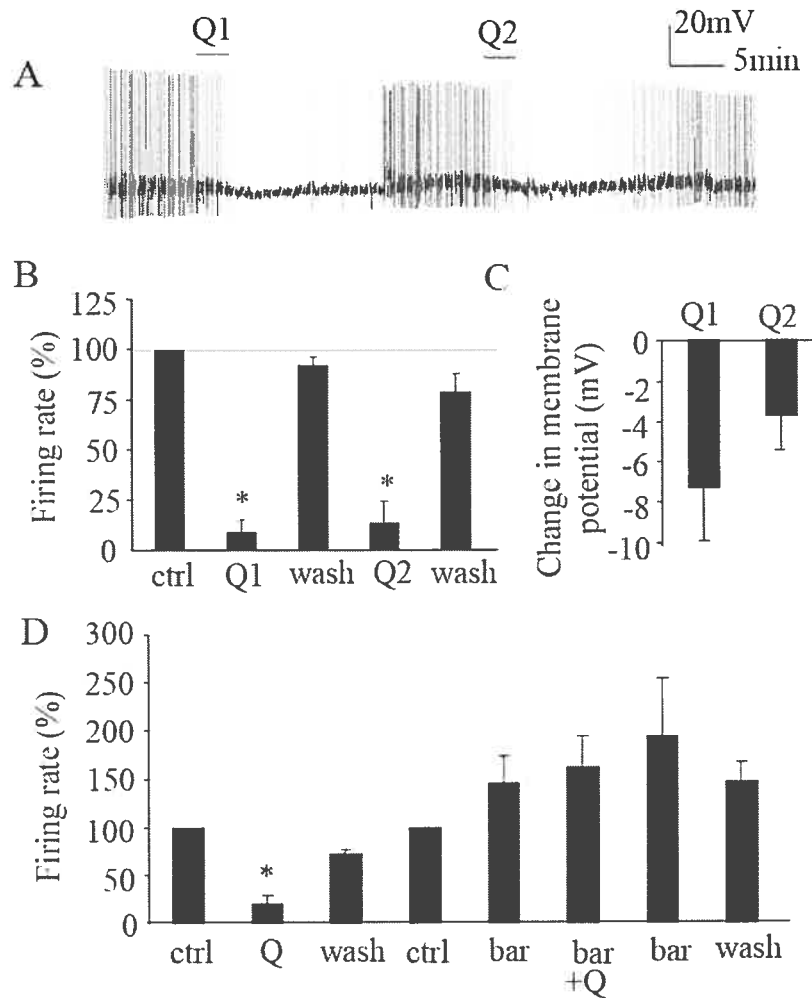


Figure 2. D2 receptor activation inhibits firing through activation of GIRK-like potassium channels.

A) Whole-cell current-clamp recording of spontaneous action potentials in a DAergic neuron showing the effect of two successive 3 min applications (Q1 and Q2) of quinpirole (100 nM). **B)** Histogram showing the average decrease in the firing rate of DAergic neurons in response to two consecutive applications of quinpirole. **C)** Graph representing the hyperpolarization (mV) induced by the two consecutive applications of quinpirole (Q1 and Q2). **D)** Summary diagram representing relative changes in firing rate. Note that extracellular barium (bar) (300 μ M) prevented the inhibitory effect of quinpirole (Q) (100

nM) on firing rate. The basal firing rate was, on average, 0.94 ± 0.26 Hz in control condition and 1.61 ± 0.77 Hz in the presence of barium.

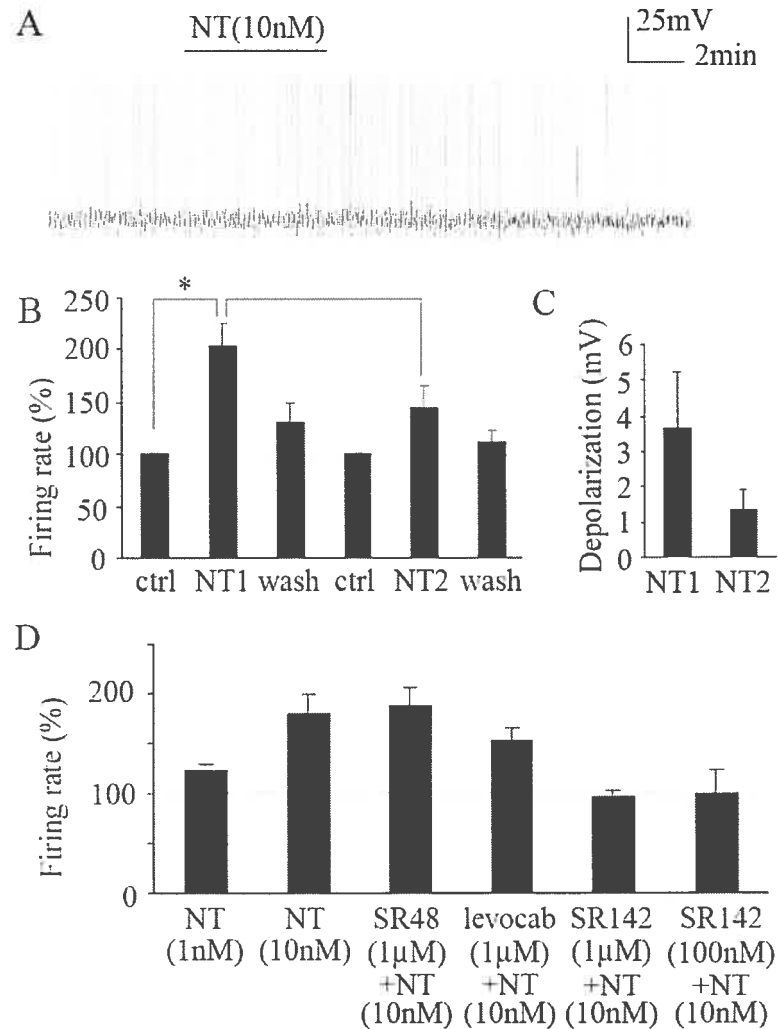


Figure 3. NT increases the firing rate of DAergic neurons

A) Whole-cell current-clamp recording of spontaneous action potentials in a DAergic neuron. Perfusion of 10 nM NT for 5 min (black bar) caused an increase in firing rate. **B)** Average time-course of the change in relative firing rate (%) in response to NT at 10 nM (triangles) or 1nM (circles). **C)** Histogram presenting the average change in relative firing rate in response to two successive applications of NT (10 nM). Note that the second response was smaller than the first. **D)** Histogram presenting the average change in

membrane potential in response to two successive applications of 10 nM NT (NT1 and NT2 on graph). E) Histogram presenting the relative change in firing rate in response to NT, alone or co-applied with SR48692 (1 μ M), levocabastine (1 μ M) or SR142948A (1 μ M and 100nM). Note that only SR142948A blocked the effect of NT. The basal firing rate, recorded prior to drug application was, on average, 0.63 ± 0.19 Hz in the experiments performed with 1 nM NT, 0.64 ± 0.06 Hz in the experiments performed with 10 nM NT, 0.52 ± 0.14 Hz in the experiments performed with SR48692, 0.59 ± 0.13 Hz in the experiments performed with levocabastine, 0.53 ± 0.06 Hz in the experiments performed with SR142948A (1 μ M) and 0.55 ± 0.16 Hz in the experiments performed with SR142948A (100nM).

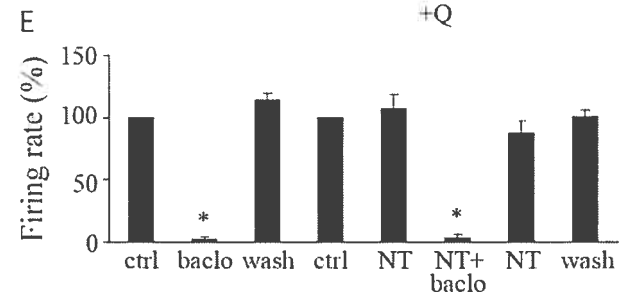
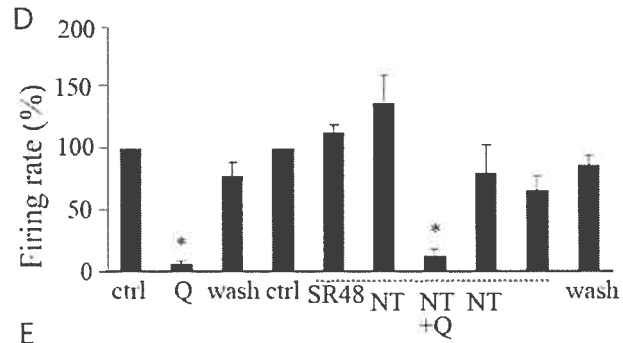
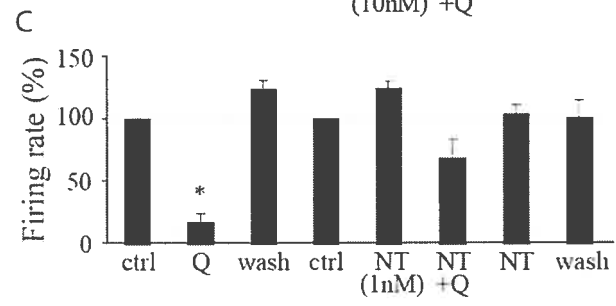
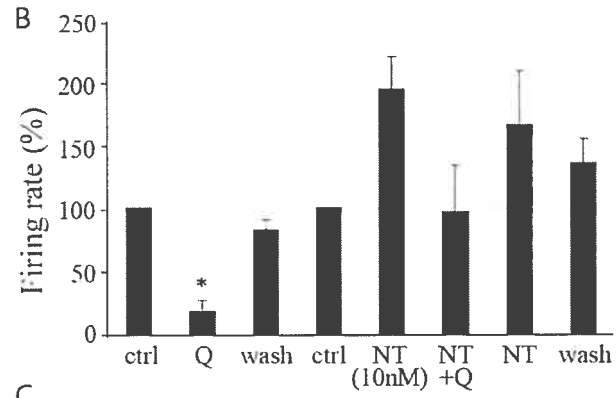
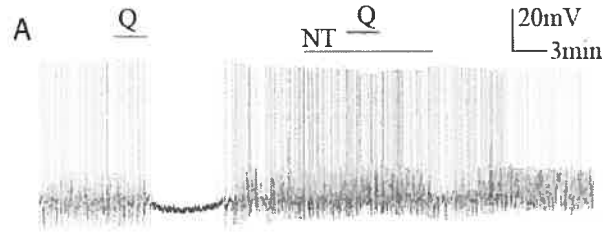


Figure 4. NT reduces the inhibitory effect of a D2 receptor agonist on firing rate

A) Representative recording from a DAergic neuron showing the response to the D2 agonist quinpirole (100nM) (Q) applied alone and then in the presence of NT (1 nM). Note that NT strongly reduced the effect of quinpirole. **B)** Summary diagram showing the change in relative firing rate of DAergic neurons in response to quinpirole alone (Q) or quinpirole in the presence of 10nM NT (NT+Q). Note that 10 nM NT strongly reduced the effect of quinpirole. **C)** Summary diagram showing the change in relative firing rate of DAergic neurons in response to quinpirole alone (Q) or quinpirole in the presence of 1nM NT (NT+Q). Note that 1 nM NT strongly reduced the effect of quinpirole. **D)** Summary diagram showing the change in relative firing rate of DAergic neurons in response to quinpirole alone (Q) or quinpirole in the presence of 1nM NT (NT+Q) after pre-treatment with SR48692 (1 μ M). The antagonist prevented the modulation induced by NT. **E)** Summary diagram showing the change in relative firing rate of DAergic neurons in response to 1 μ M baclofen alone (baclo) or baclofen in the presence of 1nM NT (NT+baclo). Note that NT failed to reduce the inhibitory effect of baclofen on firing. The basal firing rate prior to drug application was, on average, 0.49 ± 0.14 Hz in the experiments with 1 nM NT, 0.83 ± 0.24 Hz in the experiments with 10 nM NT, 0.46 ± 0.06 Hz in the experiments with SR48692 and 0.44 ± 0.07 Hz in the experiments with baclofen.

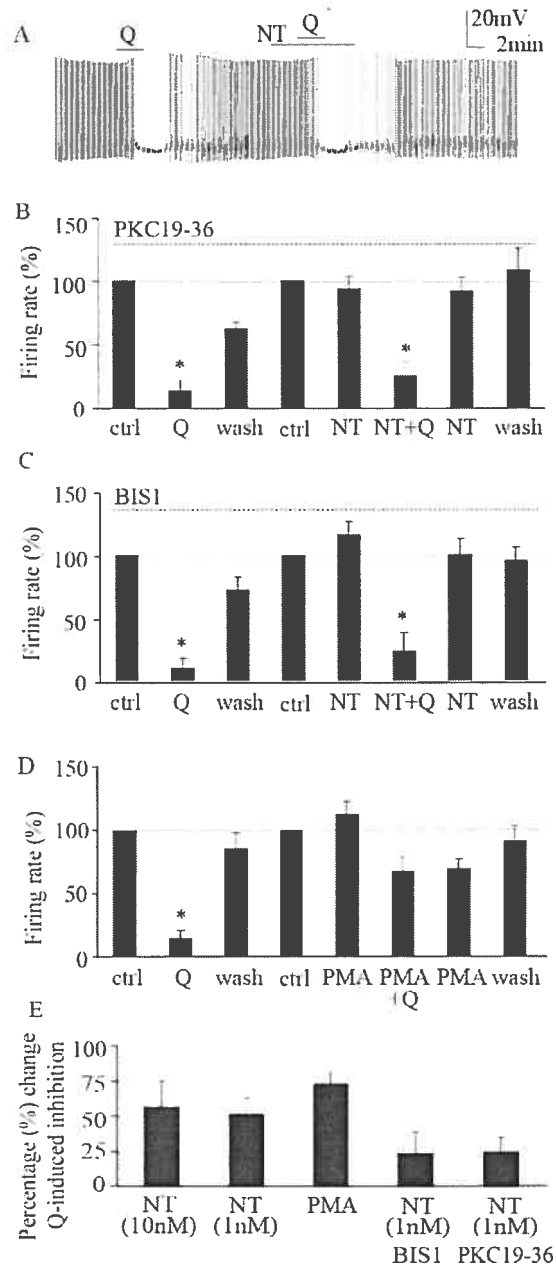


Figure 5. PKC mediates the inhibitory effect of NT on D2 receptor function

A) Representative trace recorded from a DAergic neuron using a patch pipette containing the PKC inhibitor PKC19-36 (1 μ M). Note that the response to the D2 agonist quinpirole (100 nM) is not reduced by pre-application of NT (1 nM). **B)** Summary diagram presenting

the relative firing rate of DAergic neurons dialyzed with the PKC inhibitor PKC19-36 (1 μ M). Note that under these conditions pre-application of NT (1 nM) failed to significantly reduce the effect of quinpirole. **C)** Summary diagram presenting the relative firing rate of DAergic neurons dialyzed with the PKC inhibitor bisindolylmaleimide (BIS1, 1 μ M). Note that under these conditions pre-application of NT (1 nM) failed to significantly reduce the effect of quinpirole. **D)** Summary diagram presenting the relative firing rate of DAergic neurons in response to quinpirole alone or after pre-application of the PKC activator PMA (100 nM). Note that PMA inhibited the response of neurons to quinpirole. **E)** Recapitulative histogram presenting the average percent reduction of quinpirole's effect on firing rate. Note that while NT at 1 and 10 nM as well as PMA reduced quinpirole's effect by approximately 50%, NT was ineffective in the presence of PKC inhibitors. The basal firing rate recorded before drug application was, on average, 0.64 ± 0.06 Hz in the experiments performed with BIS, 0.59 ± 0.12 Hz in the experiments performed with PKC19-36 and 0.72 ± 0.13 Hz in the experiments performed with PMA.

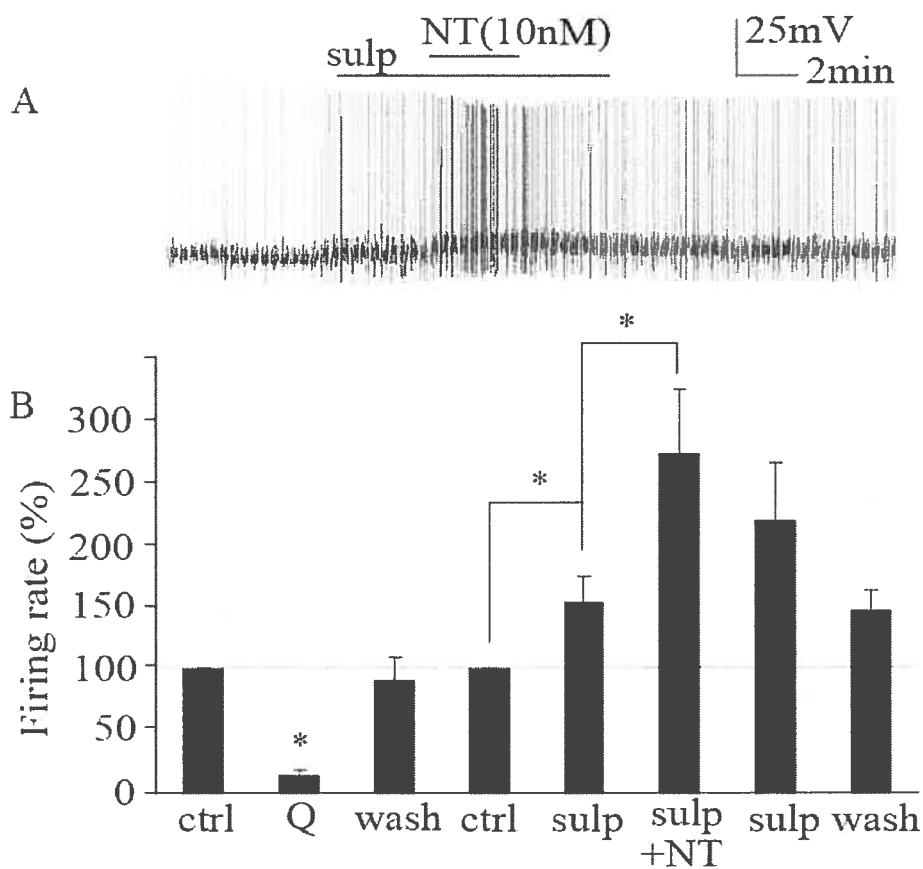


Figure 6. D2 receptor blockade is not required for the excitatory effect of NT

A) Representative patch-clamp recording showing the effect of NT (10 nM) on the firing rate of a DAergic neuron in the presence of sulpiride (10 μ M) (sulp). **B)** Summary histogram presenting the relative change in firing rate in response to NT in the presence of the D2 receptor antagonist sulpiride. Note that NT still enhanced firing under D2 receptor blockade. All neurons were initially tested with the D2 agonist quinpirole to confirm their DAergic phenotype. The basal firing rate was on average 0.51 ± 0.13 Hz.

References

- Bean, AJ, During, MJ, and Roth, RH.** Stimulation-induced release of coexistent transmitters in the prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study of dopamine and neurotensin release. *J Neurochem* 53: 655-7, 1989.
- Cameron, DL, Wessendorf, MW, and Williams, JT.** A subset of ventral tegmental area neurons is inhibited by dopamine, 5-hydroxytryptamine and opioids. *Neuroscience* 77: 155-66, 1997.
- Chalon, P, Vita, N, Kaghad, M, Guillemot, M, Bonnin, J, Delpech, B, Le Fur, G, Ferrara, P, and Caput, D.** Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett* 386: 91-4, 1996.
- Davila, V, Yan, Z, Craciun, LC, Logothetis, D, and Sulzer, D.** D3 dopamine autoreceptors do not activate G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel currents in substantia nigra dopamine neurons. *J Neurosci* 23: 5693-7, 2003.
- Diaz-Cabiale, Z, Fuxe, K, Narvaez, JA, Finetti, S, Antonelli, T, Tanganelli, S, and Ferraro, L.** Neurotensin-induced modulation of dopamine D2 receptors and their function in rat striatum: counteraction by a NTR1-like receptor antagonist. *Neuroreport* 13: 763-6, 2002.
- Dubuc, I, Costentin, J, Terranova, JP, Barnouin, MC, Soubrie, P, Le Fur, G, Rostene, W, and Kitabgi, P.** The nonpeptide neurotensin antagonist, SR 48692, used as a tool to reveal putative neurotensin receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 112: 352-4, 1994.
- Farkas, RH, Chien, PY, Nakajima, S, and Nakajima, Y.** Properties of a slow nonselective cation conductance modulated by neurotensin and other neurotransmitters in midbrain dopaminergic neurons. *J Neurophysiol* 76: 1968-81, 1996.

Fuxe, K, Von Euler, G, Agnati, LF, Merlo Pich, E, O'Connor, WT, Tanganelli, S, Li, XM, Tinner, B, Cintra, A, Carani, C, and et, al. Intramembrane interactions between neurotensin receptors and dopamine D2 receptors as a major mechanism for the neuroleptic-like action of neurotensin. *Ann N Y Acad Sci* 668: 186-204, 1992.

Guatteo, E, Bengtson, CP, Bernardi, G, and Mercuri, NB. Voltage-gated calcium channels mediate intracellular calcium increase in weaver dopaminergic neurons during stimulation of D2 and GABAB receptors. *J Neurophysiol* 92: 3368-74, 2004.

Guatteo, E, Fusco, FR, Giacomini, P, Bernardi, G, and Mercuri, NB. The weaver mutation reverses the function of dopamine and GABA in mouse dopaminergic neurons. *J Neurosci* 20: 6013-20, 2000.

Gully, D, Canton, M, Boigegrain, R, Jeanjean, F, Molimard, JC, Poncelet, M, Gueudet, C, Heaulme, M, Leyris, R, Brouard, A, and et, al. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 65-9, 1993.

Hermans, E, Maloteaux, JM, and Octave, JN. Phospholipase C activation by neurotensin and neuromedin N in Chinese hamster ovary cells expressing the rat neurotensin receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 15: 332-8, 1992.

Inanobe, A, Yoshimoto, Y, Horio, Y, Morishige, KI, Hibino, H, Matsumoto, S, Tokunaga, Y, Maeda, T, Hata, Y, Takai, Y, and Kurachi, Y. Characterization of G-protein-gated K⁺ channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J Neurosci* 19: 1006-17, 1999.

Jennes, L, Stumpf, WE, and Kalivas, PW. Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 210: 211-24, 1982.

Jiang, ZG, Pessia, M, and North, RA. Neurotensin excitation of rat ventral tegmental

neurones. *J Physiol* 474: 119-29, 1994.

Jin, W and Lu, Z. A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels. *Biochemistry* 37: 13291-9, 1998.

Jones, S and Kauer, JA. Amphetamine depresses excitatory synaptic transmission via serotonin receptors in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 19: 9780-7, 1999.

Jordan, BA and Devi, LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399: 697-700, 1999.

Kanjhan, R, Coulson, EJ, Adams, DJ, and Bellingham, MC. Tertiapin-Q blocks recombinant and native large conductance K⁺ channels in a use-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 1353-61, 2005.

Kim, KM, Nakajima, Y, and Nakajima, S. G protein-coupled inward rectifier modulated by dopamine agonists in cultured substantia nigra neurons. *Neuroscience* 69: 1145-58, 1995.

Kinkead, B and Nemeroff, CB. Neurotensin: an endogenous antipsychotic? *Curr Opin Pharmacol* 2: 99-103, 2002.

Kitamura, H, Yokoyama, M, Akita, H, Matsushita, K, Kurachi, Y, and Yamada, M. Tertiapin potently and selectively blocks muscarinic K⁽⁺⁾ channels in rabbit cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 196-205, 2000.

Kuzhikandathil, EV, Yu, W, and Oxford, GS. Human dopamine D₃ and D_{2L} receptors couple to inward rectifier potassium channels in mammalian cell lines. *Mol Cell Neurosci* 12: 390-402, 1998.

Lacey, MG, Mercuri, NB, and North, RA. Dopamine acts on D₂ receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J Physiol*

392: 397-416, 1987.

Lacey, MG, Mercuri, NB, and North, RA. On the potassium conductance increase activated by GABAB and dopamine D2 receptors in rat substantia nigra neurones. *J Physiol* 401: 437-53, 1988.

Leonetti, M, Brun, P, Sotty, F, Steinberg, R, Soubrie, P, Bert, L, Renaud, B, and Suaud-Chagny, MF. The neurotensin receptor antagonist SR 142948A blocks the efflux of dopamine evoked in nucleus accumbens by neurotensin ejection into the ventral tegmental area. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365: 427-33, 2002.

Lepee-Lorgeoux, I, Betancur, C, Rostene, W, and Pelaprat, D. Differential ontogenetic patterns of levocabastine-sensitive neurotensin NT2 receptors and of NT1 receptors in the rat brain revealed by in situ hybridization. *Brain Res Dev Brain Res* 113: 115-31, 1999.

Li, XM, Ferraro, L, Tanganelli, S, O'Connor, WT, Hasselrot, U, Ungerstedt, U, and Fuxe, K. Neurotensin peptides antagonistically regulate postsynaptic dopamine D2 receptors in rat nucleus accumbens: a receptor binding and microdialysis study. *J Neural Transm Gen Sect* 102: 125-37, 1995.

Liao, YJ, Jan, YN, and Jan, LY. Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in weaver brain. *J Neurosci* 16: 7137-50, 1996.

Liss, B, Neu, A, and Roeper, J. The weaver mouse gain-of-function phenotype of dopaminergic midbrain neurons is determined by coactivation of wvGirk2 and K-ATP channels. *J Neurosci* 19: 8839-48, 1999.

Mao, J, Wang, X, Chen, F, Wang, R, Rojas, A, Shi, Y, Piao, H, and Jiang, C. Molecular basis for the inhibition of G protein-coupled inward rectifier K(+) channels by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1087-92, 2004.

Margolis, EB, Hjelmstad, GO, Bonci, A, and Fields, HL. Kappa-opioid agonists directly inhibit midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 23: 9981-6, 2003.

Mazella, J, Botto, JM, Guillemare, E, Coppola, T, Sarret, P, and Vincent, JP. Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J Neurosci* 16: 5613-20, 1996.

Mazella, J, Zsurger, N, Navarro, V, Chabry, J, Kaghad, M, Caput, D, Ferrara, P, Vita, N, Gully, D, Maffrand, JP, and Vincent, JP. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein- coupled receptor. *J Biol Chem* 273: 26273-6, 1998.

Mercuri, NB, Calabresi, P, and Bernardi, G. The electrophysiological actions of dopamine and dopaminergic drugs on neurons of the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. *Life Sci* 51: 711-8, 1992.

Mercuri, NB, Stratta, F, Calabresi, P, and Bernardi, G. Neurotensin induces an inward current in rat mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci Lett* 153: 192-6, 1993.

Murer, G, Adelbrecht, C, Lauritzen, I, Lesage, F, Lazdunski, M, Agid, Y, and Raisman-Vozari, R. An immunocytochemical study on the distribution of two G-protein-gated inward rectifier potassium channels (GIRK2 and GIRK4) in the adult rat brain. *Neuroscience* 80: 345-57, 1997.

Nalivaiko, E, Michaud, JC, Soubrie, P, and Le Fur, G. Electrophysiological evidence for putative subtypes of neurotensin receptors in guinea-pig mesencephalic dopaminergic neurons. *Neuroscience* 86: 799-811, 1998.

Namkung, Y and Sibley, DR. Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem* 279: 49533-41, 2004.

Palacios, JM and Kuhar, MJ. Neurotensin receptors are located on dopamine-containing neurones in rat midbrain. *Nature* 294: 587-9, 1981.

Pillai, G, Brown, NA, McAllister, G, Milligan, G, and Seabrook, GR. Human D2 and D4 dopamine receptors couple through betagamma G-protein subunits to inwardly rectifying K⁺ channels (GIRK1) in a *Xenopus* oocyte expression system: selective antagonism by L-741,626 and L-745,870 respectively. *Neuropharmacology* 37: 983-7, 1998.

Pinnock, RD. Neurotensin depolarizes substantia nigra dopamine neurones. *Brain Res* 338: 151-4, 1985.

Pinnock, RD and Woodruff, GN. The non-peptide neurotensin receptor antagonist SR48692 is not a potent antagonist of neurotensin(8-13) responses of rat substantia nigra neurones in vitro. *Neurosci Lett* 172: 175-8, 1994.

Rogue, P, Zwiller, J, Malviya, AN, and Vincendon, G. Phosphorylation by protein kinase C modulates agonist binding to striatal dopamine D2 receptors. *Biochem Int* 22: 575-82, 1990.

Seutin, V, Massotte, L, and Dresse, A. Electrophysiological effects of neurotensin on dopaminergic neurones of the ventral tegmental area of the rat in vitro. *Neuropharmacology* 28: 949-54, 1989.

Sharon, D, Vorobiov, D, and Dascal, N. Positive and negative coupling of the metabotropic glutamate receptors to a G protein-activated K⁺ channel, GIRK, in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 109: 477-90, 1997.

Shi, WS and Bunney, BS. Neurotensin attenuates dopamine D2 agonist quinpirole-induced inhibition of midbrain dopamine neurons. *Neuropharmacology* 29: 1095-7, 1990.

Shi, WX and Bunney, BS. Neurotensin modulates autoreceptor mediated dopamine effects on midbrain dopamine cell activity. *Brain Res* 543: 315-21, 1991.

Sotty, F, Brun, P, Leonetti, M, Steinberg, R, Soubrie, P, Renaud, B, and Suaud-

- Chagny, MF.** Comparative effects of neurotensin, neurotensin(8-13) and. *Neuroscience* 98: 485-92, 2000.
- St-Gelais, F, Jomphe, C, and Trudeau, LE.** The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J Psychiatry Neurosci* 31: 229-45, 2006.
- St-Gelais, F, Legault, M, Bourque, MJ, Rompre, PP, and Trudeau, LE.** Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* 24: 2566-74, 2004.
- Szigethy, E and Beaudet, A.** 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: 128-37, 1989.
- Tanaka, K, Masu, M, and Nakanishi, S.** Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 4: 847-54, 1990.
- Tanganelli, S, Li, XM, Ferraro, L, Von Euler, G, O'Connor, WT, Bianchi, C, Beani, L, and Fuxe, K.** Neurotensin and cholecystokinin octapeptide control synergistically dopamine release and dopamine D2 receptor affinity in rat neostriatum. *Eur J Pharmacol* 230: 159-66, 1993.
- Terrillon, S and Bouvier, M.** Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 5: 30-4, 2004.
- Vita, N, Laurent, P, Lefort, S, Chalon, P, Dumont, X, Kaghad, M, Gully, D, Le Fur, G, Ferrara, P, and Caput, D.** Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett* 317: 139-42, 1993.
- von Euler, G, Fuxe, K, Benfenati, F, Hansson, T, Agnati, LF, and Gustafsson, JA.** Neurotensin modulates the binding characteristics of dopamine D2 receptors in rat striatal

membranes also following treatment with toluene. *Acta Physiol Scand* 135: 443-8, 1989.

von Euler, G, van der Ploeg, I, Fredholm, BB, and Fuxe, K. Neurotensin decreases the affinity of dopamine D2 agonist binding by a G protein-independent mechanism. *J Neurochem* 56: 178-83, 1991.

Waldhoer, M, Fong, J, Jones, RM, Lunzer, MM, Sharma, SK, Kostenis, E, Portoghese, PS, and Whistler, JL. A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9050-5, 2005.

Wang, HL and Wu, T. G alpha q/11 mediates neurotensin excitation of substantia nigra dopaminergic neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 36: 29-36, 1996.

Werkman, TR, Kruse, CG, Nievelstein, H, Long, SK, and Wadman, WJ. 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: 417-23, 2000.

Zahm, DS, Grosu, S, Williams, EA, Qin, S, and Berod, A. Neurons of origin of the neurotensinergic plexus enmeshing the ventral tegmental area in rat: retrograde labeling and in situ hybridization combined. *Neuroscience* 104: 841-51, 2001.

DISCUSSION

Par suite de la présentation des résultats de cette thèse sous forme de manuscrits, certains aspects de nos travaux méritent d'être discutés plus en profondeur. Quelques considérations s'imposent sur la méthodologie utilisée. Des perspectives d'avenir, entrouvertes par les résultats présentés dans les deux articles, doivent être soulignées. De plus, un article de synthèse exposant et discutant l'implication de la neurotensine dans différentes pathologies est inclus à la fin de cette section, qui permet de mieux comprendre les implications physiopathologiques de l'étude. Nous incluons également dans la section annexe de la thèse, un article que j'ai rédigé en tant que co-auteur. Cette étude porte sur les propriétés électrophysiologiques des neurones dopaminergiques mis en culture à partir de mésencéphale de souris transgéniques exprimant la EGFP sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase.

Considérations méthodologiques

Le travail expérimental présenté dans cette thèse a été réalisé sur deux types de préparations : des cultures primaires de neurones mésencéphaliques de cerveau de rat et des tranches aigües de mésencéphale de rat. L'utilisation de chacun de ces modèles expérimentaux présente des avantages et des désavantages particuliers qui seront ici discutés.

Cultures cellulaires

Les cultures primaires de neurones mésencéphaliques ont été utilisées comme modèle expérimental dans le premier article de cette thèse. La méthodologie utilisée pour réaliser ces cultures à partir de cerveaux de rats nouveau-nés est présenté dans l'article, mais rappelons brièvement qu'une couche de cellules gliales est d'abord apposée sur une lamelle de verre avant d'y déposer les neurones mésencéphaliques. La culture

mésencéphalique contient une population hétérogène de neurones et aucun critère morphologique ou électrophysiologique fiable ne permet de discriminer les neurones dopaminergiques des autres. Dans le but de pallier à cette difficulté, nous avons utilisé une technique de transfection qui permet d'exprimer la EGFP (enhanced green fluorescence protein) sous le contrôle du promoteur du transporteur de la dopamine (DAT) et d'identifier ainsi les neurones dopaminergiques dans la culture avant de procéder à l'enregistrement électrophysiologique. Sans l'utilisation de la transfection, il n'aurait été possible de déterminer le phénotype dopaminergique des neurones qu'en effectuant une immunohistochimie post-hoc, c'est-à-dire après l'enregistrement d'un neurone choisi de façon aléatoire. Cette méthode se traduit par un faible taux de succès expérimental, puisque le pourcentage de neurones dopaminergiques dans ces cultures est d'au plus 20-30%. Les neurones transfectés et exprimant la EGFP sont qu'en à eux dopaminergiques dans environ 85% des cas. Seulement 15% des expériences sont donc rejetées après immunohistochimie. Cette technique de transfection a été utilisée dans le premier article pour réaliser les expériences d'électrophysiologie et a permis d'améliorer substantiellement le taux de succès expérimental, c'est-à-dire le nombre de neurones enregistrés confirmés comme étant dopaminergiques par immunohistochimie.

La possibilité de modifier relativement facilement le génotype des cellules à l'aide de techniques de transfection est un avantage important de l'utilisation des cultures cellulaires. Nous avons employé cette technique dans le but d'identifier les neurones dopaminergiques dans nos cultures, mais elle peut être aussi utilisée à d'autres fins, comme, par exemple, pour surexprimer diverses protéines. La possibilité de transfecter est un avantage considérable du modèle de culture cellulaire. Certaines approches de transfection sont aussi possibles dans des modèles de tranches organotypiques mais leur utilisation est techniquement plus compliquée.

La technique de transfection que nous avons utilisé, la co-précipitation au phosphate de calcium, comporte cependant certains désavantages. Le pourcentage de cellules

transfectées demeure relativement faible en se situant autour de quelques pourcents (1 à 5 %). Ce faible pourcentage de transfection n'est pas problématique pour les expériences d'électrophysiologie qui ne demandent en fait qu'un seul neurone transfecté par lamelle de culture. Ceci rend par contre cette approche difficilement utilisable pour des expériences menées avec d'autres techniques expérimentales nécessitant un plus fort pourcentage de transfection, comme les techniques biochimiques. La procédure de transfection elle-même est également dommageable pour les cellules et les neurones transfectés sont dans bien des cas fragilisés par cette procédure.

Depuis la réalisation de notre premier projet de recherche, l'utilisation de la technique de transfection des neurones pour exprimer la GFP sous le contrôle du promoteur du transporteur de la dopamine a été remplacée au laboratoire par l'utilisation de souris transgéniques exprimant la EGFP sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase. C'est la caractérisation des propriétés des neurones en cultures primaires effectuée à partir de ces souris qui est présentée en annexe, dans l'article auquel j'ai collaboré.

En plus des désavantages reliés à la transfection, un certain nombre de limitations provient de l'utilisation même des neurones en culture. Tout d'abord, le réseau neuronal présent dans le cerveau n'est que partiellement conservé dans les modèles de tranches aiguës, est complètement absent dans les cultures de neurones. Cette situation peut engendrer des modifications du phénotype neuronal, puisque le développement des cellules est dépendant de l'activité environnante. Le processus de mise en culture s'accompagne aussi d'une certaine proportion de mort cellulaire, ce qui entraîne, potentiellement, la sélection d'une population de neurones et d'astrocytes plus résistants.

Par rapport à d'autres modèles de culture cellulaire, les cultures primaires de neurones possèdent l'avantage d'être plus représentatives des neurones *in vivo* que les cellules en lignée, même la mise en culture peut modifier quelque peu leur phénotype. Même s'il s'agit d'une limitation du modèle de culture cellulaire, on peut cependant tirer profit de cette caractéristique. En effet, pour déterminer l'implication de la réponse gliale

dans l'effet excitateur de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques, nous avons pu trouver, des conditions de cultures où les astrocytes répondent ou non à une application de neurotensine par une augmentation du calcium intracellulaire. Ce genre de démonstration aurait été difficile à envisager dans un modèle de tranche ou chez l'animal entier.

Tranches aiguës de mésencéphale :

Les expériences présentées dans le deuxième article de la section résultats de cette thèse et traitant de l'effet de la neurotensine sur la fonction de l'autorécepteur D2, ont été réalisées à l'aide d'un modèle de tranches aiguës de mésencéphale. La tranche aiguë de cerveau est réalisée avant chaque expérimentation, à partir de rats âgés de 14 à 24 jours. Le cerveau est rapidement extrait puis tranché à l'aide d'un vibratome. Les tranches ainsi obtenues sont maintenues dans un milieu cérébrospinal artificiel oxygéné pour une durée pouvant aller jusqu'à 6 heures avant d'être utilisées pour l'expérimentation. Comme dans le cas des cultures primaires de neurones non-transfectés, l'identification des neurones dopaminergiques dans une tranche constitue un véritable défi.

Classiquement, des critères électrophysiologiques sont utilisés pour discriminer les neurones dopaminergiques des autres neurones mésencéphaliques (Bunney et al., 1991; Johnson and North, 1992). Par contre, l'utilisation de ces critères est de plus en plus controversée et leur fiabilité est remise en question. La présence d'un courant dépolarisant de type I_h lors de l'imposition d'un courant hyperpolarisant est un critère qui a été, et qui est toujours, largement utilisé pour identifier les neurones dopaminergiques (Grace and Bunney, 1984; Lacey et al., 1989; Bunney et al., 1991; Jiang et al., 1993). Par contre, plusieurs études récentes démontrent qu'une proportion importante des neurones du mésencéphale exprimant ce courant I_h n'est pas dopaminergique (tableau 3). Ces études ont permis de constater que le pourcentage de cellules exprimant un courant I_h et présentant un phénotype dopaminergique confirmé par immunohistochimie est de 60 à 100%. Pour nos expériences, nous avons donc considéré que l'utilisation du critère électrophysiologique

n'était pas suffisante pour s'assurer du phénotype dopaminergique des neurones enregistrés.

| Nombre de cellules montrant Ih | TH+ | % TH | Espèce | Référence |
|--------------------------------|-----|------|---------------|-------------------------|
| 21 | 21 | 100 | Rat | Grace and Onn, 1989 |
| 5 | 3 | 60 | Rat | Jonhson and North, 1992 |
| 29 | 20 | 69 | Cochon d'inde | Cameron et al., 1997 |
| 43 | 27 | 63 | Rat | Jones and Kauer, 1999 |
| 16 | 11 | 69 | Rat | Margolis et al., 2003 |
| 47 | 46 | 98 | Souris | Wanat and Bonci., 2005 |

Tableau 3. Études rapportant l'incidence de la présence du courant Ih et celle du phénotype dopaminergique vérifié par immunohistochimie.

Il faut également noter que les critères électrophysiologiques ne sont pas davantage utiles pour la sélection des neurones dopaminergiques dans un modèle de culture. En effet, comme le décrit la figure 2 de l'article présenté en annexe, les neurones dopaminergiques mis en culture n'expriment pas, du moins de façon évidente, ce courant dépolarisant Ih

induit par l'hyperpolarisation. De plus, dans ce modèle, aucune autre caractéristique électrophysiologique ne permet de discriminer les neurones dopaminergiques des autres.

D'autres approches peuvent être utilisées pour déterminer le phénotype des neurones : l'immunohistochimie et la pharmacologie. Un neurone enregistré via la technique du patch-clamp peut être dialysé à l'aide d'un marqueur comme la biocytine qui permettra, par suite de l'enregistrement, l'identification du neurone grâce à un marquage immunohistochimique conjoint de la tyrosine hydroxylase et de la biocytine. Cette technique permet de confirmer le phénotype dopaminergique du neurone enregistré, de même que sa localisation dans la tranche. Par contre, l'immunohistochimie n'est pas une technique toujours fiable. En effet, une certaine proportion des neurones enregistrés ne résistent pas au retrait de la pipette et ne sont pas retrouvés à l'aide du marquage. De plus, le marquage immunohistochimique n'est pas toujours clair dans la tranche, comme c'est le cas pour les cellules en culture, par exemple. En effet, l'épaisseur de la tranche peut nuire à la bonne pénétration de l'anticorps et la grande quantité de cellules et de prolongements marqués par l'anticorps dirigé contre la tyrosine hydroxylase rend difficile l'identification de certains neurones. Pour diminuer l'épaisseur de la tranche certains auteurs ont proposé d'en faire des coupes plus minces à l'aide d'un cryostat. Une telle technique apparaît cependant difficilement applicable à des tranches, comme les nôtres, qui sont déjà plutôt minces (250 μ m). Cette technique pourrait également compliquer l'identification à la localisation de la cellule dans la tranche. Bien qu'elle ne permette pas l'identification du phénotype dopaminergique de toutes les cellules, l'immunohistochimie reste donc un bon moyen de localiser la cellule et de s'assurer que l'enregistrement a été fait dans la région anatomique d'intérêt.

Le moyen le plus fiable et simple d'identifier un neurone dopaminergique dans une tranche de cerveau est l'utilisation d'outils pharmacologiques. En effet, les neurones dopaminergiques expriment des autorécepteurs somatodendritiques de type D2 et l'application d'un agoniste de ces récepteurs, comme le quinpirole, induit une diminution

de leur excitabilité du neurone, qui se traduit par une hyperpolarisation du potentiel membranaire et une diminution de la fréquence de décharge en mode courant imposé. Jusqu'à présent, il n'y a aucune évidence de l'expression du récepteur D2 par d'autres types cellulaires de l'ATV que les neurones dopaminergiques. Ainsi, l'application d'un agoniste du récepteur D2 est un bon marqueur pharmacologique pour identifier ces neurones. D'autres molécules pourraient également être de bons marqueurs pharmacologiques des neurones dopaminergiques comme un agoniste du récepteur kappa-opioïde qui induit une inhibition de la fréquence de décharge spécifiquement dans les neurones dopaminergiques (Margolis et al., 2003).

Cette approche pharmacologique, bien que très fiable, ne peut par contre être utilisée dans tous les types d'expériences. En effet, l'application de l'agoniste et le lavage de son effet peuvent être de longue durée. L'effet du quinpirole, par exemple, peut perdurer de quelques minutes à plus de 20 minutes de lavage. Certains protocoles expérimentaux, comme ceux qui permettent d'induire la potentialisation à long terme (PLT), doivent débiter tôt après la rupture de la membrane et s'étalent sur une longue période. Ils sont donc incompatibles avec l'utilisation des critères pharmacologiques de discrimination. Par contre, pour les expériences que nous avons effectuées (voir le second article), la dimension temporelle n'était pas critique et nous avons utilisé ce critère pharmacologique pour discriminer les neurones dopaminergiques des autres.

L'utilisation d'un modèle de tranche aigüe de cerveau pour effectuer des enregistrements électrophysiologiques comporte de nombreux avantages. Les neurones présents dans la tranche conservent certaines des propriétés observées chez l'animal entier et comportent l'avantage d'être plus accessibles et faciles à étudier. Un autre avantage est d'éviter l'anesthésie. De plus, il est possible de maintenir la tranche parfaitement immobile, contrairement à l'animal entier anesthésié, chez lequel la circulation sanguine s'accompagne de pulsations. De plus l'accès aux différentes structures et noyaux est facilité dans la tranche.

Même si l'intégrité complète du tissu n'est pas conservée dans la tranche, une partie du réseau neuronal s'y trouve préservée. Les afférences à la région étudiée sont toujours présentes de même que les neurotransmetteurs qu'elles relâchent. Comparativement aux modèles de cellules en culture, le modèle de tranche est certainement plus représentatif de la physiologie des neurones *in vivo*. L'environnement cellulaire et le réseau de cellules gliales sont également partiellement maintenus dans la tranche.

Un certain nombre de limitations compliquent cependant l'utilisation d'un modèle expérimental de tranches aiguës en vue de l'enregistrement électrophysiologique. Lorsqu'il s'agit d'enregistrements effectués dans différentes parties du mésencéphale, s'ajoute à la difficulté d'identifier le phénotype dopaminergique des neurones celle de discriminer la localisation exacte des différents noyaux. En effet, peu de repères visuels distinctifs sont disponibles pour reconnaître la localisation précise des noyaux, comme c'est le cas dans d'autres régions cérébrales. De plus, les noyaux tels l'ATV et la SN sont de petite taille et de forme irrégulière, de telle sorte que leur position dans la tranche varie rapidement d'une tranche à l'autre, et que de faibles variations de l'angle de coupe peuvent compliquer davantage leur identification. L'immunohistochimie s'avère alors indispensable pour confirmer la localisation de la cellule enregistrée.

Pour l'étude du mésencéphale deux types de coupes sont privilégiées par les équipes qui s'intéressent à cette région : des coupes transverses et des coupes horizontales. Chacun ces plans de coupe comporte des caractéristiques. Le plan transverse permet de mieux discriminer les différents noyaux du mésencéphale, mais les afférences en provenance de régions rostralement situées sont sectionnées dans ces tranches. Dans le plan de coupe horizontal, la distinction entre les différents noyaux est difficile, notamment, entre l'ATV et la SN. Par contre, les afférences innervant le mésencéphale sont mieux préservées et cette configuration peut être utilisée pour effectuer des stimulations de champ.

Une autre difficulté inhérente à l'utilisation du modèle de tranches aiguës est l'accessibilité des neurones à l'intérieur de la tranche. En effet, l'épaisseur de la tranche peut limiter la diffusion des drogues jusqu'à la cellule; l'évaluation de la concentration de drogue atteignant la cellule y est donc incertaine, contrairement au modèle de neurones en culture. De plus, l'approche de la cellule avec la pipette est plus difficile dans une tranche que dans les cultures cellulaires. L'utilisation de la tranche est donc plus ardue lors de la collecte de données avec d'autres techniques expérimentales comme l'imagerie calcique, ce qui nécessite l'utilisation de systèmes plus complexes comme la microscopie confocale.

Modèles de tranches aiguës et cultures cellulaires : différences dans les résultats obtenus

Dans le cadre de cette thèse, certaines divergences ont été observées entre les résultats obtenus dans les tranches aiguës par rapport aux cultures cellulaires. Ainsi, dans le projet réalisé en culture primaire de neurones, l'effet excitateur de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques a été bloqué par l'antagoniste spécifique du NTS1, le SR48692, dans 9 neurones sur les 14 testés. Par contre, dans les expériences effectuées *in situ* sur des tranches aiguës de mésencéphale, le SR48692 n'a pas modifié l'effet excitateur de la neurotensine. Par contre cet effet de la neurotensine a été complètement bloqué par le SR142948A, un antagoniste à large spectre qui bloque à la fois NTS1 et NTS2, suggérant l'implication exclusive de NTS2 dans l'effet excitateur de la neurotensine dans les tranches. De plus, le courant dépolarisant I_h , qui est présent dans la plupart des cellules dopaminergiques *in vivo*, est rare sinon absent dans les cellules en culture. Plusieurs explications peuvent rendre compte de ces différences entre des résultats obtenus en culture et en tranche :

1. Les cultures cellulaires sont effectuées à partir d'un bloc de mésencéphale qui contient l'ATV, la substance noire et le RRF et sans doute d'autres noyaux

environnants comme certaines extensions du raphé. Les neurones dopaminergiques présents dans la culture proviennent donc de ces différentes régions, alors que certaines différences dans la physiologie des neurones dopaminergiques y ont été rapportées (Cragg et al., 1997; Werkman et al., 2001; Gonzalez-Hernandez et al., 2004). Par contre, les neurones enregistrés dans la tranche étaient tous situés dans une région du mésencéphale bien délimitée correspondant l'ATV. Certaines des différences observées entre les neurones enregistrés en culture et en tranche pourraient donc être imputées à l'hétérogénéité d'origine des neurones dopaminergiques en culture.

2. Il est aussi possible qu'au cours du processus de mise en culture une certaine population de cellules soit sélectionnée. En effet, tel que déjà mentionné, la mise en culture des cellules est une manœuvre plutôt drastique qui engendre une certaine proportion de mort cellulaire, de telles sortes que seules les cellules plus résistantes survivent. Les neurones survivant à la mise en culture pourraient donc n'être représentatifs que d'une fraction de la population à l'étude.
3. Une autre éventualité est que le niveau d'expression des récepteurs neurotensinergiques soit modifié dans les neurones dopaminergiques en culture. Comme le SR48692 bloque l'effet excitateur de la neurotensine dans les cultures et non dans la tranche, il se pourrait que l'effet excitateur soit médié en culture par le NTS1, alors que dans la tranche, le ratio d'expression des récepteurs NTS1 et NTS2 serait différent. Il a été rapporté que le niveau d'expression des récepteurs et de certains canaux peut être modifié dans les modèles de cultures cellulaires selon les conditions expérimentales de la mise en culture (Falk et al., 2006). Par exemple, il a été montré que la dissociation des cellules altère l'expression du récepteur TRK. La perte de contact direct entre les cellules ou un autre aspect de la dissociation pourrait être responsables de cet effet (Genc et al., 2005). D'autres facteurs pourraient aussi expliquer certaines différences dans les résultats obtenus à l'aide des deux modèles. Par exemple, il pourrait y avoir des différences entre les niveaux

d'activité auquel sont soumis les neurones en culture et en tranche. En la culture, on peut supposer que le neurone soit soumis à un niveau d'activité supérieur à celui des neurones d'une tranche, étant donné le réseau d'excitation récurrent qui s'y établit. L'expression de certaines protéines et même de certains canaux, comme les canaux GIRK, peut-être modifiée en fonction du niveau d'activité auxquels sont soumis les neurones (Chung et al., 2005).

4. Enfin, l'hétérodimérisation des récepteurs neurotensinergiques n'a pas encore été démontrée mais son existence est possible et pourrait expliquer certaines différences observées entre les résultats obtenus en culture et en tranche. L'effet de la neurotensine observé dans la tranche est peut-être le résultat de l'activation d'hétérodimères, dont la pharmacologie diffère de celle des récepteurs homomériques, comme c'est le cas pour d'autres récepteurs qui dimérisent (Gazi et al., 2002; Strange, 2005). L'hétérodimérisation de récepteurs peut induire une modification des voies de signalisation qu'ils activent. Un changement du niveau d'expression de l'un ou l'autre des récepteurs de la neurotensine dans la culture cellulaire pourrait modifier la formation d'hétérodimères et donc expliquer les différences observées.

Étant donné les différences entre les résultats obtenus en culture cellulaire et en tranche aigue, il m'apparaît préférable de recourir au modèle de tranche, qui se rapproche davantage de la physiologie observée *in vivo*, aussi souvent que faire se peut. L'utilisation des cellules en culture est utile pour certains types d'expériences comme l'enregistrements des canaux ioniques ou quand des transfections sont nécessaires, de même que pour effectuer des expériences d'imagerie calcique. En d'autres cas, le modèle de tranches aiguës devrait être privilégié.

Mesure de l'excitabilité des neurones dopaminergiques

Dans les études que nous avons présenté dans la section résultats, l'excitabilité des neurones dopaminergiques a été évaluée en mesurant la fréquence des potentiels d'action en mode courant imposé. Notre objectif était de mesurer l'effet de la neurotensine et du quinpirole sur cette excitabilité. Ces deux molécules se lient à des récepteurs qui induisent des courants membranaires. Comme le changement d'excitabilité des neurones est le résultat de modifications des conductances membranaires, il est aussi possible de mesurer les courants en mode voltage imposé. La stimulation du récepteur D2 et des récepteurs de la NT induit des courants de faible amplitude qui sont difficilement détectables. Les études utilisant le courant pour étudier l'effet de la neurotensine, utilisent des concentrations de neurotensine très élevées, de l'ordre du μM pour obtenir des réponses détectables (Wang et Wu 1996 : $5\mu\text{M}$; Jiang et al., 1994 : $1\mu\text{M}$; Farkas et al., 1997). Or, ces concentrations sont beaucoup plus importantes que les concentrations physiologiques de neurotensine.

La mesure de la fréquence des potentiels d'action est une mesure indirecte de l'effet de la neurotensine sur les conductances mais elle permet de mesurer des modifications d'excitabilité des neurones qui ne pourraient être aussi facilement détectables en mode voltage imposé. De plus, cette approche permet d'utiliser des concentrations de neurotensine plus faibles et se rapprochant davantage des concentrations physiologiques. Certaines limitations sont par contre inhérentes à l'utilisation de cette approche. En effet, comme le potentiel membranaire est près de la limite de la décharge des neurones, un faible effet d'une substance inhibitrice sur des conductances, peut amener un arrêt de la décharge. Les changements de décharge ne sont donc pas linéaires, la mesure en mode voltage imposé des courants induits par le quinpirole et la neurotensine aurait permis davantage de linarité dans les réponses.

Résultats (article 1)

Nous avons étudié dans le premier article de cette thèse deux aspects de l'effet de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques : son effet sur le niveau de calcium intracellulaire et son effet sur la fréquence de décharge. Nous avons d'abord démontré que la neurotensine induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans les neurones dopaminergiques, laquelle résulte principalement d'une entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire. Dans un deuxième temps, nous avons confirmé l'effet excitateur de la neurotensine, préalablement établi par d'autres équipes, en mesurant l'augmentation de la fréquence de décharge du neurone induite par le peptide. Nous avons démontré que cette augmentation de la fréquence de décharge dépend du calcium puisqu'elle est bloquée par le BAPTA, une molécule agissant comme chélateur des ions calciques. Nous avons également mis en évidence l'implication du récepteur de l'IP3 et de canaux sensibles au SKF96365 et au cation inorganique Zn^{++} qui sait probablement des canaux cationiques de type TRP, dans l'effet excitateur de la neurotensine sur la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques.

Ces résultats ouvrent la voie à plusieurs autres investigations des effets de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques.

1. Nous avons constaté que l'activation des astrocytes n'était pas nécessaire pour que la neurotensine ait un effet excitateur sur les neurones dopaminergiques. Par contre, l'activation des astrocytes pourrait être impliquée dans l'intensité et/ou la durée de l'effet excitateur de la neurotensine. Il a été montré précédemment que les astrocytes sont activés par l'application de neurotensine, entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Trudeau, 2000). En utilisant différentes conditions de culture, nous avons suggéré que l'activation des astrocytes par la neurotensine permette de potentialiser l'effet excitateur du peptide

sur les neurones dopaminergiques. Par contre, nous n'avons pas montré de lien de causalité, ni déterminé par quel mécanisme ce phénomène pourrait avoir lieu. On peut suggérer plusieurs hypothèses à cet effet. Aussi, l'activation des astrocytes entraîne la relâche de transmetteurs comme le glutamate et l'ATP qui peuvent agir sur l'activité des neurones environnants (Parpura et al., 1994). L'ATP relâchée par les astrocytes activés peut stimuler directement les récepteurs PX2, mais elle peut aussi être convertie en adénosine et activer ses récepteurs qui affectent la transmission synaptique (Newman, 2003). Le glutamate peut agir sur la transmission synaptique en modulant la relâche présynaptique de transmetteurs et en stimulant directement le neurone post-synaptique (Araque et al., 1998; Kang et al., 1998). Il a été montré que la stimulation des récepteurs glutamatergiques métabotropes mGLUR1 entraîne l'activation des canaux TRP1 dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale (Tozzi et al., 2003); canaux qui comme nous l'avons montré sont impliqués dans l'effet excitateur de la neurotensine. L'implication des récepteurs mGLUR1 dans l'amplitude de la réponse à la neurotensine pourrait être vérifiée en testant si l'amplitude de l'effet excitateur de la neurotensine est le même en présence d'un antagoniste du récepteur mGLUR1. On peut donc supposer que l'effet de l'activité gliale sur l'amplitude ou la durée de l'effet excitateur de la neurotensine sur les neurones dopaminergique passe soit par le glutamate soit par l'ATP relâchée par les astrocytes. Il est également possible que l'activité gliale favorise l'expression des récepteurs neurotensinergiques ou celle des canaux TRP par les neurones dopaminergiques, à cause de la relâche de transmetteurs ou celle de facteurs trophiques.

2. Nous avons montré que, par suite de l'application de neurotensine, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans les neurones est principalement due à une entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire. Cette entrée de calcium n'est pas le résultat de conductances calciques activées par la dépolarisation puisque l'augmentation de calcium n'est pas modifiée en présence de tétrodothine.

L'implication de canaux TRP dans l'effet sur la fréquence de décharge pourrait également expliquer en partie l'augmentation du calcium intracellulaire. L'utilisation de bloqueurs de canaux TRP pourrait permettre de démontrer cette implication en imagerie calcique.

3. Une telle augmentation de la concentration de calcium dans les neurones dopaminergiques pourrait avoir de multiples effets sur plusieurs voies de signalisation et affecter l'activité de plusieurs enzymes et canaux. L'ensemble des répercussions de ce flux d'ions calciques dans les neurones reste à démontrer, mais on peut d'ores et déjà imaginer un effet sur des protéines kinases activées par le calcium, comme la PKC et la CaM kinase, ainsi que sur d'autres enzymes activées par le calcium, comme la cPLA2, la calcineurine.
4. Les fonctions du récepteur NTS3 sont peu connues et on ne peut exclure que ce dernier soit responsable d'une certaine proportion des effets de la neurotensine observés sur les neurones dopaminergiques. Comme aucun agent pharmacologique ne permet de discriminer facilement les effets imputables au NTS3 des autres types de récepteurs neurotensinergiques, la détermination du rôle de ce récepteur dans l'effet de la neurotensine est donc plus complexe. Le seul moyen d'étudier la fonction du NTS3 est de l'exprimer par transfection dans des cellules en lignées. Nous pourrions ainsi observer l'effet d'une application de neurotensine sur les niveaux de calcium intracellulaire et sur la fréquence de décharge de cellules n'exprimant que ce type de récepteur neurotensinergique.
5. Y a-t-il d'autres sous-types de récepteurs neurotensinergiques? Les récepteurs de la neurotensine NTS1, NTS2 et NTS3 ont été clonés. Plusieurs observations permettent de croire qu'il pourrait y avoir d'autres sous-types de récepteurs neurotensinergiques n'ayant pas été identifiés jusqu'à maintenant. Dans le premier article, nous avons montré que, ni le SR48692 ni le SR142948A ne bloquent complètement l'augmentation de calcium observée dans les neurones

dopaminergiques en culture. Ce résultat suggère que des récepteurs neurotensinergiques non encore identifiés pourraient être impliqués.

Des données expérimentales obtenues par d'autres équipes abondent également dans le même sens. En effet, il y a des analogues de la neurotensine qui possèdent une faible affinité pour les récepteurs NTS1 et NTS2 et qui causent des effets similaires à la neurotensine (Labbe-Jullie et al., 1994). Par contre, l'étude de l'homologie de séquence des récepteurs neurotensinergiques déjà clonés aurait théoriquement dû permettre la mise à jour d'autres récepteurs s'ils existent. Une hypothèse plausible pour expliquer les effets de la neurotensine n'impliquant ni NTS1 ni NTS2 est que ces récepteurs puissent former des oligomères qui modifient leurs propriétés pharmacologiques et possiblement les voies de signalisation qu'ils activent. En effet, plusieurs récepteurs couplés à une protéine G ont la possibilité de former des oligomères, entraînant ainsi une modification de la propriété des récepteurs. Plusieurs exemples de dimérisation entraînant la modification de propriétés de récepteurs couplés à une protéine G ont été répertoriés. Ainsi, des sous-types de récepteurs GABA s'hétérodimérisent ($GABA_{B1}$ / $GABA_{B2}$) et cette association est nécessaire à l'activité du récepteur (Galvez et al., 2001) puisque la sous-unité $GABA_{B1}$ contient le site de liaison des agonistes alors que la sous-unité $GABA_{B2}$ contient les structures permettant le couplage aux protéines G. La dimérisation du récepteur D2 avec le récepteur de l'adénosine A_{2A} entraîne une modification des propriétés respectives de ces deux récepteurs. En effet, la stimulation d'un seul d'entre eux entraîne la co-internalisation des deux (Hillion et al., 2002). Le récepteur D2 se dimérise aussi avec le récepteur de la somatostatine $sst5$ et l'association de ces récepteurs entraîne une potentialisation de leur signalisation (Rocheville et al., 2000). Au contraire, une atténuation du signal intracellulaire est observée lors de la dimérisation du récepteur dopaminergique D1 avec le récepteur de l'adénosine A1 (Gines et al., 2000).

5. En plus d'agir sur les neurones dopaminergiques, la neurotensine interagit avec une certaine proportion des neurones mésencéphaliques non-dopaminergiques. En effet, nous avons observé dans nos expériences (résultats non-publiés) que la neurotensine induit une augmentation du niveau de calcium intracellulaire et de la fréquence de décharge dans une proportion des neurones non-dopaminergiques. L'effet de la neurotensine sur ces neurones a été peu étudié et il serait intéressant de mieux caractériser cette interaction. L'effet résultant de cette action de la neurotensine sur les cibles de ces neurones est aussi inconnu. Des études montrent que beaucoup de neurones non-dopaminergiques du VTA sont des neurones de projection qui ciblent des régions comme le nAcc, le CPF, l'amygdale et l'hippocampe (Thierry et al., 1980; Swanson, 1982). Au moins certaines de ces projections qui innervent le CPF et le NAcc sont GABAergiques (Van Bockstaele and Pickel, 1995; Carr and Sesack, 2000; Margolis et al., 2006). On peut donc supposer que la neurotensine en augmentant l'excitabilité des neurones non-dopaminergiques entraîne une augmentation de la libération de GABA dans ces régions cibles. Les neurones GABAergiques dans l'ATV sont moins nombreux et répondent à la neurotensine dans une plus faible proportion que les neurones dopaminergiques (résultats non-publiés). On peut donc spéculer que l'augmentation de la quantité de GABA relâché dans les régions de projection en réponse à une stimulation par la neurotensine soit plus faible que l'augmentation de la dopamine relâchée.

Résultats (article 2)

Les résultats présentés dans le second article de cette thèse suggèrent que la diminution de l'effet d'un agoniste D2 en présence de neurotensine passe par l'activation du récepteur NTS1 et de la PKC. En effet, des molécules inhibant l'activation de la PKC

ont permis de bloquer l'effet de la neurotensine sur la fonction du récepteur D2, alors que le PMA, qui active directement la PKC, mime l'effet de la neurotensine sur l'activité D2 et bloque l'effet d'un agoniste D2.

Une première explication de l'interaction entre la neurotensine et le récepteur D2 veut que l'activation des récepteurs de la neurotensine entraîne une désensibilisation hétérologue de l'autorécepteur D2. Ce mécanisme pourrait avoir lieu via l'activation de la PKC puisque nous avons montré que l'interaction entre les deux récepteurs est dépendante de la PKC. De plus, cet enzyme est reconnu pour induire la désensibilisation hétérologue de plusieurs récepteurs en phosphorylant certains de leurs résidus. On connaît trois récepteurs qui subissent une désensibilisation hétérologue par un mécanisme dépendant de la PKC : mGLUR1, qui est désensibilisé suivant l'activation du récepteur muscarinique M1 (Mundell et al., 2004), le récepteur V1 de la vasopressine, qui est désensibilisé suivant l'activation du récepteur muscarinique M5 (Ancellin and Morel, 1998) et le récepteur de l'angiotensine II, qui est désensibilisé suivant l'activation de V1 (Zhang et al., 1996). Cette hypothèse d'une activation de la PKC est à mon avis la plus plausible pour expliquer l'interaction entre le récepteur de la neurotensine et le récepteur D2. D'autres mécanismes de désensibilisation hétérologue impliquent l'activation de la PKA, qui est aussi en mesure de phosphoryler certains récepteurs et d'induire ainsi leur désensibilisation. Cependant, la PKA n'est normalement pas activée par le récepteur NTS1.

Des résultats obtenus par d'autres équipes suggèrent d'autres hypothèses pour expliquer l'effet de la neurotensine sur la fonction du récepteur D2. Certains ont avancé l'idée que cet effet puisse être le résultat d'une interaction directe entre les récepteurs neurotensinergiques et dopaminergiques. En effet, des données expérimentales suggèrent que les récepteurs de la neurotensine et le récepteur D2 peuvent interagir de façon relativement directe et que cette interaction allostérique puisse expliquer la diminution de fonction du récepteur D2. Il a été montré que la neurotensine diminue l'affinité du récepteur D2 dans un modèle de préparation de membranes isolées de striatum où les

protéines G sont inactivées et où il n'y a donc aucun couplage via des effecteurs cytosoliques (von Euler et al., 1991). Par contre, la formation d'hétérodimères ne peut être confirmée à l'aide de cette technique. Il faut noter que ces expériences ont été menées dans des préparations membranaires de striatum, une région où l'interaction entre la neurotensine et le récepteur D2 a été moins étudié que dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale. Ces résultats devraient être validés expérimentalement dans le mésencéphale avant d'y être transposés. De plus, pour démontrer l'association de récepteurs, il faut procéder à des expériences en co-immunoprécipitation. Or, cette technique ne permet pas d'exclure une interaction des récepteurs via des partenaires et ne garantit donc pas l'interaction directe. Pour démontrer l'hétérodimérisation de récepteurs, on devra utiliser des techniques de transfert de fluorescence, soit le FRET (fluorescence resonance energy transfer) soit le BRET (bioluminescence resonance energy transfer), qui permettent de montrer l'interaction directe entre deux protéines.

Un autre mécanisme pourrait aussi expliquer la diminution de la fonction du récepteur D2 en présence de neurotensine. Si les récepteurs se retrouvent dans un compartiment membranaire commun, l'internalisation du récepteur de la neurotensine par suite de son activation pourrait entraîner celle du récepteur D2, menant ainsi à sa désensibilisation. Cette hypothèse pourrait être étudiée en observant s'il y a internalisation du récepteur D2 en présence de neurotensine.

Enfin, une dernière hypothèse qui a été soulevée dans la littérature pour expliquer l'inhibition de la fonction du récepteur D2 en présence de neurotensine est qu'il y ait interaction entre les agonistes avant même l'activation des récepteurs. Ainsi, selon cette hypothèse, la neurotensine n'agirait pas sur le récepteur D2 via l'activation des récepteurs neurotensinergiques mais plutôt directement sur l'agoniste dopaminergique. En effet, il a été montré que la neurotensine peut se lier à la dopamine et former un complexe (Adachi et al., 1990). Par contre, cette hypothèse semble peu vraisemblable puisqu'un analogue de la neurotensine incapable de lier la dopamine, la neuromédine, mime l'action de la

neurotensine et bloque la fonction du récepteur D2 (Shi and Bunney, 1991b). De plus, comme d'autres équipes, nous avons montré que des agonistes dopaminergiques autres que la dopamine, comme le quinpirole, bloquent la fonction du récepteur D2, ce qui exclue qu'une interaction entre les agonistes explique le phénomène observé.

Perspectives

Malgré le fait que nous ayons montré que la diminution de la fonction du récepteur D2 par la neurotensine nécessite l'activation de la PKC, des éléments demeurent à clarifier pour expliquer le mécanisme d'action complet. En effet, l'effecteur de l'enzyme n'a pas été identifié. Il est possible que la PKC agisse directement sur le récepteur D2 en le phosphorylant. Si l'action de la PKC se fait directement sur le récepteur D2, le site exact de phosphorylation devrait pouvoir être identifié. La PKC peut phosphoryler plusieurs sites à l'intérieur de 2 domaines situés sur la troisième boucle intracellulaire du récepteur (Namkung and Sibley, 2004) entraînant sa désensibilisation et son internalisation. Ces auteurs ont aussi montré que l'activation du récepteur muscarinique M1, qui est couplé à une protéine Gq comme NTS1, entraîne la phosphorylation du récepteur D2. L'idée que la PKC activée par la neurotensine puisse agir directement sur le récepteur D2 en le phosphorylant est attrayante et appuyée par des précédents dans la littérature, mais on ne peut exclure que l'action de la PKC soit dirigée plutôt sur d'autres effecteurs du récepteur D2. Il apparaît cependant peu probable que le canal GIRK soit directement inhibé par la PKC, puisque nous avons montré que l'activation du canal GIRK par l'activation du récepteur GABA_B à l'aide du baclofen n'est pas modifiée par l'activation du récepteur de la neurotensine.

De plus, l'isoforme de la PKC impliquée dans le mécanisme demeure elle aussi à déterminer. L'utilisation de bloqueurs spécifiques pour certaines isoformes de la PKC pourrait s'avérer utile pour discriminer le sous-type de PKC impliqué dans l'effet que nous observons. D'autre part, même si nous avons précédemment montré que la neurotensine

induit une augmentation du calcium intracellulaire, nous n'avons pas déterminé si l'effet de la neurotensine sur la fonction du récepteur D2 est dépendant de ce recrutement calcique. Comme le calcium peut activer plusieurs enzymes il est possible que cet influx calcique agisse aussi sur la fonction du récepteur D2. L'activation de certaines isoformes de la PKC est dépendante du calcium. En effet, les sous-types PKC β et PKC γ sont dépendants du calcium et sont présents dans le cerveau (Way et al., 2000); ils sont donc de bons candidats pour expliquer l'interaction entre le récepteur de la neurotensine et l'autorécepteur D2. La détermination de l'isoforme particulière de la PKC qui est responsable de cet effet pourrait donc être initiée par l'investigation du rôle des PKC β et PKC γ dans l'interaction. Pour étudier ces différentes isoformes il existe des souris déficientes pour certaines d'entre elles. Il serait intéressant de voir si l'interaction entre la neurotensine et le récepteur D2 est toujours présente chez ces souris. De plus, certains outils pharmacologiques pourraient permettre la discrimination des isoformes. Les différentes isoformes de la PKC ne possèdent pas toutes des molécules antagonistes spécifiques. Par contre, certaines molécules pourraient s'avérer utiles, comme le LY333531, qui bloque spécifiquement l'activation de la PKC β , une PKC activée par le calcium et présente dans le cerveau (Jirousek et al., 1996).

Implications physiopathologiques de cette interaction

Quelles sont les implications physiologiques de l'interaction entre la neurotensine et la fonction du récepteur D2? Comme nous l'avons montré, le blocage de la fonction du récepteur D2 n'est pas responsable de l'effet excitateur de la neurotensine, puisque le sulpiride, un antagoniste du récepteur D2, ne bloque pas cet effet excitateur. Par contre, ceci n'exclue pas que le blocage de la fonction du récepteur D2 par la neurotensine puisse favoriser l'effet excitateur de la neurotensine. En effet, en augmentant le niveau d'excitabilité du neurone, la neurotensine pourrait induire une augmentation de la relâche somatodendritique de dopamine, laquelle peut activer non seulement les autorécepteurs D2,

mais aussi potentiellement certains hétérorécepteurs D2 présents aux afférences excitatrices des neurones dopaminergiques (Koga and Momiyama, 2000). Il se pourrait que, *in vivo*, la relâche endogène de dopamine soit plus grande que dans une tranche et que, dans ce contexte, le blocage de la fonction du récepteur D2 contribue du moins en partie à l'effet excitateur de la neurotensine.

La neurotensine est par ailleurs reconnue pour produire des effets similaires à ceux que produisent les antipsychotiques. Comme ces molécules sont reconnues pour agir comme antagonistes des récepteurs D2, il est probable que l'action antipsychotique de la neurotensine dans certains modèles animaux s'explique par son action sur le récepteur D2. Ce sujet sera abordé plus en détail dans l'article de revue qui complète cette discussion.

L'interaction entre la neurotensine et le récepteur D2 est réciproque

L'action de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques est réciproque, c'est-à-dire que le système dopaminergique agit lui aussi sur le système neurotensinergique. La plupart des antipsychotiques, qui agissent au niveau moléculaire en bloquant les récepteurs D2, semblent avoir aussi des effets indirects sur le système neurotensinergique. En effet, l'administration aigue d'antipsychotiques tant typiques que atypiques, augmente l'immunoréactivité pour la neurotensine dans le cerveau, de même que l'expression de l'ARNm du précurseur de la neurotensine (Govoni et al., 1980; Kilts et al., 1988; Merchant et al., 1992). De plus, la relâche de neurotensine dans le striatum et dans le noyau accumbens est augmentée par suite de l'administration d'antipsychotiques (Radke et al., 1998). Il faut souligner que le niveau d'expression des récepteurs neurotensinergiques est affecté par l'administration d'antipsychotiques et que l'administration chronique d'halopéridol, un antipsychotique typique, augmente le nombre de sites de liaison pour la

neurotensine dans la SN (Uhl and Kuhar, 1984), ainsi que l'expression de l'ARNm de NTS1 dans la SN et l'ATV (Bolden-Watson et al., 1993).

Implications physiopathologiques de la neurotensine

Le fait que la neurotensine et ses récepteurs soient largement distribués dans différentes régions du système nerveux central permet d'associer ce peptide à diverses fonctions physiologiques et pathologiques. En plus de la modulation de l'activité des neurones dopaminergiques, décrite en détail dans cette thèse, la neurotensine affecte plusieurs autres systèmes de neurotransmetteurs : cholinergique, sérotoninergique, GABAergique et glutamatergique. La neurotensine exerce aussi des effets sur plusieurs systèmes neuroendocriniens et sur des cellules non-neuronales. L'implication du peptide dans des pathologies reliées à ces différents systèmes de transmetteurs et ces différents systèmes est donc évidente.

Au cours des dernières années, plusieurs études ont porté sur l'implication de la neurotensine dans des pathologies comme la schizophrénie, la dépendance aux drogues d'abus, la maladie de Parkinson, la douleur, le contrôle central de la pression artérielle, certains troubles de l'alimentation, certains cancers, des maladies neurodégénératives et l'inflammation. Les données pertinentes sont décrites et discutée en détail dans l'article de revue qui complète la section discussion de cette thèse.

ARTICLE 3

Role of neurotensin in CNS pathophysiology : what is the evidence?

St-Gelais, F., Jomphe, C. and Trudeau, L.-E.

Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal

Journal of Psychiatry and Neuroscience, 2006, 31: 229-245.

Abstract / Résumé

The peptide neurotensin has been studied for more than 30 years. Although it is widely distributed in the central and peripheral nervous system, neurotensin has been more intensely studied in relationship to its interactions with the central dopamine system. A number of claims have been made regarding its possible implication in many diseases of the central nervous system including schizophrenia. In this review we start with a brief description of the basic biology of this neuropeptide and then we reconsider the strengths and the weaknesses of the data that suggest a role for neurotensin in schizophrenia, drug abuse, Parkinson's disease, pain, central control of blood pressure, eating disorders, cancer, neurodegenerative disorders and inflammation.

Le peptide neurotensine est l'objet d'études depuis plus de 30 ans. La neurotensine est largement distribuée dans le système nerveux central et périphérique. Ses interactions avec le système de neurotransmission dopaminergique central ont été étudiées avec détail. Plusieurs suggestions quant à son implication dans diverses maladies du système nerveux central, telle que la schizophrénie, ont été effectuées. Dans cette revue de la littérature, nous débutons par une brève description de la biologie de ce neuropeptide, puis nous considérons ensuite les forces et les faiblesses des données pertinentes quant aux implications de la neurotensine dans la schizophrénie, la dépendance aux drogues, la maladie de Parkinson, la douleur, le contrôle central de la pression artérielle, les troubles de l'alimentation, le cancer, les maladies neurodégénératives et l'inflammation.

1. Neurotensin and neurotensin receptors

Neurotensin (NT) is a 13 amino acid peptide originally isolated in 1973 from bovine hypothalami⁴². This neuropeptide is found in the central nervous system (CNS) as well as in the gastrointestinal tract. However, this review will focus on the CNS effects of NT. Like many others neuropeptides, NT acts as a neuromodulator in the nervous system where its close association between NT and dopamine (DA) systems has been well documented (for review see²²). The neuromodulation of DA transmission by NT raises the possibility that the neurotensinergic system could be implicated in diseases where the common determinant is a deregulation of DAergic transmission such as schizophrenia, drug abuse and Parkinson's disease¹⁸. This review will attempt to provide a summary of current knowledge about NT with special emphasis on the evidence suggesting its implication in CNS diseases.

1.1. Biosynthesis, maturation, release and degradation of neurotensin

Like all neuropeptides, NT is synthesized as part of a larger inactive precursor which also contains neuromedin N (NN), a six amino acid NT-related peptide^{68, 153}. In the rat, the NT/ NN precursor consists of 169-residues¹⁵³ containing four pairs of dibasic residues (Lys-Arg). The endoproteolytic processing of this precursor at pairs of basic residues is mediated by members of the prohormone convertase (PC) family²⁷⁷. The major prohormone convertase involved in this process in the brain is likely to be PC2 since its expression co-localizes with all regions immunoreactive for NT^{306, 307}. Although expression of PC1 and PC5A in the brain is more limited, these endoproteolytic enzymes also have the capacity to process the NT/NN precursor^{247, 307, 308} and could contribute to the regional differences observed in the relative proportions of NT and NN among brain structures¹⁵⁶.

Once processed as an active peptide, NT is stored in dense core vesicles^{16, 337} and released in a calcium-dependent manner^{133, 155, 174}. NT transmission is terminated primarily by cleavage of NT in the C-terminal hexapeptide sequence that accounts for the biological activity of the peptide³⁰⁹. Several endopeptidases belonging to the family of metallopeptidases have also been shown to contribute to the physiological inactivation of NT such as neutral endopeptidase 24.11 (EC3.4.24.11)⁶, angiotensin-converting enzyme²⁷¹, endopeptidase 24.15 (EC3.4.24.15)²¹⁵ and endopeptidase 24.16 (EC3.4.24.16)⁵⁰. However endopeptidase 24.16 is considered the main endopeptidase contributor to the inactivation of NT since it is expressed ubiquitously^{48, 49, 63}.

1.2. Neurotensin localisation in the CNS

NT-producing neurons and their projections are widely distributed in the CNS explaining the wide range of effects of this peptide. In the rat brain, a number of NT-containing neural circuits have been suggested (Figure 1): (1) from cells in the central nucleus of the amygdala to the bed of the stria terminalis²⁹⁶, to the substantia pars compacta³⁰⁵, to the substantia nigra pars reticulata¹⁰⁹, to the nucleus ventromedial of the hypothalamus¹⁵⁸; (2) from the hippocampus projecting through the cingulate cortex to the frontal cortex²³⁹; (3) from the arcuate and paraventricular nuclei of the hypothalamus to the neurointermediate lobe of the pituitary gland¹⁰⁶; (4) from cells in the ventral tegmental area (VTA) to the nucleus accumbens, the diagonal band of Broca, the prefrontal cortex and the amygdala^{147, 264}; (5) from cells in the endopyriform nucleus and prepyriform cortex to the anterior olfactory nucleus, the nucleus of the diagonal band, and the medio-dorsal thalamic nucleus^{131, 132}; (6) from cells in the periaqueducal gray matter (PAG), the parabrachial nucleus and the nucleus of the solitary tract to the nucleus raphe magnus¹⁹; (7) from cells in the preoptic region and the rostral part of the lateral hypothalamus, the rostral part of the lateral septum, the bed nucleus of stria terminalis, the ventromedial ventral pallidum, the dorsal raphe nucleus and the diagonal band of Broca to the VTA³³³; (8) from the subiculum to the mammillary bodies¹⁵⁸; and (9) from the dorsal lateral portion of the bed nucleus of

the stria terminalis to the parabrachial nucleus¹⁹¹; (10) from the striatum to the substantia nigra reticulata⁴⁴, and (11) from the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis to the retrorubral field³³⁴. In addition to neurotensinergic pathways to and from VTA, high concentrations of NT have also been observed in regions associated to DAergic projections such as caudate nucleus, globus pallidus, and putamen^{137, 294} (for a review see²²). At the spinal cord level, NT-containing cells have been found in the substantia gelatinosa¹³⁷.

1.3 Pharmacology of neurotensin receptors

Both central and peripheral actions of NT depend on recognition of the peptide by specific receptors at the plasma membrane of target cells. Three different NT receptors, referred to as NTS1, NTS2 and NTS3/sortilin have been cloned so far³¹⁰ (for review, see^{120, 180}). NTS1 and NTS2 belong to the G-protein-coupled receptor superfamily^{47, 181, 281, 311} and were initially distinguished pharmacologically on the basis of their affinities for NT and their differential sensitivity to the histamine antagonist levocabastine²⁶³.

Indeed, the type 1 NT receptor is often referred to as the high-affinity binding site ($K_d = 0.1 - 0.3$ nM) and is insensitive to levocabastine²⁶³. In rat brain, NTS1 transcripts are located primarily in neurons from septum, substantia nigra, ventral tegmental area, zona incerta, suprachiasmatic nucleus, as well as prefrontal, entorhinal and retrosplenial cortices^{73, 205}. NTS1-containing nerve terminals were seen by immunohistochemical studies in the caudate-putamen, bed nucleus of the stria terminalis, olfactory tubercle, as well as the lateral septum, amygdala, lateral habenula and nucleus accumbens^{29, 83}.

NTS1 is functionally coupled to the phospholipase C (PLC) and inositol phosphate (IP) signalling cascade (for review see^{120, 310}). Other possible signalling could occur through activation of cGMP, cAMP, arachidonic acid production^{40, 100}, MAP kinase phosphorylation^{72, 177, 226} and inhibition of Akt activity¹⁷². NTS1 undergoes agonist-dependent internalization when exposed to its natural agonist neurotensin. This

phenomenon is well documented in neurons and in NTS1-expressing cell lines (review in ¹⁷ see also ^{121, 204, 303}). The effects mediated by NTS1 are usually blocked by its selective non-peptide antagonist SR48692 ¹¹², or by the broad-spectrum antagonist SR142948A ¹¹³ that recognizes both NTS1 and NTS2. The generation of mice lacking NTS1 receptors ^{166, 231} has allowed to attribute to NTS1 the hypothermic, impaired motor coordination, and gastrointestinal motility effects of NT. A role for NTS1 in analgesia has also been suggested ^{224, 256}, but this is still controversial ²³¹.

The NT type 2 receptor (NTS2) has a lower affinity for NT ($K_d = 3-10$ nM) than NTS1 and is sensitive to levocabastine. Unlike its high-affinity counterpart, NTS2 expression is more diffusely distributed throughout the brain. In the rat brain, high densities of NTS2 mRNA and protein were detected in many regions documented to receive a dense neurotensinergic innervation, such as the bed nucleus of the stria terminalis, olfactory bulb, substantia nigra, ventral tegmental area and PAG ^{167, 259, 318}. However, some of the highest concentrations of NTS2 receptor were found in areas devoid of neurotensinergic inputs such as the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum ²⁵⁹, suggesting that endogenous ligands other than NT may activate this receptor ²⁵⁵. At the cellular level, NTS2 expression was initially detected in both neurons ^{27, 318} and astrocytes ^{210, 211, 318}, although recent immunostaining experiments have reported signal only in neurons throughout the brain (Sarret et al, 2003b), a puzzling observation.

The pharmacological and signalling properties of NTS2 are still controversial. In particular, it is unclear whether NT acts as an agonist, inverse agonist or antagonist at this site. Depending upon the species from which the NTS2 was isolated ¹⁸¹ and the cell system used to evaluate signalling (oocytes, CHO cells, COS-7 cells, and HEK293 cells), different results have been reported. The only common result is the agonist action of SR48692 ²⁸, originally described as an antagonist with a higher affinity for NTS1 than NTS2 receptors ^{112, 234, 257, 312, 331}. Additionally, both NT and levocabastine exert a species-dependent agonist (mouse) ¹⁸¹ or antagonist (human) profile ^{234, 312}. Indeed, in cell lines expressing human

NTS2, SR48692 activated Ca^{2+} mobilization or IP formation whereas both NT and levocabastine antagonized this response. The species-dependent pharmacological properties of NTS2 could be linked to differences in the constitutive activity of this ghrelin-family receptor^{127, 234}. The most convincing data supporting an agonist role of NT at rodent and human NTS2 receptors is the ability of NT to produce ligand-induced internalization of receptor-ligand complexes^{27, 102, 257}. This internalization of NTS2 is apparently associated with activation of ERK1/2 but not Ca^{2+} mobilization¹⁰².

The type 3 NT receptor (NTS3) receptor, originally identified as the intracellular sorting protein sortilin, is unique among neuropeptide receptors in that it is a single transmembrane domain receptor of the type I family¹⁸². NTS3/sortilin, like NTS1, binds NT with high affinity once converted to its mature form upon cleavage by furin¹⁹⁷. This receptor is found in neurons, glia and adipocytes^{46, 194, 211}. In the rat brain, regions expressing both high levels of NTS3/sortilin mRNA and protein include the piriform cortex, hippocampus, islands of Calleja, medial and lateral septal nuclei, amygdaloid nuclei, thalamic nuclei, supraoptic nucleus, substantia nigra and Purkinje cell layer of the cerebellar cortex²⁵⁸. NTS3/sortilin has the ability to bind a variety of others ligands in addition to NT such as the receptor-associated protein (RAP)^{221, 285} and lipoprotein lipase (LpL)²⁰⁸. It is thus possible that NTS3/sortilin also subserves non NT-related functions in the mammalian CNS. To date, very little is known about the physiological role of NTS3/sortilin receptor. The strongest evidence that NTS3 can behave as a true NT receptor lies on the recent demonstration that this protein may be involved in the NT-induced migration of human microglial cells via the stimulation of both MAP and PI3-kinase-dependent pathways¹⁷⁸. NTS3/sortilin may also be involved in the growth of certain cancer cell lines⁶² and in the modulation of NT signalling via mediation of NT uptake and degradation^{46, 193, 199}.

In closing, let us mention that a candidate fourth NT receptor has been proposed although little is currently known about its physiological relevance. This receptor, named

SorLA/LR11 is, like NTS3, a single transmembrane spanning region receptor of the type 1 family¹³⁶. In the CNS this receptor is expressed in neurons¹⁹⁶, but its role in the effects of NT remains to be determined. It has otherwise been suggested to regulate the processing of the amyloid precursor protein⁸.

2. Major physiological roles of neurotensin in the CNS

In this review we focus our attention on the roles of NT in the CNS. However it is important to point out that this peptide is also highly expressed peripherally where it acts as a modulator of the gastrointestinal and cardiovascular systems^{26, 214, 260, 321}.

Action of NT on the DA system

2.1.1 Neurotensinergic innervation of DAergic neurons

The interaction between NT and the DAergic system is supported by strong anatomical evidence. Midbrain DAergic neurons located in the VTA, SN and retrorubral field (RRF) are densely innervated by NT-containing axons^{137, 333}. The origin of the NT plexus innervating DA neurons is not fully established, but some of the neurotensinergic input to the VTA originates from the lateral preoptic area and the rostral part of the lateral hypothalamus³³³. The origins of the neurotensinergic fibers innervating the SN and RRF remain controversial.

2.1.2. Effect of NT on DAergic neuron firing rate and DA release

NT increases the firing rate of mesencephalic DAergic neurons and has a depolarizing effect, at least in part via NTS1 activation^{80, 188, 225}. This increase in firing rate is Ca²⁺-dependent and requires IP3 receptor activation²⁷⁵. Since NT modulates the activity of DAergic neurons, it is thus not surprising that NT also modulates DA release. NT has

been demonstrated to modulate DA release from striatal, accumbens nucleus and retinal slices^{15, 65, 125, 213}. Depending on the experimental model and the brain area where it is injected, NT can induce an increase or a decrease in DA release. Using electrochemical detection and a carbon fibre electrode, NT, applied ICV, was found to increase DA levels in the nucleus accumbens²⁴. However, using microdialysis, perfusion of NT in the accumbens nucleus was found to lead to a local decrease in DA release by a GABA_A receptor-dependant mechanism²⁸³. Moreover, microdialysis of antibodies against NT in the cerebral ventricles leads to an increase in DA release in accumbens nucleus³¹⁷. NT could also act to facilitate DA release in the accumbens by decreasing the ability of the D2 receptor (D2R) to mediate presynaptic inhibition at DAergic axon terminals¹⁶⁴. Finally, NT injected in the VTA causes an increase in DA release in the nucleus accumbens¹⁴⁵. This is likely to be explained by the ability of NT to increase the firing rate of DAergic neurons. However, the possible contribution of a decrease in somatodendritic autoreceptor function remains to be evaluated.

2.1.3. Regulation of dopamine receptor function

In addition to its action on the excitability of DAergic neurons, NT can also act to regulate the function of DA receptors. Indeed, there are biochemical and electrophysiological evidence suggesting an interaction with D2R. First, binding experiments showed that NT induces a modest decrease in the affinity of D2R for its agonists^{99, 170, 282, 315}. *In vivo* and *in vitro* studies showed that NT increases D2R K_d value without affecting B_{max}. These results suggest that the function of D2R receptors is affected by NT but the number of functional receptors remains unchanged^{2, 173, 313, 314, 316}. The interaction between NT and D2R was also measured by evaluating DA release in the striatum. Perfusion of NT in this region decreases the ability of DA agonists to inhibit basal DA levels, an observation which is compatible with the existence of some functional interaction between NT and D2R. However, whether this interaction occurs directly on DAergic axon terminals is unclear⁶⁶. Modification of D2R function by NT was also

evaluated electrophysiologically. Indeed, patch clamp recordings suggest that NT and D2R may oppositely regulate a similar potassium conductance in DAergic neurons, thus providing a possible explanation of a NT-D2R interaction⁸¹: NT would increase cellular excitability by inhibiting potassium channels while a D2 agonist would decrease excitability by activating the same channels. According to such a model, NT would thus simply prevent the D2 agonist from activating the potassium channels by independently inhibiting them. However, extracellular recordings of the firing of midbrain DAergic neurons showed that NT is able to reduce the inhibitory effect of D2R agonist, even at concentrations of NT that do not increase firing^{198, 266, 326}. This observation argues against the idea that the interaction depends on the regulation of a common potassium channel by the two receptors

2.2 Action of NT on other neurotransmitter systems

In addition to its widely studied interaction with the DAergic system, NT also affects other neurotransmitters systems.

2.2.1. Evidence for the effect of NT on cholinergic transmission

In the CNS, cholinergic neurons are found in the midbrain, striatum and magnocellular complex of the basal forebrain^{25, 270}. There is evidence for the expression of NT receptors by cholinergic neurons in the basal forebrain and also for neurotensinergic innervation of this structure, suggesting a direct modulation of these neurons by NT^{192, 280, 325}. Anatomical data also suggest that some cholinergic neurons may be modulated indirectly by NT. For example, an indirect modulation of cholinergic neurons is mediated by NT receptors located on DAergic neurons innervating the striatum²⁷⁶. The effect of NT on acetylcholine (ACh) release was also studied and it was shown that NT increases K⁺-evoked ACh-release in striatal brain slices¹⁶³. However, contradictory result has been obtained by *in vivo* microdialysis in the striatum, where no effect of NT on ACh release was detected²¹². The effect of NT on ACh release in the cortex also seems to be complex.

It was reported that NT depresses ACh release in frontal cortex slices, has no effect in the occipital cortex and has a potentiating effect in the parietal cortex¹⁶². Electrophysiological experiments showed that in cholinergic neurons of the basal forebrain magnocellular complex, NT produces depolarization and rhythmic bursting^{7, 41, 141}. The same result has been obtained in cholinergic neurons of the medial septum and vertical limb of the diagonal band nuclei¹⁷⁹. NT-induced excitation has been associated in nucleus basalis of Meynert cholinergic neurons to a reduction in inwardly rectifying K⁺ conductances⁸².

2.2.2. Effect of NT on serotonergic neurotransmission

There is anatomical data suggesting interaction between NT and serotonergic neurons. Indeed, neurons of the rostral part of raphe synthesize NT while NT receptors are widely expressed in most of the raphe^{58, 150, 157, 259}. Much of the raphe nuclei also receive significant neurotensinergic innervation^{293, 320}. There is physiological evidence for the presence of NTS1 on serotonergic neurons. Indeed, a subpopulation of serotonergic neurons located in the nucleus raphe magnus and in the dorsal raphe, respond to NT by an increase in their firing rate, an effect that is blocked by SR48692^{138, 169}. The functional role of NT in the raphe remains to be determined, but it may participate in the modulation of some of the known functions of the serotonergic system including nociception³⁷, sleep-wakefulness cycle regulation¹³⁹ and stress-related responses⁵⁹.

2.2.3. Effect of NT on GABAergic neurotransmission

The activity of GABAergic neurons evaluated either by measuring firing rate or by sampling extracellular GABA can be increased by NT in the hippocampus, striatum, prefrontal cortex and globus pallidus^{95, 212, 223, 230}. Other studies showed that NT decreases GABA release both in the SN and the ventral thalamus by a D2R-dependent mechanism⁹⁷. These effects were counteracted by SR48692 suggesting that they were mediated by NTS1. Such an increase in GABA release could result in a number of indirect effects. For example, NT-mediated GABA release in the striopallidal pathway inhibits pallidal

GABAergic neurons projecting to the subthalamic nucleus, resulting ultimately in an increase in glutamate release⁹⁴.

2.2.4. Effect of NT on glutamate neurons

NT increases glutamate release in some brain regions such as the striatum, globus pallidus, frontal cortex and the SN^{94, 96, 97, 253}. Considering that an excess of glutamate can induce excitotoxicity within the context of conditions such as stroke, Alzheimer's and Parkinson's disease, it is interesting to note that NT can enhance glutamate excitotoxicity in both mesencephalic and cortical neurons^{9, 10}. In addition to enhancing glutamate release, NT can modify the function of glutamate receptors. Indeed, NT amplifies NMDA-mediated signals by a PKC-dependent mechanism⁹. Stimulation of the NMDA receptor is well known to mediate glutamate-induced excitotoxicity leading to apoptotic cell death or necrosis^{51, 54}. NT can increase the number of apoptotic cells induced by glutamate exposure⁹.

2.3 Neuroendocrine effects of NT

One of the major central functions of NT is to regulate neuroendocrine systems (for review see²⁴⁶). A number of essential nuclei implicated in hormone secretion and regulation such as the arcuate nucleus, the parvocellular division of the paraventricular nucleus and the periventricular nucleus of the hypothalamus as well as the pituitary receive neurotensinergic projections and express NT binding sites^{106, 184}. NT influences neurons that synthesize and secrete gonadotropin-releasing hormone, somatostatin and corticotrophin releasing factor (CRF)²⁴⁸. In addition to neurotensinergic projections arriving from other regions, NT is synthesized in some hypothalamic secretory cells located for the most part in the arcuate and paraventricular nuclei^{154, 187}. It appears that NT produced locally contributes to the regulation of the release of some neuromodulators and hormones such as CRF, galanin, enkephalin, cholecystokinin and growth hormone-releasing hormone^{45, 207} and could thus be implicated in stress-related functions²⁰⁹.

Compatible with this, chronic delivery of SR48692 to the paraventricular nucleus of the hypothalamus attenuated stress-induced elevations of the release of corticosterone and ACTH ²⁴⁹. In addition, there is a mutual regulation between NT and neuroendocrine systems since androgen, estrogen, glucocorticoid and thyroid hormone affect NT synthesis in the hypothalamus and anterior pituitary ^{206, 262, 322, 324}.

2.4 Action on non-neuronal cells

In addition to its action on neurons, NT has been reported to affect glial cells such as astrocytes and microglia. Effects of NT on astrocytes are supported by the fact that these cells express NT-binding sites in many brain areas such as the midbrain, cortex, striatum, brain stem and spinal cord ^{128, 129}. The subtype of NT receptor expressed by these cells is presently unclear. A functional study on cultured VTA astrocytes showed that the calcium increase induced by NT was partly sensitive to SR48692 and was not mimicked by the NTS2 agonist levocabastine ²⁹⁰. This result suggests that astrocytes express NTS1 but also that another undefined receptor could perhaps also be present on these cells. Other studies, using embryonic rat midbrain and postnatal cerebral cortex cell cultures showed that NTS2 was expressed by a subpopulation of glial cells and that NTS2 expression was increased in reactive astrocytes ^{206, 210, 211}. Compatible with the idea that NT receptors are expressed by a subpopulation of astrocytes, it was reported that while NT-induced intracellular Ca^{2+} mobilization can be detected in approximately 30% of primary mesencephalic astrocytes, this response is absent from purified adherent astrocytes from the same region ²⁷⁵. Single-cell RT-PCR experiments from acutely dissociated astrocytes as well as double in situ hybridization experiments at different developmental time points would be useful to clarify the expression pattern of NT receptors in astrocyte subpopulations. The physiological role of NT receptors in astrocytes remains largely unknown. However, since there is increasing data suggesting the involvement of astrocytes-derived messengers in regulating neuronal activity and synaptic transmission ^{123, 203}, future work would be required to directly investigate the hypothesis that NT induces the release of chemical messengers from

astrocytes, thus indirectly regulating neurons in the mesencephalon or other structures. Interestingly, it was recently shown that although NT-induced Ca^{2+} mobilization in astrocytes is not necessary for the excitatory effect of NT on midbrain DAergic neurons in culture, this excitation is enhanced when neurons are grown together with NT-responsive astrocytes²⁷⁵.

Finally, NT also affects the activity of microglial cells. More specifically, NT elicits the migration of a microglial cell line by a NTS3-dependent process. It was also shown that ERK1/2 and PI3-kinase intracellular pathways are implicated in this effect¹⁷⁸. Such results suggest that NT plays a role in cellular responses to inflammation or brain lesion since microglia motility is very important for these processes.

3. Role of neurotensin in schizophrenia?

Based on a growing literature suggesting the existence of anatomical and physiological interactions between NT and the mesolimbic DA system, Charles Nemeroff published 25 years ago an influential paper entitled “Neurotensin, perchance an endogenous neuroleptic?”²⁰⁰. This much-cited paper introduced the bold suggestion that NT could act to inhibit DA neurotransmission, much in the same way as antipsychotic (or neuroleptic) drugs. It also proposed that perhaps schizophrenia symptoms result in part from a deficit in brain NT, leading to excessive DA neurotransmission. Here we will briefly reconsider this hypothesis and ask whether there is sufficient data to support it.

First, what is the evidence supporting an intimate relationship between DA and NT? As stated previously, NT is indeed found to be abundantly expressed in the ventral midbrain in an intricate network of thin fibres. In addition, NT binding sites and NT receptors are expressed in high numbers by DA neurons. These basic observations certainly are in agreement with the idea that NT is a key regulator of the DA system. However, it is

important to remember that NT is also abundant in a number of additional nuclei in the brain and unless a deficit in NT was restricted to the ventral midbrain or to the regions receiving the densest DA projections, a disease implicating a decrease in NT would be expected to be accompanied by a large variety of symptoms not restricted to those found in schizophrenia.

A first argument in favour of the role of NT as an endogenous antipsychotic-like compound is that animal studies have showed quite convincingly that injections of NT in the VTA or in projections areas such as the nucleus accumbens cause effects that are similar to those of acutely applied antipsychotic drugs. For example, when injected in the VTA, both NT and antipsychotic drugs increase the firing rate of DA neurons^{126, 225}. Similarly, both NT (indirectly) and antipsychotics (directly) inhibit D2R function when injected in the nucleus accumbens^{66, 99, 164, 170, 173, 282, 313, 315, 316}. At the behavioural level, both agents cause sedative-like effects and muscle relaxation as well as hypothermia and vacuous chewing movements (reviewed in^{69, 152}). Dissimilarities have also been reported, so it would be fair to conclude that the match is not perfect. However, some of the reported differences could be dose-related. For example, at low doses NT may decrease D2 receptor function, thus leading to a partial disinhibition of DA signalling. However, at higher doses, NT apparently has additional effects that are unrelated to a decrease in D2 receptor function. For example, it directly depolarises DA neurons by activating cationic channels, an effect that antipsychotic drugs do not have⁵².

A second and arguably the most direct argument for a role of NT in schizophrenia is that a number of published studies, all of them emanating from Nemeroff and collaborators, report that cerebrospinal (CSF) fluid NT levels are lower in a subgroup of schizophrenic subjects than in controls^{35, 101, 171, 175, 201, 265, 327}. What in fact has been observed is that CSF NT levels are lower in a subgroup of non-medicated schizophrenia patients that are most severely affected, with an inverse correlation between symptom severity and NT levels. In addition, in some of the studies, a partial normalization of CSF NT levels was noted in

response to antipsychotic drug treatment, although there was no correlation between recovery of NT levels and extent of symptoms improvement¹⁷¹. It should also be noted that in one post-mortem study, an increase in cortical NT levels was detected in schizophrenia patients²⁰². Although the finding of reduced CSF NT levels appears to be a reproducible observation, no reports replicating this work have yet to come from other laboratories. The results also have to be interpreted with caution. First, all the data come from CSF measurements and the relationship between CSF and brain NT levels is unclear, in part because part of the signal could reflect spinal cord levels. Second, the finding of reduced CSF NT levels is limited to a subgroup of patients; group comparisons have failed to find an overall decrease in CSF NT levels when all patients were considered. Finally, although the hypothesis of a link between compromised brain NT and schizophrenia is attractive, an alternate hypothesis is that NT levels are lower in some non-specific manner in the most severely affected non-medicated patients because of a generalized decrease in cognitive activity. If this were true, then perhaps the CSF and brain levels of a number of markers of neuronal activity will be found to be lower in the most severely affected patients. Antipsychotic drug treatment would then act indirectly to increase NT levels by promoting partial recovery of cognitive activity by reducing positive symptoms.

But then again, the possibility that antipsychotic drugs act at least in part by restoring brain NT levels should not be lightly considered since most antipsychotic drugs have been reported to increase the expression of NT mRNA in the ventral and dorsal striatum^{185, 186, 229, 330} (but see¹⁹⁰). If this hypothesis is correct, then one would expect that NT receptor antagonists could actually have negative effects on the symptoms of schizophrenia patients. Although NT receptor antagonists have been explored for many years by pharmaceutical companies, to date, the results of only one clinical trial reporting the effect of a NT receptor antagonist (SR48692) on schizophrenia has been published. In that report, no significant effect of the antagonist was found¹⁸³. Based on the original hypothesis of a NT deficit in schizophrenia, some have proposed that NT receptor agonists hold more promise as potential antipsychotic drugs^{31, 61, 90, 235, 254}. A limited number of

such agonists have been developed and some are reportedly able to cross the blood-brain barrier^{32, 86, 235, 291, 301}. No clinical trial using such agonists in the treatment of schizophrenia has yet been reported, but animal studies have shown that NT or some of these systemically-active agonists can display an antipsychotic-like profile^{33, 61, 85, 86, 90, 115, 222, 235, 254, 268}. For example, a number of animal studies, many of which studying pre-pulse inhibition (PPI) of the startle reflex as a model of sensorimotor gating deficits in schizophrenia, have confirmed possible links between NT and DA in such schizophrenia-relevant paradigms. Injection of NT in the nucleus accumbens, but not in the VTA, reduces the ability of amphetamine to perturb PPI in the rat^{40, 87, 90} (but see⁸⁹). This observation is compatible with the idea stated above that NT acts in the DA target structures to reduce DA signalling. In addition, a centrally active NT agonist administered sub-cutaneously produced a similar effect^{40, 88} (but see²⁴¹ for a psychostimulant-like effect of centrally-administered NT, suggesting that at certain doses, NT could also act to enhance DA-dependent behaviours). Although not tested in a PPI paradigm, a recently developed NTS1 ligand, KH28, was reported to reduce amphetamine-induced hyperlocomotion¹¹⁵. Compatible with the idea that a deficit in NT could influence PPI, the NT receptor antagonist SR142948A prevented the ability of the antipsychotic haloperidol to reduce isolation-rearing-induced perturbation of PPI²¹. Finally, PPI is disrupted in NT knockout mice¹⁵¹. Such results, although far from proving a link between NT and schizophrenia, nonetheless can be taken as arguing in favour of the biological plausibility of this hypothesis.

Beyond clinical trials with NT agonists, it will not be easy to pursue further in human patients the hypothesis of a link between NT and schizophrenia. There is currently no approach to measure brain NT levels in living humans and no association between schizophrenia and mutations or polymorphisms in NT or NT receptor genes have been reported¹².

4. Implication of NT in drug abuse?

A possible implication of NT in drug abuse has been studied for close to 25 years⁷⁶. The primary drive for this hypothesis is based on the similarities between some of the effects of NT and some of the effects of psychostimulant drugs. This work has been somewhat controversial, in large part because the effect of NT depends on many parameters such as the dose used, the injection procedure and localization, as well as the experimental model or species used. As mentioned in previous sections, injection of NT in the nucleus accumbens tends to reduce some behavioural effects of psychostimulant drugs. However, the psychostimulant-like actions of NT occur when the peptide is injected in the VTA¹⁴⁸. For example, intra-VTA injections of NT in the rat increase locomotor activity and elevate DA release in the nucleus accumbens^{143, 144, 148, 161, 273}. This is compatible with the localization of excitatory NT receptors on VTA DA neurons that give rise to the mesocorticolimbic pathway²¹⁷, as mentioned previously. NT could thus produce psychostimulant-like effects when injected in the VTA simply by enhancing the firing of DA neurons, leading to elevations of extracellular DA in the nucleus accumbens. NT can also increase the firing of SN DA neurons¹⁸⁸ and cause an elevation of glutamate levels in this structure^{97, 326}.

Moreover, NT presents other psychostimulants characteristics. When injected in the rat VTA, NT acts as a primary reinforcer in the conditioned place preference paradigm¹⁰⁵ and can be self-administered¹⁰⁴. In rats, NT potentiates brain-stimulation reward^{14, 243-245}. When injected intracerebroventricularly, NT also sensitizes rats to the locomotor activating effects of amphetamine²⁴² and increases the sensitivity of mice to ethanol^{77, 195}. Moreover, systemic administration of the NT receptor antagonists SR48692 and SR142948A reduce sensitization to amphetamine, suggesting that endogenous NT could play some role in this drug-induced long-term plasticity^{218, 219, 240}. Whether NT specifically in the VTA is critically involved is less clear. In fact, psychostimulants such as cocaine and amphetamine cause an increase in NT mRNA expression in the striatum and the nucleus accumbens^{1, 20}.

^{114, 335}, areas where NT has been shown to decrease the effects of psychostimulants. Interestingly, an increase in NT immunoreactivity after methamphetamine or cocaine administration has also been reported in the SN ^{116, 168}, but no data is available for the VTA. Amphetamine and metamphetamine also increase NT levels in the medial prefrontal cortex ¹²². Finally, it should be noted that rhesus monkeys can reportedly not be trained to self-administer the centrally active NT receptor agonist NT69L intracerebroventricularly ⁷⁹. Also, NT reduces bar-pressing for food rewards ¹⁴⁹. Together, these results nonetheless suggest that NT may play a role in the effects of psychostimulants, but the mechanism involved is unclear.

If the major cellular mechanism of the psychostimulant effect of NT is increased DA neuron firing, an open question is the specific mechanism involved. As stated previously, NT can activate cationic channels and inhibit potassium channels, thus directly depolarizing DA neurons. This could perhaps be sufficient to explain the increase in firing rate. However, inhibition of somatodendritic D2 autoreceptors by NT could also be involved. Experiments directly addressing this issue are required.

A final and obviously critical question is whether NT is involved in direct drug effects or drug addiction mechanisms in humans. Currently, very little data has been published. In one study, no association was found between a polymorphism in the proneurotensin gene and alcohol dependence in a Finnish population ³⁰². In summary, although cumulating animal research argues in favour of the implication of NT in drug abuse mechanisms, essentially no data is available in humans. The possibility of using NT receptor ligands as possible pharmacological tools to treat drug addiction ²³⁵ can thus be considered promising but perhaps a bit premature.

5. Implications of NT in Parkinson disease?

Parkinson's disease (PD) results from a progressive loss of nigrostriatal DAergic neurons. The decrease in striatal DAergic innervation due to this loss is responsible for motor disturbances characteristic of the disease such as akinesia, muscular rigidity and tremor. The close relation between NT and DAergic system suggests that NT could be associated with PD.

Numerous studies tried to determine if PD is associated with changes in the neurotensinergic system. Biochemical and histological studies made on brain tissues from patients who died from PD showed a decrease in the number of NT-binding sites in the SN, VTA, caudate nucleus, putamen and globus pallidus compared to normal patients^{53, 91, 250, 297}. Using *in situ* hybridization it was also possible to show more specifically that NTS1 mRNA was decreased in the substantia nigra of parkinsonian subjects³³². PD can be partly mimicked in animal models by destroying the nigrostriatal pathway using toxins such as MPTP or 6-OHDA. In these PD animal models, there is a decrease in the number of NT-binding sites in the striatum and SN^{110, 217, 284, 323}. In SN, the decrease in NT-binding sites number surely is the result of the loss of DAergic neurons which express NT receptors. However, the interpretation of the decrease in NT binding sites in striatum is not that straightforward. Indeed, contradictory results concerning the exact localization (pre or postsynaptic) of NT receptors have been obtained in striatum. In some studies, it was reported that almost all NT receptors within the striatum were located on DAergic terminals^{38, 227} while others reported that NT receptors were mostly expressed by striatal intrinsic neurons^{106, 124, 284}. Another study showed that the decrease in NT receptors in monkey striatum treated with MPTP is smaller than the decrease in DA concentration, suggesting only a partial localization of NT receptors on nigrostriatal projections¹¹⁰. The same result was obtained comparing the presence of NT receptors and the DA content in post-mortem brain tissues from Parkinson's disease patients^{53, 91}. The decrease in striatal NT binding sites may not be only due to the loss of NT receptors on DAergic neurons but could be the

result of an effect on striatal neurons themselves. More anatomical studies should be done to determine if NT receptors expressed by striatal medium spiny neurons are specifically decreased in PD.

In addition to the quantification of NT binding sites, the concentration of tissue NT has also been measured in order to determine changes induced by PD on the neurotensinergic system. It has been shown that plasma NT concentration is higher in parkinsonian patients compared to control patients and also higher in untreated patients compared to levodopa-treated patients²⁶¹. Studies made on post-mortem brains further showed that NT levels remain unchanged in PD compared to normal patients in the caudate nucleus, putamen and globus pallidus, while they were higher in substantia nigra compacta and reticulata^{23, 93} and decreased in the hippocampus²³. Whether the increase in NT concentration in the SN is causally related to PD or whether it results indirectly from the loss of DA neurons or to drug therapy is not easy to determine. Indeed, since most PD patients are subjected to drug therapy, it is thus difficult to evaluate plasma NT concentration in non-medicated patients. However, it is interesting to compare PD to incidental Lewy Body disease. The presence of Lewy bodies in the brain is correlated with SN cell death even if the decrease is smaller than in PD^{84, 103} and is considered to represent the PD presymptomatic phase⁹⁸. These patients do not show any pathological symptoms and so do not receive medication. Interestingly, there is an increase in NT content in the post-mortem brain of patients afflicted by Lewy Body disease, even though the effect is not as large as in PD⁹². To the very least, this finding suggests that the increase in NT in PD is probably not secondary to pharmacotherapy.

In addition to human brains, NT levels were also measured in PD animal models and surprisingly, opposite results have been obtained. In 6-OHDA-lesioned rats, NT-immunoreactivity is increased in the striatum and globus pallidus while no change occurs in the substantia nigra^{75, 287}. In MPTP-lesioned monkeys, no change in NT concentration was

found in the striatum²⁸⁶. In this same model, a previous study did not show any change in NT in the SN and striatum⁵.

Although the relationship between NT and PD is not fully elucidated presently, one can speculate that the increase in NT levels observed in the human PD brain is the result of an adaptive mechanism in reaction to the loss of NT receptors and DAergic neurons. This increase in NT concentration could represent an attempt of the system to increase DAergic drive by stimulating the remaining NT receptors on DAergic neurons. Within this context, an obvious question is whether NT agonists could be useful as adjunctive treatment of PD. Some studies have indeed shown that exogenous NT can display antiparkinsonian properties in 6-OHDA-lesioned animals. In fact, intracerebroventricular administration of NT or some of its analogs results in attenuation of muscular rigidity and tremors observed in these animals^{140, 238}. Also in 6-OHDA lesioned rats, the NT agonist NT-69L has an antiparkinson-like effect since it blocks rotating behaviour induced by D-amphetamine and apomorphine³⁴. The exact mechanism of this NT-induced antiparkinsonian-like effect has not yet been determined. Based on the previously mentioned ability of NT to decrease D2R receptor function in the striatum, the use of NT receptor antagonists in the treatment of PD has also been considered. Administration of the NTS1 antagonist, SR48692 has been shown to enhance striatal DAergic transmission⁶⁶. However, a clinical trial with SR48692 in PD patients showed no improvement of symptoms¹⁸⁹.

In conclusion, although no data is currently available to support a direct, causal role of NT in PD, some interesting correlative evidence has been obtained and some promising recent studies on animal models support the potential role of NT agonists in the symptomatic treatment of PD.

6. Implication of NT in pain mechanisms?

The implication of NT in analgesia has been studied for many years⁵⁶. A high density of NT receptors is present throughout the PAG and the rostral ventromedial medulla (RVM), two structures implicated in descending nociceptive circuits^{4, 29, 37, 295}. NT has analgesic effects that are naloxone-independent and consequently not dependent on opioids⁵⁷. The antinociceptive effect of NT has been reported after injection of the peptide in the many brain areas as well as intracisternally²¹⁶, intrathecally¹³⁰, intracerebroventricularly²²⁰ or directly in areas rich in NT innervation such as the amygdala, medial preoptic area, thalamus, PAG and nucleus raphe magnus³⁰⁰. The location of the injection site can modify the intensity of the response to NT. Indeed, when injected in the central part of the amygdala, NT induces analgesia and increases hot plate response latency more effectively than if injected intracerebroventricularly¹⁴⁶. Compatible with the possible implication of endogenous NT in pain suppression mechanisms, a microdialysis study showed that NT is endogenously released in the PAG in mice after unilateral hindpaw inflammation using Complete Freund's Adjuvant³²⁹.

Analgesic effects of NT have been widely reported, but in most of these studies, relatively high concentrations of NT were used. Studies performed using lower, perhaps more physiological concentrations, suggest that NT may actually induce hyperalgesia instead of analgesia. Such a phenomenon is observed when picomolar range concentrations (0,03 to 0,3 pmol) of NT are injected in the RVM, although injections at higher doses in the same nucleus induce analgesia^{272, 298-300}. In addition, infusion of SR48692 in the RVM or intraperitoneal injection of this compound facilitates analgesia, therefore suggesting a hyperalgesia function for endogenous NT^{111, 272, 298}.

Both NTS1 and NTS2 appear to be implicated in NT-induced analgesia. The first studies on NT receptor subtypes mediating analgesia showed that the analgesic effect of NT was mediated by a subtype of receptor that is pharmacologically distinct from the

previously characterized high affinity levocabastine-insensitive receptor and low affinity levocabastine-sensitive receptors^{3, 160}. Different results were obtained when suitable antagonists for the different receptors became available. Indeed, SR48692, a relatively selective antagonist of NTS1 when used at low doses, had no effect on NT-induced analgesia which suggested that another NT receptor subtype, presumably NTS2, was responsible for the phenomenon⁷⁰. A subsequent study showed that levocabastine, a NTS2 agonist, displays an analgesic effect⁷¹. However, another study showed that SR48692 inhibits NT-induced analgesia with complex multiphasic dose-response characteristics²⁷² suggesting the implication of more than one NT receptor subtype. A recent study also argues for the implication of NTS1, in addition to NTS2, in the analgesic effect of NT²⁵⁶. Indeed, it was shown using the tail-flick test, that in addition to NT, the two NTS2 agonists levocabastine and JMV-431 both induce an antinociceptive response. However, the antinociceptive effect of NT was partly abolished by co-administration of SR48692, suggesting that in addition to NTS2, NTS1 also plays a modest role. Using NTS1 knock-out mice it was also possible to show that this receptor indeed plays a role in at least some kinds of painful stimuli since these mice present a defect in NT-induced analgesia in the hot-plate test²²⁴, while no modification occurs in another nociceptive test, such as the phenyl-p-benzoquinone (PBQ)-induced writhings²³¹. Concerning hyperalgesia, it has been shown that endogenous NT facilitates visceral pain response since in NT KO mice and in SR48692-treated rats there is attenuation of visceral nociception¹¹¹. The fact that both NTS1 and NTS2 are implicated in the central role of NT in pain control is compatible with the fact that both receptors are expressed in the PAG and raphe nuclei^{37, 259}.

Taken together, the published data are thus compatible with a role of NT in pain mechanisms. Further evaluation of the possible use of NT agonists or antagonists as analgesic compounds thus seems warranted. Compatible with this, the NT analog NT69L has been reported to cause a rapid and persistent antinociceptive effect as determined by the hot plate test²⁹².

7. Possible implication of neurotensin in other diseases

NT is widely distributed in the brain and is known to affect many neurotransmitter systems. Growing evidence suggests that NT is associated with different pathologies in addition to those directly related to the DAergic system discussed up to now.

7.1. Implication of in the central control of blood pressure

Hypotension was the first reported physiological effect of NT⁴². A possible role of this peptide in hypertension would thus not be surprising. In anaesthetized rats, NT injected intracerebroventricularly induces hypotension while a smaller decrease is observed in non-anaesthetized rats^{228, 237}. The NT receptor antagonist SR142948A is more effective than SR48692 to block this effect²⁶⁰. The nucleus of the solitary tract (NST) plays an important role in the central control of arterial pressure since it receives signals from baroreceptors and chemoreceptors of the cardiovascular system. NT injected into the NST causes a decrease in blood pressure^{55, 159}. NT69, a neurotensin receptor agonist that crosses the BBB induces hypotension⁷⁸. Opposite results were reported with conscious rats in which an intracerebroventricular injection of NT induces hypertension^{135, 267, 279}. Results obtained in these different studies are thus conflicting and the cause of this discrepancy remains unknown. However, we can speculate that differences in the site of injection or in anaesthesia may account for this. Nonetheless, the results presented here are clearly compatible with some role for NT in central regulation of blood pressure. In addition to these results obtained using NT injections, it has been shown that in spontaneously hypertensive rats, there is a decrease in NT concentrations in many brain areas implicated in blood pressure regulation such as the hypothalamus, medulla oblongata pons, pituitary and spinal cord²⁶⁹. Interestingly, suprachiasmatic nucleus neurotensin contents are greatly decreased in hypertensive patients compared to control¹⁰⁸. The use of NT receptor knock-

out mice would perhaps help to clarify the implication of NT in arterial pressure but changes in blood pressure have apparently not yet been evaluated in such animals.

7.2. NT and eating disorders

Food intake is controlled in part centrally by the hypothalamus, which is the site of integration of multiple signals such as hormones, neurotransmitters and peptides. Among them, NT is known to reduce food intake. Indeed, NT injected in the VTA or in the ventromedial part of the hypothalamus induces a decrease in food intake^{39, 118}. There are also changes in NT expression in animals presenting eating disorders. Indeed, NT expression is increased in the hypothalamus of anorexic animals²³⁶. NT interacts with other food intake regulators such as leptin, a hormone produced by adipose tissues that reduces food intake. Indeed, administration of leptin increases hypothalamic NT expression in normal rats²⁵¹ as well as in hypothalamic cell lines *in vitro*⁶⁰. In addition, the NTS1 antagonist SR48692 appears to reverse leptin's action on satiety²⁵². The expression of NT is also down-regulated in animal models lacking leptin³²⁸. Other evidence for a role of NT in food intake comes from results obtained with NTS1-deficient mice (NTS1^{-/-}) which show a small increase in body weight compared to control²³¹. Pharmacological studies also support a role of NT in body weight homeostasis. The NT analog, NT69L reduces body weight and food intake in normal and obese rats³⁰. These results are promising with regards to the possible use of NT ligands as therapeutic drugs in eating disorders.

7.3. NT and cancer

NT expression arises early in embryonic development and it has been suggested that it could thus play a role in cell cycle regulation^{117, 119}. Compatible with this hypothesis, NT has been associated with progression and differentiation of tumours in the periphery and central nervous systems²³³. The implication of NT in cancer has been studied extensively in the periphery where it has been shown that the size of some colon or lung tumours increases in the presence of NT^{64, 176} and become smaller in the presence of the NTS1

antagonist SR48692^{134, 176}. The presence of NTS1 has been reported in human tumours of the ovary, pancreas, prostate and Ewing's sarcomas, as well as centrally in meningiomas and astrocytomas^{74, 232, 233, 319}. The transcription of the NTS1 gene is also apparently increased in human colonic adenomas²⁷⁴. In dividing human neuroblastoma (CHP 212) and murine neuroblastoma (N1E-115) cells, it has been reported that during prolonged NT agonist stimulation, NTS1 receptors are recycled to the cell surface, thus allowing constant cell sensitization and chronic activation of mitogen-activated protein kinases p42 and p44²⁸⁹, compatible with a potential role in oncogenic regulation.

A possible implication of NTS3 in cancer has also been explored. Indeed, NTS3 and NTS1 are present in almost all cancer cells from prostate, pancreas and colon^{62, 177}. However, no data has yet showed the presence of NTS3 in central tumours. Little is known about the signalling pathways activated by NTS3, but the receptor is present inside the cell in close proximity to the nucleus¹⁹³. This characteristic gives NTS3 a good profile for being a candidate in mediating NT-induced proliferative signals. Considering the strong evidence in favour of a role of NT in peripheral tumours, it would seem that additional efforts should be directed toward a better comprehension of the role of NT in cancers of the CNS.

7.4. Neurodegenerative disorders and stroke

There is currently little evidence for a role of endogenous NT in neurodegenerative disorders or stroke. A possible implication of NT in neurodegenerative disorders is nonetheless suggested by the finding that in the suprachiasmatic nucleus of Alzheimer's patients there is a significant decrease in NT containing neurons²⁷⁸. Due to the lack of conclusive evidence, it is nonetheless difficult to know whether NT can directly contribute to neurodegenerative diseases. However, NT enhances glutamate-induced excitotoxicity through NTS1 activation as suggested by the blockade of this effect with SR48692¹⁰. In sharp contrast, others have suggested that NT reduces neuronal death and infarct volume in experimental ischemia models^{13, 288}. This protective effect of NT could be partly explained

by the ability of this peptide to induce hypothermia, a condition that is well-known to be neuroprotective against ischemia-induced central infarcts ¹¹.

7.5. NT and inflammation

Findings both in and outside the nervous systems have long supported a role of NT in inflammation, acting as a pro-inflammatory cytokine. It was first described that peripheral NT elicits inflammatory symptoms such as vasodilatation, enhanced vascular permeability, mast cell degranulation, and enhancement of directional migration and phagocytosis of neutrophils ¹⁰⁷. NT was later shown to enhance the production of IL-1 by activated alveolar macrophages ¹⁶⁵. In the gastrointestinal tract, a tissue rich in NTS1, NT has been involved in the pathophysiology of colonic inflammation ⁴³. NT is also known to stimulate IL-8 secretion and IL-8 gene expression in human colonocyte cells ³³⁶. Although NT is usually thought to be pro-inflammatory, an opposite effect has been recently described in chronic inflammatory damage induced by dextran sodium sulfate in mice. In this model, NTS1 activation has shown to stimulate intestinal wound healing through a COX-2 dependent pathway ³⁶.

The first evidence about the involvement of NT in immune responses in the CNS was provided by the finding that the endotoxin lipopolysaccharide is able to induce the expression of NT mRNA in CRH neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus ¹⁴². Based on this work, it has been speculated that NT may be released in the pituitary portal blood to trigger pituitary responses associated with mobilization of the immune system. More recently, it has been shown that NT also induces expression of several cytokines/chemokines including IL-1 and MIP-2 in microglia cells, which are otherwise known to express only the NTS3 receptor ⁶⁷, thus supporting the involvement of NTS3 in CNS inflammation. Finally, it is interesting to note that descending inhibition and facilitation during peripheral inflammation are due in part to inflammation-induced changes in the rostral ventromedial medulla that involve NT and glutamate receptors ³⁰⁴. In spite of the scarce evidence about a role for NT in CNS inflammation, speculations have risen

about the possibility that a NT proinflammatory stimulus acting through microglia cells could contribute to brain inflammation in degenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's diseases.

8. Future challenges and conclusions.

Together, the results presented in this brief review demonstrate that although endogenous NT has not been conclusively demonstrated to be causally involved in any one CNS disorder, there is a trail of evidence arguing for its implication in many. Among those, drug dependence, pain and cancer appear as the most promising. Future work using genetically modified animals, gene down-regulation strategies and new centrally active pharmacological ligands should continue to advance our understanding of the role of NT in health and disease.

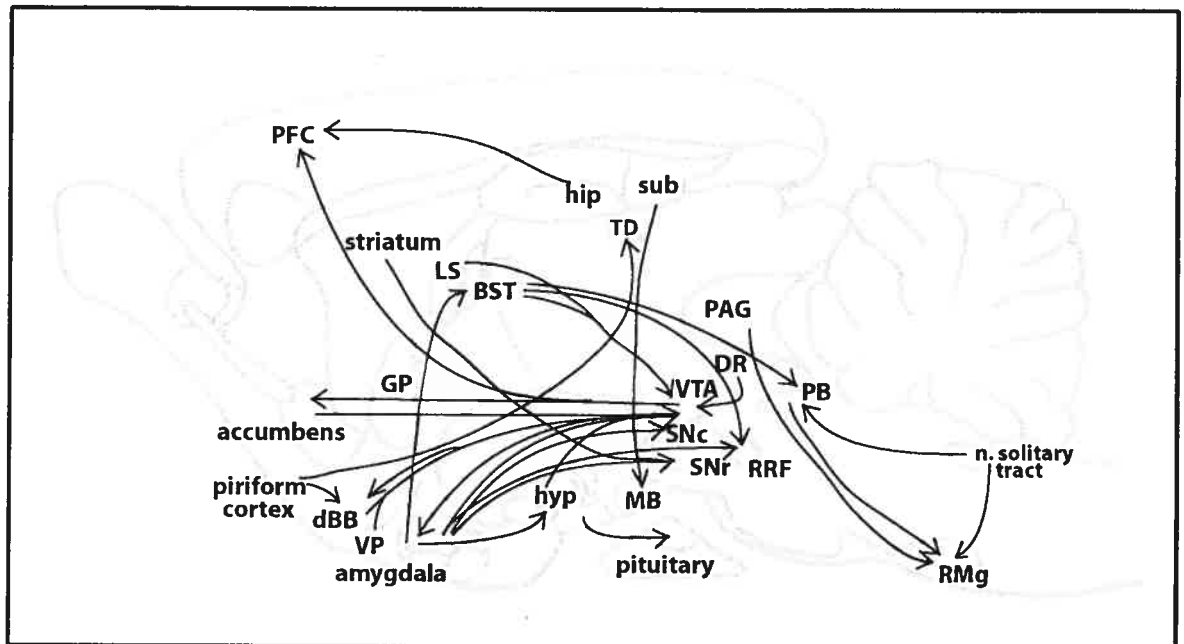


Figure 1. Sagittal representation of neurotensinergic pathways in the rodent brain. **BST:** bed nucleus of the stria terminalis; **dBB:** diagonal band of Broca; **DR:** dorsal raphe nucleus; **GP:** globus pallidus; **hip:** hippocampus; **hyp:** hypothalamus; **LS:** lateral septum; **MB:** mamillary bodies; **PAG:** periaqueducal grey; **PB:** parabrachial nucleus; **PFC:** prefrontal cortex; **RMg:** raphe magnus nucleus; **RRF:** retrochiasmatic field; **SNc:** substantia nigra pars compacta; **SNr:** substantia nigra pars reticulata; **sub:** subiculum; **TD:** thalamic dorsal nucleus; **VP:** ventral pallidum; **VTA:** ventral tegmental area, **n. solitary tract:** nucleus of the solitary tract.

References

1. Adams DH, Hanson GR, Keefe KA. Differential effects of cocaine and methamphetamine on neurotensin/neuromedin N and preprotachykinin messenger RNA expression in unique regions of the striatum. *Neuroscience* 2001;102:843-51.
2. Agnati LF, Fuxe K, Battistini N, et al. Further evidence for the existence of interactions between receptors for dopamine and neurotensin. Dopamine reduces the affinity and increases the number of. *Acta Physiol Scand* 1985;124:125-8
3. al-Rodhan NR, Richelson E, Gilbert JA, et al. Structure-antinociceptive activity of neurotensin and some novel analogues in the periaqueductal gray region of the brainstem. *Brain Res* 1991;557:227-35.
4. Alexander MJ, Leeman SE. Widespread expression in adult rat forebrain of mRNA encoding high-affinity neurotensin receptor. *J Comp Neurol* 1998;402:475-500.
5. Allen JM, Cross AJ, Yeats JC, et al. Neuropeptides and dopamine in the marmoset. Effect of treatment with 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6 tetrahydropyridine (MPTP): an animal model for Parkinson's disease? *Brain* 1986;109 (Pt 1):143-57.
6. Almenoff J, Wilk S, Orlowski M. Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1981;102:206-14.
7. Alonso A, Faure MP, Beaudet A. Neurotensin promotes oscillatory bursting behavior and is internalized in basal forebrain cholinergic neurons. *J Neurosci* 1994;14:5778-92.
8. Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, et al. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad*

Sci USA 2005;102:13461-6.

9. Antonelli T, Ferraro L, Fuxe K, et al. Neurotensin enhances endogenous extracellular glutamate levels in primary cultures of rat cortical neurons: involvement of neurotensin receptor in NMDA induced excitotoxicity. *Cereb Cortex* 2004;14:466-73.
10. Antonelli T, Tomasini MC, Finetti S, et al. Neurotensin enhances glutamate excitotoxicity in mesencephalic neurons in primary culture. *J Neurosci Res* 2002;70:766-73.
11. Asakura K, Matsuo Y, Kanemasa T, et al. P/Q-type Ca²⁺ channel blocker omega-agatoxin IVA protects against brain injury after focal ischemia in rats. *Brain Res* 1997;776:140-5.
12. Austin J, Hoogendoorn B, Buckland P, et al. Comparative sequencing of the proneurotensin gene and association studies in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2000;5:208-12.
13. Babcock AM, Baker DA, Hallock NL, et al. Neurotensin-induced hypothermia prevents hippocampal neuronal damage and increased locomotor activity in ischemic gerbils. *Brain Res Bull* 1993;32:373-8.
14. Baucó P, Rompre PP. Effects of neurotensin receptor activation on brain stimulation reward in Fischer 344 and Lewis rats. *Eur J Pharmacol* 2001;432:57-61.
15. Bauer B, Ehinger B, Tornqvist K, et al. Neurotransmitter release by certain neuropeptides in the chicken retina. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1985;63:581-7.
16. Bayer VE, Towle AC, Pickel VM. Vesicular and cytoplasmic localization of neurotensin-like immunoreactivity (NTLI) in neurons postsynaptic to terminals containing NTLI and/or tyrosine hydroxylase in the rat central nucleus of the

- amygdala. *J Neurosci Res* 1991;30:398-413.
17. Beaudet A, Mazella J, Nouel D, et al. Internalization and intracellular mobilization of neurotensin in neuronal cells. *Biochem Pharmacol* 1994;47:43-52.
 18. Behbehani MM. Physiological mechanisms of the analgesic effect of neurotensin. *Ann N Y Acad Sci* 1992;668:253-65.
 19. Beitz AJ. The sites of origin brain stem neurotensin and serotonin projections to the rodent nucleus raphe magnus. *J Neurosci* 1982;2:829-42.
 20. Betancur C, Lepee-Lorgeoux I, Cazillis M, et al. Neurotensin gene expression and behavioral responses following administration of psychostimulants and antipsychotic drugs in dopamine D(3) receptor deficient mice. *Neuropsychopharmacology* 2001;24:170-82.
 21. Binder EB, Kinkead B, Owens MJ, et al. Enhanced neurotensin neurotransmission is involved in the clinically relevant behavioral effects of antipsychotic drugs: evidence from animal models of sensorimotor gating. *J Neurosci* 2001;21:601-8.
 22. Binder EB, Kinkead B, Owens MJ, et al. Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacol Rev* 2001;53:453-86.
 23. Bissette G, Nemeroff CB, Decker MW, et al. Alterations in regional brain concentrations of neurotensin and bombesin in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1985;17:324-8.
 24. Blaha CD, Phillips AG. Pharmacological evidence for common mechanisms underlying the effects of neurotensin and neuroleptics on in vivo dopamine efflux in the rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 1992;49:867-77.
 25. Bolam JP, Wainer BH, Smith AD. Characterization of cholinergic neurons in the rat

- neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 1984;12:711-8.
26. Botsios DS, Vasiliadis KD. Factors enhancing intestinal adaptation after bowel compensation. *Dig Dis* 2003;21:228-36.
 27. Botto JM, Chabry J, Sarret P, et al. Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243:585-90.
 28. Botto JM, Sarret P, Vincent JP, et al. Identification and expression of a variant isoform of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor in the mouse central nervous system. *FEBS Lett* 1997;400:211-4.
 29. Boudin H, Pelaprat D, Rostene W, et al. Cellular distribution of neurotensin receptors in rat brain: immunohistochemical study using an antipeptide antibody against the cloned high affinity receptor. *J Comp Neurol* 1996;373:76-89.
 30. Boules M, Cusack B, Zhao L, et al. A novel neurotensin peptide analog given extracranially decreases food intake and weight in rodents. *Brain Res* 2000;865:35-44.
 31. Boules M, Fredrickson P, Richelson E. Neurotensin agonists as an alternative to antipsychotics. *Expert Opin Investig Drugs* 2005;14:359-69.
 32. Boules M, McMahon B, Warrington L, et al. Neurotensin analog selective for hypothermia over antinociception and exhibiting atypical neuroleptic-like properties. *Brain Res* 2001;919:1-11.
 33. Boules M, Warrington L, Fauq A, et al. A novel neurotensin analog blocks cocaine- and D-amphetamine-induced hyperactivity. *Eur J Pharmacol* 2001;426:73-6.

34. Boules M, Warrington L, Fauq A, et al. Antiparkinson-like effects of a novel neurotensin analog in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Eur J Pharmacol* 2001;428:227-33.
35. Breslin NA, Suddath RL, Bissette G, et al. CSF concentrations of neurotensin in schizophrenia: an investigation of clinical and biochemical correlates. *Schizophr Res* 1994;12:35-41.
36. Brun P, Mastrotto C, Beggiao E, et al. Neuropeptide neurotensin stimulates intestinal wound healing following chronic intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G621-9.
37. Buhler AV, Choi J, Proudfit HK, et al. Neurotensin activation of the NTR1 on spinally-projecting serotonergic neurons in the rostral ventromedial medulla is antinociceptive. *Pain* 2005;114:285-94.
38. Cadet JL, Kujirai K, Przedborski S. Bilateral modulation of. *Brain Res* 1991;564:37-44.
39. Cador M, Kelley AE, Le Moal M, et al. Ventral tegmental area infusion of substance P, neurotensin and enkephalin: differential effects on feeding behavior. *Neuroscience* 1986;18:659-69.
40. Canonico PL, Speciale C, Sortino MA, et al. Involvement of arachidonate metabolism in neurotensin-induced prolactin release in vitro. *Am J Physiol* 1985;249:E257-63.
41. Cape EG, Manns ID, Alonso A, et al. Neurotensin-induced bursting of cholinergic basal forebrain neurons promotes gamma and theta cortical activity together with waking and paradoxical sleep. *J Neurosci* 2000;20:8452-61.
42. Carraway R, Leeman SE. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin.

from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 1973;248:6854-61.

43. Castagliuolo I, Wang CC, Valenick L, et al. Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation. *J Clin Invest* 1999;103:843-9.
44. Castel MN, Morino P, Frey P, et al. Immunohistochemical evidence for a neurotensin striatonigral pathway in the rat brain. *Neuroscience* 1993;55:833-47.
45. Ceccatelli S, Eriksson M, Hokfelt T. Distribution and coexistence of corticotropin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 1989;49:309-23.
46. Chabry J, Gaudriault G, Vincent JP, et al. Implication of various forms of neurotensin receptors in the mechanism of internalization of neurotensin in cerebral neurons. *J Biol Chem* 1993;268:17138-44.
47. Chalon P, Vita N, Kaghad M, et al. Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett* 1996;386:91-4.
48. Checler F, Barelli H, Kitabgi P, et al. Neurotensin metabolism in various tissues of central and peripheral origins: ubiquitous involvement of a novel neurotensin degrading metalloendopeptidase. *Biochimie* 1988;70:75-82.
49. Checler F, Barelli H, Vincent JP. Tissue distribution of a novel neurotensin-degrading metallopeptidase. An immunological approach using monospecific polyclonal antibodies. *Biochem J* 1989;257:549-54.
50. Checler F, Vincent JP, Kitabgi P. Purification and characterization of a novel neurotensin-degrading peptidase from rat brain synaptic membranes. *J Biol Chem* 1986;261:11274-81.

51. Cheung NS, Pascoe CJ, Giardina SF, et al. Micromolar L-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic-necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurones. *Neuropharmacology* 1998;37:1419-29.
52. Chien PY, Farkas RH, Nakajima S, et al. Single-channel properties of the nonselective cation conductance induced by neurotensin in dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14917-21.
53. Chinaglia G, Probst A, Palacios JM. Neurotensin receptors in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: an autoradiographic study in basal ganglia. *Neuroscience* 1990;39:351-60.
54. Choi DW, Koh JY, Peters S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* 1988;8:185-96.
55. Ciriello J, Zhang TX. Cardiovascular effects of neurotensin microinjections into the nucleus of the solitary tract. *Brain Res* 1997;749:35-43.
56. Clineschmidt BV, McGuffin JC. Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur J Pharmacol* 1977;46:395-6.
57. Clineschmidt BV, McGuffin JC, Bunting PB. Neurotensin: antinocisponsive action in rodents. *Eur J Pharmacol* 1979;54:129-39.
58. Cooper PE, Fernstrom MH, Rorstad OP, et al. The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res* 1981;218:219-32.
59. Corley KC, Phan TH, Daugherty WP, et al. Stress-induced activation of median raphe serotonergic neurons in rats is potentiated by the neurotensin antagonist, SR

48692. *Neurosci Lett* 2002;319:1-4.
60. Cui H, Cai F, Belsham DD. Anorexigenic hormones leptin, insulin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone directly induce neurotensin (NT) gene expression in novel NT-expressing cell models. *J Neurosci* 2005;25:9497-506.
61. Cusack B, Boules M, Tyler BM, et al. Effects of a novel neurotensin peptide analog given extracranially on CNS behaviors mediated by apomorphine and haloperidol. *Brain Res* 2000;856:48-54.
62. Dal Farra C, Sarret P, Navarro V, et al. Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines. *Int J Cancer* 2001;92:503-9.
63. Dauch P, Masuo Y, Vincent JP, et al. Endopeptidase 24-16 in murines: tissue distribution, cerebral regionalization, and ontogeny. *J Neurochem* 1992;59:1862-7.
64. Davis TP, Burgess HS, Crowell S, et al. Beta-endorphin and neurotensin stimulate in vitro clonal growth of human SCLC cells. *Eur J Pharmacol* 1989;161:283-5.
65. de Quidt ME, Emson PC. Neurotensin facilitates dopamine release in vitro from rat striatal slices. *Brain Res* 1983;274:376-80.
66. Diaz-Cabiale Z, Fuxe K, Narvaez JA, et al. Neurotensin-induced modulation of dopamine D2 receptors and their function in rat striatum: counteraction by a NTR1-like receptor antagonist. *Neuroreport* 2002;13:763-6.
67. Dicou E, Vincent JP, Mazella J. Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line. *J Neurosci Res* 2004;78:92-9.
68. Dobner PR, Barber DL, Villa-Komaroff L, et al. Cloning and sequence analysis of

cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:3516-20.

69. Dobner PR, Deutch AY, Fadel J. Neurotensin: dual roles in psychostimulant and antipsychotic drug responses. *Life Sci* 2003;73:801-11.
70. Dubuc I, Costentin J, Terranova JP, et al. The nonpeptide neurotensin antagonist, SR 48692, used as a tool to reveal putative neurotensin receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 1994;112:352-4.
71. Dubuc I, Remande S, Costentin J. The partial agonist properties of levocabastine in neurotensin-induced analgesia. *Eur J Pharmacol* 1999;381:9-12.
72. Ehlers RA, Zhang Y, Hellmich MR, et al. Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:704-8.
73. Elde R, Schalling M, Ceccatelli S, et al. Localization of neuropeptide receptor mRNA in rat brain: initial observations using probes for neurotensin and substance P receptors. *Neurosci Lett* 1990;120:134-8.
74. Elek J, Pinzon W, Park KH, et al. Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer. *Anticancer Res* 2000;20:53-8.
75. Engber TM, Susel Z, Kuo S, et al. Levodopa replacement therapy alters enzyme activities in striatum and neuropeptide content in striatal output regions of 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 1991;552:113-8.
76. Ervin GN, Birkemo LS, Nemeroff CB, et al. Neurotensin blocks certain amphetamine-induced behaviours. *Nature* 1981;291:73-6.
77. Erwin VG, Markel PD, Johnson TE, et al. Common quantitative trait loci for

- alcohol-related behaviors and central nervous system neurotensin measures: hypnotic and hypothermic effects. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:911-8.
78. Fantegrossi WE, Ko MC, Woods JH, et al. Antinociceptive, hypothermic, hypotensive, and reinforcing effects of a novel neurotensin receptor agonist, NT69L, in rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;80:341-9.
79. Fantegrossi WE, Ko MC, Woods JH, et al. Antinociceptive, hypothermic, hypotensive, and reinforcing effects of a novel neurotensin receptor agonist, NT69L, in rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;80:341-9.
80. Farkas RH, Chien PY, Nakajima S, et al. Properties of a slow nonselective cation conductance modulated by neurotensin and other neurotransmitters in midbrain dopaminergic neurons. *J Neurophysiol* 1996;76:1968-81.
81. Farkas RH, Chien PY, Nakajima S, et al. Neurotensin and dopamine D2 activation oppositely regulate the same K⁺ conductance in rat midbrain dopaminergic neurons. *Neurosci Lett* 1997;231:21-4.
82. Farkas RH, Nakajima S, Nakajima Y. Neurotensin excites basal forebrain cholinergic neurons: ionic and signal-transduction mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2853-7.
83. Fassio A, Evans G, Grisshammer R, et al. Distribution of the neurotensin receptor NTS1 in the rat CNS studied using an amino-terminal directed antibody. *Neuropharmacology* 2000;39:1430-42.
84. Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991;114 (Pt 5):2283-301.
85. Feifel D, Melendez G, Shilling PD. A systemically administered neurotensin agonist blocks disruption of prepulse inhibition produced by a serotonin-2A agonist.

Neuropsychopharmacology 2003;28:651-3.

86. Feifel D, Melendez G, Shilling PD. Reversal of sensorimotor gating deficits in Brattleboro rats by acute administration of clozapine and a neurotensin agonist, but not haloperidol: a potential predictive model for novel antipsychotic effects. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:731-8.
87. Feifel D, Minor KL, Dulawa S, et al. The effects of intra-accumbens neurotensin on sensorimotor gating. *Brain Res* 1997;760:80-4.
88. Feifel D, Reza TL. Effects of neurotensin administered into the ventral tegmental area on prepulse inhibition of startle. *Behav Brain Res* 1999;106:189-93.
89. Feifel D, Reza TL, Robeck SL. Pro-dopamine effects of neurotensin on sensorimotor gating deficits. *Peptides* 1997;18:1457-60.
90. Feifel D, Reza TL, Wustrow DJ, et al. Novel antipsychotic-like effects on prepulse inhibition of startle produced by a neurotensin agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:710-3.
91. Fernandez A, de Ceballos ML, Jenner P, et al. Neurotensin, substance P, delta and mu opioid receptors are decreased in basal ganglia of Parkinson's disease patients. *Neuroscience* 1994;61:73-9.
92. Fernandez A, de Ceballos ML, Rose S, et al. Alterations in peptide levels in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. *Brain* 1996;119 (Pt 3):823-30.
93. Fernandez A, Jenner P, Marsden CD, et al. Characterization of neurotensin-like immunoreactivity in human basal ganglia: increased neurotensin levels in substantia nigra in Parkinson's disease. *Peptides* 1995;16:339-46.

94. Ferraro L, Antonelli T, O'Connor WT, et al. The striatal neurotensin receptor modulates striatal and pallidal glutamate and GABA release: functional evidence for a pallidal glutamate-GABA interaction via the pallidal-subthalamic nucleus loop. *J Neurosci* 1998;18:6977-89.
95. Ferraro L, O'Connor WT, Antonelli T, et al. 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* 1997;9:1838-46.
96. Ferraro L, Tanganelli S, O'Connor WT, et al. Neurotensin increases endogenous glutamate release in the neostriatum of the awake rat. *Synapse* 1995;20:362-4.
97. Ferraro L, Tomasini MC, Fernandez M, et al. Nigral neurotensin receptor regulation of nigral glutamate and nigroventral thalamic GABA transmission: a dual-probe microdialysis study in intact conscious rat brain. *Neuroscience* 2001;102:113-20.
98. Forno LS, Alvord EC Jr. The pathology of Parkinsonism. Part I. Some new observations and correlations. *Contemp Neurol Ser* 1971;8:119-30.
99. Fuxe K, Von Euler G, Agnati LF, et al. Intramembrane interactions between neurotensin receptors and dopamine D2 receptors as a major mechanism for the neuroleptic-like action of neurotensin. *Ann N Y Acad Sci* 1992;668:186-204.
100. Gailly P. Ca²⁺ entry in CHO cells, after Ca²⁺ stores depletion, is mediated by arachidonic acid. *Cell Calcium* 1998;24:293-304.
101. Garver DL, Bissette G, Yao JK, et al. Relation of CSF neurotensin concentrations to symptoms and drug response of psychotic patients. *Am J Psychiatry* 1991;148:484-8.

102. Gendron L, Perron A, Payet MD, et al. Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Mol Pharmacol* 2004;66:1421-30.
103. Gibb WR, Esiri MM, Lees AJ. Clinical and pathological features of diffuse cortical Lewy body disease (Lewy body dementia). *Brain* 1987;110 (Pt 5):1131-53.
104. Glimcher PW, Giovino AA, Hoebel BG. Neurotensin self-injection in the ventral tegmental area. *Brain Res* 1987;403:147-50.
105. Glimcher PW, Margolin DH, Giovino AA, et al. Neurotensin: a new 'reward peptide'. *Brain Res* 1984;291:119-24.
106. Goedert M, Lightman SL, Mantyh PW, et al. Neurotensin-like immunoreactivity and neurotensin receptors in the rat hypothalamus and in the neurointermediate lobe of the pituitary gland. *Brain Res* 1985;358:59-69.
107. Goldman R, Bar-Shavit Z, Romeo D. Neurotensin modulates human neutrophil locomotion and phagocytic capability. *FEBS Lett* 1983;159:63-7.
108. Goncharuk VD, van Heerikhuize J, Dai JP, et al. Neuropeptide changes in the suprachiasmatic nucleus in primary hypertension indicate functional impairment of the biological clock. *J Comp Neurol* 2001;431:320-30.
109. Gonzales C, Chesselet MF. Amygdalonigral pathway: an anterograde study in the rat with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol* 1990;297:182-200.
110. Goulet M, Morissette M, Grondin R, et al. Neurotensin receptors and dopamine transporters: effects of MPTP lesioning and chronic dopaminergic treatments in monkeys. *Synapse* 1999;32:153-64.

111. Gui X, Carraway RE, Dobner PR. Endogenous neurotensin facilitates visceral nociception and is required for stress-induced antinociception in mice and rats. *Neuroscience* 2004;126:1023-32.
112. Gully D, Canton M, Boigegrain R, et al. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:65-9.
113. Gully D, Labeeuw B, Boigegrain R, et al. Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:802-12.
114. Gygi SP, Gibb JW, Hanson GR. Differential effects of antipsychotic and psychotomimetic drugs on neurotensin systems of discrete extrapyramidal and limbic regions. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:192-7.
115. Hadden MK, Orwig KS, Kokko KP, et al. Design, synthesis, and evaluation of the antipsychotic potential of orally bioavailable neurotensin (8-13) analogues containing non-natural arginine and lysine residues. *Neuropharmacology* 2005;49:1149-59.
116. Hanson GR, Smiley P, Johnson M, et al. Response by the neurotensin systems of the basal ganglia to cocaine treatment. *Eur J Pharmacol* 1989;160:23-30.
117. Hara Y, Shiosaka S, Senba E, et al. Ontogeny of the neurotensin-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis. I. Forebrain and diencephalon. *J Comp Neurol* 1982;208:177-95.
118. Hawkins MF, Barkemeyer CA, Tulley RT. Synergistic effects of dopamine agonists and centrally administered neurotensin on feeding. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:1195-201.

119. Hermans-Borgmeyer I, Hermeijer G, Nykjaer A, et al. Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;65:216-9.
120. Hermans E, Maloteaux JM. Mechanisms of regulation of neurotensin receptors. *Pharmacol Ther* 1998;79:89-104.
121. Hermans E, Vanisberg MA, Geurts M, et al. Down-regulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons. *Neurochem Int* 1997;31:291-9.
122. Hertel P, Mathe JM, Nomikos GG, et al. Effects of D-amphetamine and phencyclidine on behavior and extracellular concentrations of neurotensin and dopamine in the ventral striatum and the medial prefrontal cortex of the rat. *Behav Brain Res* 1995;72:103-14.
123. Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci* 2004;27:735-43.
124. Herve D, Tassin JP, Studler JM, et al. Dopaminergic control of 125I-labeled neurotensin binding site density in corticolimbic structures of the rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6203-7.
125. Hetier E, Boireau A, Dubedat P, et al. Neurotensin effects on evoked release of dopamine in slices from striatum, nucleus accumbens and prefrontal cortex in rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1988;337:13-7.
126. Hollerman JR, Abercrombie ED, Grace AA. Electrophysiological, biochemical, and behavioral studies of acute haloperidol-induced depolarization block of nigral dopamine neurons. *Neuroscience* 1992;47:589-601.
127. Holst B, Holliday ND, Bach A, et al. Common structural basis for constitutive

activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem* 2004;279:53806-17.

128. Hosli E, Stauffer S, Hosli L. Autoradiographic and electrophysiological evidence for the existence of neurotensin receptors on cultured astrocytes. *Neuroscience* 1995;66:627-33.
129. Hosli L, Hosli E, Heuss L, et al. Electrophysiological evidence for receptors for vasoactive intestinal peptide and angiotensin II on astrocytes of cultured rat central nervous system. *Neurosci Lett* 1989;102:217-22.
130. Hylden JL, Wilcox GL. Antinociceptive action of intrathecal neurotensin in mice. *Peptides* 1983;4:517-20.
131. Inagaki S, Kubota Y, Shinoda K, et al. Neurotensin-containing pathway from the endopiriform nucleus and the adjacent prepiriform cortex to the dorsomedial thalamic nucleus in the rat. *Brain Res* 1983;260:143-6.
132. Inagaki S, Shinoda K, Kubota Y, et al. Evidence for the existence of a neurotensin-containing pathway from the endopiriform nucleus and the adjacent prepiriform cortex to the anterior olfactory nucleus and nucleus of diagonal band (Broca) of the rat. *Neuroscience* 1983;8:487-93.
133. Iversen LL, Iversen SD, Bloom F, et al. Calcium-dependent release of somatostatin and neurotensin from rat brain in vitro. *Nature* 1978;273:161-3.
134. Iwase K, Evers BM, Hellmich MR, et al. Indirect inhibitory effect of a neurotensin receptor antagonist on human colon cancer (LoVo) growth. *Surg Oncol* 1996;5:245-51.
135. Iwata T, Hashimoto H, Hiwada K, et al. Changes of plasma renin activity by intracerebroventricular administration of biological active peptides in conscious rats. *Clin Exp Hypertens A* 1984;6:1055-66.

136. Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, et al. Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chem* 2001;276:22788-96.
137. Jennes L, Stumpf WE, Kalivas PW. Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 1982;210:211-24.
138. Jolas T, Aghajanian GK. Neurotensin excitation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. *Eur J Neurosci* 1996;8:153-61.
139. Jolas T, Aghajanian GK. Neurotensin and the serotonergic system. *Prog Neurobiol* 1997;52:455-68.
140. Jolicoeur FB, Rivest R, St-Pierre S, et al. Antiparkinson-like effects of neurotensin in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 1991;538:187-92.
141. Jones BE. Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Prog Brain Res* 2004;145:157-69.
142. Juaneda C, Lafon-Dubourg P, Ciofi P, et al. Immune challenge-stimulated hypophysiotropic corticotropin-releasing hormone messenger RNA expression is associated with an induction of neurotensin messenger RNAs without alteration of vasopressin messenger RNAs. *Neuroscience* 1999;93:393-400.
143. Kalivas PW. Blockade of neurotensin-induced motor activity by inhibition of protein kinase. *Psychopharmacology (Berl)* 1994;114:175-80.
144. Kalivas PW, Burgess SK, Nemeroff CB, et al. Behavioral and neurochemical effects of neurotensin microinjection into the ventral tegmental area of the rat. *Neuroscience* 1983;8:495-505.
145. Kalivas PW, Duffy P. Effect of acute and daily neurotensin and enkephalin treatments on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *J Neurosci*

- 1990;10:2940-9.
146. Kalivas PW, Gau BA, Nemeroff CB, et al. Antinociception after microinjection of neurotensin into the central amygdaloid nucleus of the rat. *Brain Res* 1982;243:279-86.
 147. Kalivas PW, Miller JS. Neurotensin neurons in the ventral tegmental area project to the medial nucleus accumbens. *Brain Res* 1984;300:157-60.
 148. Kalivas PW, Nemeroff CB, Prange AJ Jr. Increase in spontaneous motor activity following infusion of neurotensin into the ventral tegmental area. *Brain Res* 1981;229:525-9.
 149. Kelley AE, Cador M, Stinus L, et al. Neurotensin, substance P, neurokinin-alpha, and enkephalin: injection into ventral tegmental area in the rat produces differential effects on operant responding. *Psychopharmacology (Berl)* 1989;97:243-52.
 150. Kessler JP, Moyse E, Kitabgi P, et al. Distribution of neurotensin binding sites in the caudal brainstem of the rat: a light microscopic radioautographic study. *Neuroscience* 1987;23:189-98.
 151. Kinkead B, Dobner PR, Egnatashvili V, et al. Neurotensin-deficient mice have deficits in prepulse inhibition: restoration by clozapine but not haloperidol, olanzapine or quetiapine. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;
 152. Kinkead B, Nemeroff CB. Neurotensin: an endogenous antipsychotic? *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:99-103.
 153. Kislauskis E, Bullock B, McNeil S, et al. The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *J Biol Chem* 1988;263:4963-8.

154. Kiss A, Palkovits M, Antoni FA, et al. Neurotensin in the rat median eminence: the possible sources of neurotensin-like fibers and varicosities in the external layer. *Brain Res* 1987;416:129-35.
155. Kitabgi P, De Nadai F, Cuber JC, et al. Calcium-dependent release of neuromedin N and neurotensin from mouse hypothalamus. *Neuropeptides* 1990;15:111-4.
156. Kitabgi P, Masuo Y, Nicot A, et al. Marked variations of the relative distributions of neurotensin and neuromedin N in micropunched rat brain areas suggest differential processing of their common precursor. *Neurosci Lett* 1991;124:9-12.
157. Kitabgi P, Rostene W, Dussailant M, et al. Two populations of neurotensin binding sites in murine brain: discrimination by the antihistamine levocabastine reveals markedly different radioautographic distribution. *Eur J Pharmacol* 1987;140:285-93.
158. Kiyama H, Shiosaka S, Sakamoto N, et al. A neurotensin-immunoreactive pathway from the subiculum to the mammillary body in the rat. *Brain Res* 1986;375:357-9.
159. Kubo T, Kihara M. Modulation of the aortic baroreceptor reflex by neuropeptide Y, neurotensin and vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1990;342:182-8.
160. Labbe-Jullie C, Dubuc I, Brouard A, et al. In vivo and in vitro structure-activity studies with peptide and pseudopeptide neurotensin analogs suggest the existence of distinct central neurotensin receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;268:328-36.
161. Laitinen K, Crawley JN, Mefford IN, et al. Neurotensin and cholecystokinin microinjected into the ventral tegmental area modulate microdialysate concentrations of dopamine and metabolites in the posterior nucleus accumbens.

- Brain Res* 1990;523:342-6.
162. Lapchak PA, Araujo DM, Quirion R, et al. Neurotensin regulation of endogenous acetylcholine release from rat cerebral cortex: effect of quinolinic acid lesions of the basal forebrain. *J Neurochem* 1990;55:1397-403.
 163. Lapchak PA, Araujo DM, Quirion R, et al. Neurotensin regulation of endogenous acetylcholine release from rat striatal slices is independent of dopaminergic tone. *J Neurochem* 1991;56:651-7.
 164. Legault M, Congar P, Michel FJ, et al. Presynaptic action of neurotensin on cultured ventral tegmental area dopaminergic neurones. *Neuroscience* 2002;111:177-87.
 165. Lemaire I. Neurotensin enhances IL-1 production by activated alveolar macrophages. *J Immunol* 1988;140:2983-8.
 166. Leonetti M, Brun P, Clerget M, et al. Specific involvement of neurotensin type 1 receptor in the neurotensin-mediated in vivo dopamine efflux using knock-out mice. *J Neurochem* 2004;89:1-6.
 167. Lepee-Lorgeoux I, Betancur C, Rostene W, et al. Differential ontogenetic patterns of levocabastine-sensitive neurotensin NT2 receptors and of NT1 receptors in the rat brain revealed by in situ hybridization. *Brain Res Dev Brain Res* 1999;113:115-31.
 168. Letter AA, Merchant K, Gibb JW, et al. Effect of methamphetamine on neurotensin concentrations in rat brain regions. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;241:443-7.
 169. Li AH, Yeh TH, Tan PP, et al. Neurotensin excitation of serotonergic neurons in the rat nucleus raphe magnus: ionic and molecular mechanisms. *Neuropharmacology* 2001;40:1073-83.

170. Li XM, Ferraro L, Tanganelli S, et al. Neurotensin peptides antagonistically regulate postsynaptic dopamine D2 receptors in rat nucleus accumbens: a receptor binding and microdialysis study. *J Neural Transm Gen Sect* 1995;102:125-37.
171. Lindstrom LH, Widerlov E, Bisette G, et al. Reduced CSF neurotensin concentration in drug-free schizophrenic patients. *Schizophr Res* 1988;1:55-9.
172. Liu F, Yang P, Baez M, et al. Neurotensin negatively modulates Akt activity in neurotensin receptor-1-transfected AV12 cells. *J Cell Biochem* 2004;92:603-11.
173. Liu Y, Hillefors-Berglund M, von Euler G. Modulation of dopamine D3 receptor binding by N-ethylmaleimide and neurotensin. *Brain Res* 1994;643:343-8.
174. Maeda K, Frohman LA. Neurotensin release by rat hypothalamic fragments in vitro. *Brain Res* 1981;210:261-9.
175. Manberg PJ, Nemeroff CB, Bisette G, et al. Neuropeptides in CSF and post-mortem brain tissue of normal controls, schizophrenics and Huntington's choreics. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1985;9:97-108.
176. Maoret JJ, Anini Y, Rouyer-Fessard C, et al. Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice. *Int J Cancer* 1999;80:448-54.
177. Martin S, Navarro V, Vincent JP, et al. Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* 2002;123:1135-43.
178. Martin S, Vincent JP, Mazella J. Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J Neurosci* 2003;23:1198-205.
179. Matthews RT. Neurotensin depolarizes cholinergic and a subset of non-cholinergic

- septal/diagonal band neurons by stimulating neurotensin-1 receptors. *Neuroscience* 1999;94:775-83.
180. Mazella J. Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* 2001;13:1-6.
181. Mazella J, Botto JM, Guillemare E, et al. Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J Neurosci* 1996;16:5613-20.
182. Mazella J, Zsurger N, Navarro V, et al. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 1998;273:26273-6.
183. Meltzer HY, Arvanitis L, Bauer D, et al. Placebo-controlled evaluation of four novel compounds for the treatment of schizophrenia and schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 2004;161:975-84.
184. Memo M, Castelletti L, Valerio A, et al. Identification of neurotensin receptors associated with calcium channels and prolactin release in rat pituitary. *J Neurochem* 1986;47:1682-8.
185. Merchant KM, Dobner PR, Dorsa DM. Differential effects of haloperidol and clozapine on neurotensin gene transcription in rat neostriatum. *J Neurosci* 1992;12:652-63.
186. Merchant KM, Miller MA, Ashleigh EA, et al. Haloperidol rapidly increases the number of neurotensin mRNA-expressing neurons in neostriatum of the rat brain. *Brain Res* 1991;540:311-4.
187. Merchenthaler I, Lennard DE. The hypophysiotropic neurotensin-immunoreactive neuronal system of the rat brain. *Endocrinology* 1991;129:2875-80.

188. Mercuri NB, Stratta F, Calabresi P, et al. Neurotensin induces an inward current in rat mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci Lett* 1993;153:192-6.
189. Mesnage V, Houeto JL, Bonnet AM, et al. Neurokinin B, neurotensin, and cannabinoid receptor antagonists and Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol* 2004;27:108-10.
190. Mijnster MJ, Docter GJ, Voorn P. Risperidone does not elevate neurotensin mRNA in rat nucleus accumbens and caudate-putamen. *Neuroreport* 1995;6:2209-12.
191. Moga MM, Saper CB, Gray TS. Bed nucleus of the stria terminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 1989;283:315-32.
192. Morin AJ, Beaudet A. Origin of the neurotensinergic innervation of the rat basal forebrain studied by retrograde transport of cholera toxin. *J Comp Neurol* 1998;391:30-41.
193. Morinville A, Martin S, Lavallee M, et al. Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2153-68.
194. Morris NJ, Ross SA, Lane WS, et al. Sortilin is the major 110-kDa protein in GLUT4 vesicles from adipocytes. *J Biol Chem* 1998;273:3582-7.
195. Morrow EL, Erwin VG. Calcium influence on neurotensin and beta-endorphin enhancement of ethanol sensitivity in selectively bred mouse lines. *Alcohol Drug Res* 1987;7:225-32.
196. Motoi Y, Aizawa T, Haga S, et al. Neuronal localization of a novel mosaic apolipoprotein E receptor, LR11, in rat and human brain. *Brain Res* 1999;833:209-15.

197. Munck Petersen C, Nielsen MS, Jacobsen C, et al. Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J* 1999;18:595-604.
198. Nalivaiko E, Michaud JC, Soubrie P, et al. Electrophysiological evidence for putative subtypes of neurotensin receptors in guinea-pig mesencephalic dopaminergic neurons. *Neuroscience* 1998;86:799-811.
199. Navarro V, Martin S, Sarret P, et al. Pharmacological properties of the mouse neurotensin receptor 3. Maintenance of cell surface receptor during internalization of neurotensin. *FEBS Lett* 2001;495:100-5.
200. Nemeroff CB. Neurotensin: perchance an endogenous neuroleptic? *Biol Psychiatry* 1980;15:283-302.
201. Nemeroff CB, Bissette G, Widerlov E, et al. Neurotensin-like immunoreactivity in cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia, depression, anorexia nervosa-bulimia, and premenstrual syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1989;1:16-20.
202. Nemeroff CB, Youngblood WW, Manberg PJ, et al. Regional brain concentrations of neuropeptides in Huntington's chorea and schizophrenia. *Science* 1983;221:972-5.
203. Newman EA. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 2003;26:536-42.
204. Nguyen HM, Cahill CM, McPherson PS, et al. Receptor-mediated internalization of (3H)-neurotensin in synaptosomal preparations from rat neostriatum. *Neuropharmacology* 2002;42:1089-98.
205. Nicot A, Rostene W, Berod A. Neurotensin receptor expression in the rat forebrain and midbrain: a combined analysis by in situ hybridization and receptor

- autoradiography. *J Comp Neurol* 1994;341:407-19.
206. Nicot A, Rostene W, Berod A. Hypercorticism induces neurotensin mRNA in rat periventricular hypothalamus. *Neuroreport* 1995;6:2158-60.
207. Nicot A, Rowe WB, De Kloet ER, et al. Endogenous neurotensin regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and peptidergic neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 1997;9:263-9.
208. Nielsen MS, Jacobsen C, Olivecrona G, et al. Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 1999;274:8832-6.
209. Niimi M, Takahara J, Sato M, et al. Neurotensin and growth hormone-releasing factor-containing neurons projecting to the median eminence of the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 1991;133:183-6.
210. Nouel D, Faure MP, St Pierre JA, et al. Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors. *J Neurosci* 1997;17:1795-803.
211. Nouel D, Sarret P, Vincent JP, et al. Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors. *Neuroscience* 1999;94:1189-97.
212. O'Connor WT, Tanganelli S, Ungerstedt U, et al. The effects of neurotensin on GABA and acetylcholine release in the dorsal striatum of the rat: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 1992;573:209-16.
213. Okuma Y, Fukuda Y, Osumi Y. Neurotensin potentiates the potassium-induced release of endogenous dopamine from rat striatal slices. *Eur J Pharmacol* 1983;93:27-33.
214. Onuoha GN, Alpar EK, Chukwulobelu R, et al. Distributions of VIP, substance P,

- neurokinin A and neurotensin in rat heart: an immunocytochemical study. *Neuropeptides* 1999;33:19-25.
215. Orłowski M, Michaud C, Chu TG. A soluble metalloendopeptidase from rat brain. Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. *Eur J Biochem* 1983;135:81-8.
216. Osbahr AJ 3rd, Nemeroff CB, Luttinger D, et al. Neurotensin-induced antinociception in mice: antagonism by thyrotropin-releasing hormone. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;217:645-51.
217. Palacios JM, Kuhar MJ. Neurotensin receptors are located on dopamine-containing neurones in rat midbrain. *Nature* 1981;294:587-9.
218. Panayi F, Colussi-Mas J, Lambas-Senas L, et al. Endogenous neurotensin in the ventral tegmental area contributes to amphetamine behavioral sensitization. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:871-9.
219. Panayi F, Dorso E, Lambas-Senas L, et al. Chronic blockade of neurotensin receptors strongly reduces sensitized, but not acute, behavioral response to D-amphetamine. *Neuropsychopharmacology* 2002;26:64-74.
220. Pazos A, Lopez M, Florez J. Different mechanisms are involved in the respiratory depression and analgesia induced by neurotensin in rats. *Eur J Pharmacol* 1984;98:119-23.
221. Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, et al. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem* 1997;272:3599-605.
222. Petrie KA, Bubser M, Casey CD, et al. The neurotensin agonist PD149163 increases Fos expression in the prefrontal cortex of the rat.

Neuropsychopharmacology 2004;29:1878-88.

223. Petrie KA, Schmidt D, Bubser M, et al. Neurotensin activates GABAergic interneurons in the prefrontal cortex. *J Neurosci* 2005;25:1629-36.
224. Pettibone DJ, Hess JF, Hey PJ, et al. The effects of deleting the mouse neurotensin receptor NTR1 on central and peripheral responses to neurotensin. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:305-13.
225. Pinnock RD. Neurotensin depolarizes substantia nigra dopamine neurones. *Brain Res* 1985;338:151-4.
226. Poinot-Chazel C, Portier M, Bouaboula M, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase couples neurotensin receptor stimulation to induction of the primary response gene Krox-24. *Biochem J* 1996;320 (Pt 1):145-51.
227. Quirion R, Chiueh CC, Everist HD, et al. Comparative localization of neurotensin receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic terminals. *Brain Res* 1985;327:385-9.
228. Quirion R, Rioux F, Regoli D, et al. Compound 48/80 inhibits neurotensin-induced hypotension in rats. *Life Sci* 1980;27:1889-95.
229. Radke JM, Owens MJ, Ritchie JC, et al. Atypical antipsychotic drugs selectively increase neurotensin efflux in dopamine terminal regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11462-4.
230. Rakovska A, Giovannini MG, Della Corte L, et al. Neurotensin modulation of acetylcholine and GABA release from the rat hippocampus: an in vivo microdialysis study. *Neurochem Int* 1998;33:335-40.
231. Remaury A, Vita N, Gendreau S, et al. Targeted inactivation of the neurotensin

type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res* 2002;953:63-72.

232. Reubi JC, Waser B, Friess H, et al. Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. *Gut* 1998;42:546-50.
233. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, et al. Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas. *Int J Cancer* 1999;82:213-8.
234. Richard F, Barroso S, Martinez J, et al. Agonism, inverse agonism, and neutral antagonism at the constitutively active human neurotensin receptor 2. *Mol Pharmacol* 2001;60:1392-8.
235. Richelson E, Boules M, Fredrickson P. Neurotensin agonists: possible drugs for treatment of psychostimulant abuse. *Life Sci* 2003;73:679-90.
236. Richey S, Bulet A, Max J, et al. Effect of chronic intraperitoneal injections of leptin on hypothalamic neurotensin content and food intake. *Brain Res* 2000;862:276-9.
237. Rioux F, Quirion R, St-Pierre S, et al. The hypotensive effect of centrally administered neurotensin in rats. *Eur J Pharmacol* 1981;69:241-7.
238. Rivest R, St-Pierre S, Jolicoeur FB. Structure-activity studies of neurotensin on muscular rigidity and tremors induced by 6-hydroxydopamine lesions in the posterolateral hypothalamus of the rat. *Neuropharmacology* 1991;30:47-52.
239. Roberts GW, Crow TJ, Polak JM. Neurotensin: first report of a cortical pathway. *Peptides* 1981;2 Suppl 1:37-43.
240. Rompre P, Perron S. Evidence for a role of endogenous neurotensin in the initiation of amphetamine sensitization. *Neuropharmacology* 2000;39:1880-92.

241. Rompre PP. Psychostimulant-like effect of central microinjection of neurotensin on brain stimulation reward. *Peptides* 1995;16:1417-20.
242. Rompre PP. Repeated activation of neurotensin receptors sensitizes to the stimulant effect of amphetamine. *Eur J Pharmacol* 1997;328:131-4.
243. Rompre PP, Bauco P, Gratton A. Facilitation of brain stimulation reward by mesencephalic injections of neurotensin-(1-13). *Eur J Pharmacol* 1992;211:295-303.
244. Rompre PP, Boye SM. Opposite effects of mesencephalic microinjections of cholecystokinin octapeptide and neurotensin-(1-13) on brain stimulation reward. *Eur J Pharmacol* 1993;232:299-303.
245. Rompre PP, Gratton A. Mesencephalic microinjections of neurotensin-(1-13) and its C-terminal fragment, neurotensin-(8-13), potentiate brain stimulation reward. *Brain Res* 1993;616:154-62.
246. Rostene WH, Alexander MJ. Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 1997;18:115-73.
247. Rovere C, Barbero P, Kitabgi P. Evidence that PC2 is the endogenous pro-neurotensin convertase in rMTC 6-23 cells and that PC1- and PC2-transfected PC12 cells differentially process pro-neurotensin. *J Biol Chem* 1996;271:11368-75.
248. Rowe W, Viau V, Meaney MJ, et al. Stimulation of CRH-mediated ACTH secretion by central administration of neurotensin: evidence for the participation of the paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 1995;7:109-17.
249. Rowe WB, Nicot A, Sharma S, et al. Central administration of the neurotensin receptor antagonist, SR48692, modulates diurnal and stress-related hypothalamic-pituitary-adrenal activity. *Neuroendocrinology* 1997;66:75-85.

250. Sadoul JL, Checler F, Kitabgi P, et al. Loss of high affinity neurotensin receptors in substantia nigra from parkinsonian subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;125:395-404.
251. Sahu A. Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. *Endocrinology* 1998;139:795-8.
252. Sahu A, Carraway RE, Wang YP. Evidence that neurotensin mediates the central effect of leptin on food intake in rat. *Brain Res* 2001;888:343-7.
253. Sanz B, Exposito I, Mora F. Effects of neurotensin on the release of glutamic acid in the prefrontal cortex and striatum of the rat. *Neuroreport* 1993;4:1194-6.
254. Sarhan S, Hitchcock JM, Grauffel CA, et al. Comparative antipsychotic profiles of neurotensin and a related systemically active peptide agonist. *Peptides* 1997;18:1223-7.
255. Sarret P, Beaudet A, Vincent JP, et al. Regional and cellular distribution of low affinity neurotensin receptor mRNA in adult and developing mouse brain. *J Comp Neurol* 1998;394:344-56.
256. Sarret P, Esdaile MJ, Perron A, et al. Potent spinal analgesia elicited through stimulation of NTS2 neurotensin receptors. *J Neurosci* 2005;25:8188-96.
257. Sarret P, Gendron L, Kilian P, et al. Pharmacology and functional properties of NTS2 neurotensin receptors in cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 2002;277:36233-43.
258. Sarret P, Krzywkowski P, Segal L, et al. Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*

2003;461:483-505.

259. Sarret P, Perron A, Stroh T, et al. Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 2003;461:520-38.
260. Schaeffer P, Laplace MC, Bernat A, et al. SR142948A is a potent antagonist of the cardiovascular effects of neurotensin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:545-50.
261. Schimpff RM, Avard C, Fenelon G, et al. Increased plasma neurotensin concentrations in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:784-6.
262. Schimpff RM, Gourmelen M, Scarceriaux V, et al. Plasma neurotensin levels in humans: relation to hormone levels in diseases involving the hypothalamo-pituitary-thyroid axis. *Eur J Endocrinol* 1995;133:534-8.
263. Schotte A, Leysen JE, Laduron PM. Evidence for a displaceable non-specific. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986;333:400-5.
264. Seroogy KB, Mehta A, Fallon JH. Neurotensin and cholecystokinin coexistence within neurons of the ventral mesencephalon: projections to forebrain. *Exp Brain Res* 1987;68:277-89.
265. Sharma RP, Janicak PG, Bissette G, et al. CSF neurotensin concentrations and antipsychotic treatment in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 1997;154:1019-21.
266. Shi WX, Bunney BS. Actions of neurotensin: a review of the electrophysiological studies. *Ann N Y Acad Sci* 1992;668:129-45.
267. Shido O, Nagasaka T. Effects of intraventricular neurotensin on blood pressure and

- heat balance in rats. *Jpn J Physiol* 1985;35:311-20.
268. Shilling PD, Richelson E, Feifel D. The effects of systemic NT69L, a neurotensin agonist, on baseline and drug-disrupted prepulse inhibition. *Behav Brain Res* 2003;143:7-14.
269. Shulkes A, Lewis SJ, Jarrott B. Strain differences in central nervous system neurotensin content between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1987;415:404-8.
270. Shute CC, Lewis PR. The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain* 1967;90:497-520.
271. Skidgel RA, Engelbrecht S, Johnson AR, et al. Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* 1984;5:769-76.
272. Smith DJ, Hawranko AA, Monroe PJ, et al. Dose-dependent pain-facilitatory and -inhibitory actions of neurotensin are revealed by SR 48692, a nonpeptide neurotensin antagonist: influence on the antinociceptive effect of morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:899-908.
273. Sotty F, Brun P, Leonetti M, et al. Comparative effects of neurotensin, neurotensin(8-13) and. *Neuroscience* 2000;98:485-92.
274. Souaze F, Viardot-Foucault V, Rouillet N, et al. Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/ β -catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. *Carcinogenesis* 2005;
275. St-Gelais F, Legault M, Bourque MJ, et al. Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* 2004;24:2566-74.

276. Steinberg R, Brun P, Souilhac J, et al. Neurochemical and behavioural effects of neurotensin vs. *Neuropeptides* 1995;28:43-50.
277. Steiner DF, Smeekens SP, Ohagi S, et al. The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J Biol Chem* 1992;267:23435-8.
278. Stopa EG, Volicer L, Kuo-Leblanc V, et al. Pathologic evaluation of the human suprachiasmatic nucleus in severe dementia. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:29-39.
279. Sumners C, Phillips MI, Richards EM. Central pressor action of neurotensin in conscious rats. *Hypertension* 1982;4:888-93.
280. Szigethy E, Beaudet A. 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* 1989;279:128-37.
281. Tanaka K, Masu M, Nakanishi S. Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 1990;4:847-54.
282. Tanganelli S, Li XM, Ferraro L, et al. Neurotensin and cholecystokinin octapeptide control synergistically dopamine release and dopamine D2 receptor affinity in rat neostriatum. *Eur J Pharmacol* 1993;230:159-66.
283. Tanganelli S, O'Connor WT, Ferraro L, et al. Facilitation of GABA release by neurotensin is associated with a reduction of dopamine release in rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 1994;60:649-57.
284. Tanji H, Araki T, Fujihara K, et al. Alteration of neurotensin receptors in MPTP-treated mice. *Peptides* 1999;20:803-7.

285. Tauris J, Ellgaard L, Jacobsen C, et al. The carboxy-terminal domain of the receptor-associated protein binds to the Vps10p domain of sortilin. *FEBS Lett* 1998;429:27-30.
286. Taylor MD, de Ceballos ML, Rose S, et al. Neuropeptide levels in the basal ganglia of aged common marmosets following prolonged treatment with MPTP. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1991;3:99-108.
287. Taylor MD, De Ceballos ML, Rose S, et al. Effects of a unilateral 6-hydroxydopamine lesion and prolonged L-3,4-dihydroxyphenylalanine treatment on peptidergic systems in rat basal ganglia. *Eur J Pharmacol* 1992;219:183-92.
288. Torup L, Borsdal J, Sager T. Neuroprotective effect of the neurotensin analogue JMV-449 in a mouse model of permanent middle cerebral ischaemia. *Neurosci Lett* 2003;351:173-6.
289. Toy-Miou-Leong M, Cortes CL, Beaudet A, et al. Receptor trafficking via the perinuclear recycling compartment accompanied by cell division is necessary for permanent neurotensin cell sensitization and leads to chronic mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 2004;279:12636-46.
290. Trudeau LE. Neurotensin regulates intracellular calcium in ventral tegmental area astrocytes: evidence for the involvement of multiple receptors. *Neuroscience* 2000;97:293-302.
291. Tyler BM, Douglas CL, Fauq A, et al. In vitro binding and CNS effects of novel neurotensin agonists that cross the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 1999;38:1027-34.
292. Tyler-McMahon BM, Stewart JA, Farinas F, et al. Highly potent neurotensin analog that causes hypothermia and antinociception. *Eur J Pharmacol*

2000;390:107-11.

293. Uhl GR, Goodman RR, Snyder SH. Neurotensin-containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat: immunohistochemical mapping. *Brain Res* 1979;167:77-91.
294. Uhl GR, Kuhar MJ, Snyder SH. Neurotensin: immunohistochemical localization in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:4059-63.
295. Uhl GR, Snyder SH. Regional and subcellular distributions of brain neurotensin. *Life Sci* 1976;19:1827-32.
296. Uhl GR, Snyder SH. Neurotensin: a neuronal pathway projecting from amygdala through stria terminalis. *Brain Res* 1979;161:522-6.
297. Uhl GR, Whitehouse PJ, Price DL, et al. Parkinson's disease: depletion of substantia nigra neurotensin receptors. *Brain Res* 1984;308:186-90.
298. Urban MO, Coutinho SV, Gebhart GF. Biphasic modulation of visceral nociception by neurotensin in rat rostral ventromedial medulla. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290:207-13.
299. Urban MO, Gebhart GF. Characterization of biphasic modulation of spinal nociceptive transmission by neurotensin in the rat rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 1997;78:1550-62.
300. Urban MO, Smith DJ. Role of neurotensin in the nucleus raphe magnus in opioid-induced antinociception from the periaqueductal gray. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265:580-6.
301. Van Kemmel FM, Dubuc I, Bourdel E, et al. A C-terminal cyclic 8-13 neurotensin fragment analog appears less exposed to neprilysin when it crosses the blood-brain

- barrier than the cerebrospinal fluid-brain barrier in mice. *Neurosci Lett* 1996;217:58-60.
302. Vanakoski J, Mazzanti C, Naukkarinen H, et al. An abundant proneurotensin polymorphism, 479A>G, and a test of its association with alcohol dependence in a Finnish population. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:762-5.
 303. Vandebulcke F, Nouel D, Vincent JP, et al. Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 17):2963-75.
 304. Vanegas H. To the descending pain-control system in rats, inflammation-induced primary and secondary hyperalgesia are two different things. *Neurosci Lett* 2004;361:225-8.
 305. Vankova M, Arluison M, Leviel V, et al. Afferent connections of the rat substantia nigra pars lateralis with special reference to peptide-containing neurons of the amygdalo-nigral pathway. *J Chem Neuroanat* 1992;5:39-50.
 306. Villeneuve P, Feliciangeli S, Croissandeau G, et al. Altered processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in PC2 knock down mice: a biochemical and immunohistochemical study. *J Neurochem* 2002;82:783-93.
 307. Villeneuve P, Lafortune L, Seidah NG, et al. Immunohistochemical evidence for the involvement of protein convertases 5A and 2 in the processing of pro-neurotensin in rat brain. *J Comp Neurol* 2000;424:461-75.
 308. Villeneuve P, Seidah NG, Beaudet A. Immunohistochemical evidence for the implication of PC1 in the processing of proneurotensin in rat brain. *Neuroreport* 2000;11:3443-7.
 309. Vincent B, Vincent JP, Checler F. Neurotensin and neuromedin N undergo distinct

- catabolic processes in murine astrocytes and primary cultured neurons. *Eur J Biochem* 1994;221:297-306.
310. Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:302-9.
311. Vita N, Laurent P, Lefort S, et al. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett* 1993;317:139-42.
312. Vita N, Oury-Donat F, Chalon P, et al. Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Pharmacol* 1998;360:265-72.
313. von Euler G, Mailleux P, Vanderhaeghen JJ, et al. Neurotensin reduces the affinity of dopamine D2 receptors in membranes from post mortem human caudate-putamen. *Neurosci Lett* 1990;109:325-30.
314. von Euler G, Meister B, Hokfelt T, et al. Intraventricular injection of neurotensin reduces dopamine D2 agonist binding in rat forebrain and intermediate lobe of the pituitary gland. Relationship to serum hormone levels and nerve terminal coexistence. *Brain Res* 1990;531:253-62.
315. von Euler G, Meister B, Hokfelt T, et al. Intraventricular injection of neurotensin reduces the binding of dopamine D-2 receptors in the rat forebrain. *Acta Physiol Scand* 1989;137:309-10.
316. von Euler G, van der Ploeg I, Fredholm BB, et al. Neurotensin decreases the affinity of dopamine D2 agonist binding by a G protein-independent mechanism. *J Neurochem* 1991;56:178-83.
317. Wagstaff JD, Bush LG, Gibb JW, et al. Endogenous neurotensin antagonizes

- methamphetamine-enhanced dopaminergic activity. *Brain Res* 1994;665:237-44.
318. Walker N, Lepee-Lorgeoux I, Fournier J, et al. Tissue distribution and cellular localization of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;57:193-200.
319. Wang L, Friess H, Zhu Z, et al. Neurotensin receptor-1 mRNA analysis in normal pancreas and pancreatic disease. *Clin Cancer Res* 2000;6:566-71.
320. Wang QP, Guan JL, Nakai Y. Synaptic relations of neurotensinergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Peptides* 1995;16:1421-7.
321. Wang XM, Evers BM. Characterization of early developmental pattern of expression of neurotensin/neuromedin N gene in foregut and midgut. *Dig Dis Sci* 1999;44:33-40
322. Watanobe H, Takebe K. In vivo release of neurotensin from the median eminence of ovariectomized estrogen-primed rats as estimated by push-pull perfusion: correlation with luteinizing hormone and prolactin surges. *Neuroendocrinology* 1993;57:760-4.
323. Waters CM, Hunt SP, Jenner P, et al. Localization of neurotensin receptors in the forebrain of the common marmoset and the effects of treatment with the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res* 1987;412:244-53.
324. Watts AG, Sanchez-Watts G. Region-specific regulation of neuropeptide mRNAs in rat limbic forebrain neurones by aldosterone and corticosterone. *J Physiol* 1995;484 (Pt 3):721-36.
325. Wenk GL, Markowska AL, Olton DS. Basal forebrain lesions and memory: alterations in neurotensin, not acetylcholine, may cause amnesia. *Behav Neurosci* 1989;103:765-9.

326. Werkman TR, Kruse CG, Nievelstein H, et al. 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* 2000;95:417-23.
327. Widerlov E, Lindstrom LH, Besev G, et al. Subnormal CSF levels of neurotensin in a subgroup of schizophrenic patients: normalization after neuroleptic treatment. *Am J Psychiatry* 1982;139:1122-6.
328. Wilding JP, Gilbey SG, Bailey CJ, et al. Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology* 1993;132:1939-44.
329. Williams FG, Mullet MA, Beitz AJ. Basal release of Met-enkephalin and neurotensin in the ventrolateral periaqueductal gray matter of the rat: a microdialysis study of antinociceptive circuits. *Brain Res* 1995;690:207-16.
330. Williams FG, Murtaugh MP, Beitz AJ. The effect of acute haloperidol treatment on brain proneurotensin mRNA: in situ hybridization analyses using a novel fluorescence detection procedure. *Brain Res Mol Brain Res* 1990;7:347-58.
331. Yamada M, Yamada M, Lombet A, et al. Distinct functional characteristics of levocabastine sensitive rat neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Life Sci* 1998;62:PL 375-80.
332. Yamada M, Yamada M, Richelson E. Heterogeneity of melanized neurons expressing neurotensin receptor messenger RNA in the substantia nigra and the nucleus paranigralis of control and Parkinson's disease brain. *Neuroscience* 1995;64:405-17.
333. Zahm DS, Grosu S, Williams EA, et al. Neurons of origin of the neurotensinergic

- plexus enmeshing the ventral tegmental area in rat: retrograde labeling and in situ hybridization combined. *Neuroscience* 2001;104:841-51.
334. Zahm DS, Gruber C, Veh RH, et al. Inputs to the central extended amygdala recipient region of the nigral complex in the rat. [Abstract] Abstract Viewer/Itinerary Planner, Society for Neuroscience, On-line 2005;301.11
335. Zahm DS, Williams ES, Krause JE, et al. 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* 1998;400:487-503.
336. Zhao D, Keates AC, Kuhnt-Moore S, et al. Signal transduction pathways mediating neurotensin-stimulated interleukin-8 expression in human colonocytes. *J Biol Chem* 2001;276:44464-71.
337. Zupanc GK. Peptidergic transmission: from morphological correlates to functional implications. *Micron* 1996;27:35-91.

Conclusion

Le système dopaminergique est impliqué dans plusieurs processus physiologiques et certains de ses dysfonctionnements entraînent des conditions pathologiques. La compréhension et la connaissance des facteurs modulant l'activité des neurones dopaminergiques sont donc importantes pour la compréhension de ces fonctions pathologiques.

L'effet excitateur de la neurotensine est connu depuis plusieurs années, mais nos travaux ont permis l'avancement des connaissances sur les mécanismes cellulaires qui régissent cet effet. Nous avons notamment démontré que la neurotensine induit une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire dans les neurones dopaminergiques et que la présence de cet ion est essentielle à son effet sur ces neurones. L'effet de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques était aussi connu comme le résultat de l'ouverture de conductances potassiques. Nous avons également établi l'implication de conductances cationiques dans cet effet. En plus d'augmenter le niveau d'excitabilité des neurones dopaminergiques, la neurotensine agit aussi sur ces cellules en diminuant l'effet inhibiteur induit par l'activation de l'autorécepteur D2. Nous avons démontré l'implication de la PKC dans cette action de la neurotensine sur la fonction du récepteur D2.

Nos travaux apportent ainsi une meilleure compréhension de la nature de l'effet excitateur de la neurotensine sur les neurones dopaminergiques et de l'interaction entre la neurotensine et la dopamine.

Bibliographie

- Aarsland D, Tandberg E, Larsen JP, Cummings JL (1996) Frequency of dementia in Parkinson disease. *Arch Neurol* 53:538-42.
- Abi-Dargham A, Laruelle M (2005) Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *Eur Psychiatry* 20: 15-27.
- Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles LS, Weiss R, Cooper TB, Mann JJ, Van Heertum RL, Gorman JM, Laruelle M (2000) Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8104-9.
- Adachi DK, Kalivas PW, Schenk JO (1990) Neurotensin binding to dopamine. *J Neurochem* 54:1321-8.
- Agnati LF, Fuxe K, Benfenati F, Battistini N (1983) Neurotensin in vitro markedly reduces the affinity in subcortical limbic 3H-N-propylnorapomorphine binding sites. *Acta Physiol Scand* 119:459-61.
- Ahmad S, Berezin I, Vincent JP, Daniel EE (1987) Neurotensin receptors in canine intestinal smooth muscle: preparation of plasma membranes and characterization of (Tyr3-125I)-labelled neurotensin binding. *Biochim Biophys Acta* 896:224-38.
- Almenoff J, Wilk S, Orlowski M (1981) Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochem Biophys Res Commun* 102:206-14.
- Amar S, Mazella J, Checler F, Kitabgi P, Vincent JP (1985) Regulation of cyclic GMP levels by neurotensin in neuroblastoma clone N1E115. *Biochem Biophys Res Commun* 129:117-25.

- Ancellin N, Morel A (1998) Homologous and heterologous acute desensitization of vasopressin V1a receptor in *Xenopus* oocytes. *Cell Signal* 10:217-23.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129-42.
- Araque A, Martin ED, Perea G, Arellano JI, Buno W (2002) Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22:2443-50.
- Ascher JA, Cole JO, Colin JN, Feighner JP, Ferris RM, Fibiger HC, Golden RN, Martin P, Potter WZ, Richelson E, et al (1995) Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. *J Clin Psychiatry* 56:395-401.
- Asselin ML, Dubuc I, Coquerel A, Costentin J (2001) Localization of neurotensin NTS2 receptors in rat brain, using. *Neuroreport* 12:1087-91.
- Augeron C, Voisin T, Maoret JJ, Berthon B, Laburthe M, Laboisse CL (1992) Neurotensin and neuromedin N stimulate mucin output from human goblet cells (Cl.16E) via neurotensin receptors. *Am J Physiol* 262:G470-6.
- Bachelet CM, Scarceriaux V, Rostene W, Pelaprat D (1997) Evidence for neurotensin autoreceptors and relationship of neurotensin and its receptors with tyrosine hydroxylase-positive neurons in rat primary hypothalamic cultures. *Eur J Neurosci* 9:1483-7.
- Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E (1995) Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 377:424-8.

- Baker GB, Prior TI (2002) Stereochemistry and drug efficacy and development: relevance of chirality to antidepressant and antipsychotic drugs. *Ann Med* 34:537-43.
- Baldessarini RJ, Tarazi FI (1996) Brain dopamine receptors: a primer on their current status, basic and clinical. *Harv Rev Psychiatry* 3:301-25.
- Barbero P, Rovere C, De Bie I, Seidah N, Beaudet A, Kitabgi P (1998) PC5-A-mediated processing of pro-neurotensin in early compartments of the regulated secretory pathway of PC5-transfected PC12 cells. *J Biol Chem* 273:25339-46.
- Bean AJ, Dagerlind A, Hokfelt 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* 50:259-68.
- Beart PM, McDonald D, Gundlach AL (1979) Mesolimbic dopaminergic neurones and somatodendritic mechanisms. *Neurosci Lett* 15:165-70.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR, Caron MG (2004) Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5099-104.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 122:261-73.
- Benoit-Marand M, Jaber M, Gonon F (2000) Release and elimination of dopamine in vivo in mice lacking the dopamine transporter: functional consequences. *Eur J Neurosci* 12:2985-92.

- Binder EB, Kinkead B, Owens MJ, Nemeroff CB (2001) Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacol Rev* 53:453-86.
- Bofill-Cardona E, Kudlacek O, Yang Q, Ahorn H, Freissmuth M, Nanoff C (2000) Binding of calmodulin to the D2-dopamine receptor reduces receptor signaling by arresting the G protein activation switch. *J Biol Chem* 275:32672-80.
- Bolden-Watson C, Watson MA, Murray KD, Isackson PJ, Richelson E (1993) Haloperidol but not clozapine increases neurotensin receptor mRNA levels in rat substantia nigra. *J Neurochem* 61:1141-3.
- Borges S, Gleason E, Frerking M, Wilson M (1996) Neurotensin induces calcium oscillations in cultured amacrine cells. *Vis Neurosci* 13:311-8.
- Botto JM, Guillemare E, Vincent JP, Mazella J (1997) Effects of SR 48692 on neurotensin-induced calcium-activated chloride currents in the *Xenopus* oocyte expression system: agonist-like activity on the levocabastine-sensitive neurotensin receptor and absence of antagonist effect on the levocabastine insensitive neurotensin receptor. *Neurosci Lett* 223:193-6.
- Boudin H, Pelaprat D, Rostene 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, Pelaprat D, Rostene W, Pickel VM, Beaudet A (1998) Correlative ultrastructural distribution of neurotensin receptor proteins and binding sites in the rat substantia nigra. *J Neurosci* 18:8473-84.

- Bowery B, Rothwell LA, Seabrook GR (1994) Comparison between the pharmacology of dopamine receptors mediating the inhibition of cell firing in rat brain slices through the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. *Br J Pharmacol* 112:873-80.
- Bozou JC, Amar S, Vincent JP, Kitabgi P (1986) Neurotensin-mediated inhibition of cyclic AMP formation in neuroblastoma N1E115 cells: involvement of the inhibitory GTP-binding component of adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 29:489-96.
- Broome MR, Woolley JB, Tabraham P, Johns LC, Bramon E, Murray GK, Pariante C, McGuire PK, Murray RM (2005) What causes the onset of psychosis? *Schizophr Res* 79:23-34.
- Brouard A, Pelaprat D, Vial M, Lhiaubet AM, Rostene W (1994) Effects of ion channel blockers and phorbol ester treatments on dopamine release and neurotensin facilitation of [³H]dopamine release from rat mesencephalic cells in primary culture. *J Neurochem* 62:1416-25.
- Bunney BS, Walters JR, Roth RH, Aghajanian GK (1973) Dopaminergic neurons: effect of antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity. *J Pharmacol Exp Ther* 185:560-71.
- Bunney BS, Chiodo LA, Grace AA (1991) Midbrain dopamine system electrophysiological functioning: a review and new hypothesis. *Synapse* 9:79-94.
- Cador M, Rivet JM, Kelley AE, Le Moal M, Stinus L (1989) Substance P, neurotensin and enkephalin injections into the ventral tegmental area: comparative study on dopamine turnover in several forebrain structures. *Brain Res* 486:357-63.

- Cameron DL, Wessendorf MW, Williams JT (1997) A subset of ventral tegmental area neurons is inhibited by dopamine, 5-hydroxytryptamine and opioids. *Neuroscience* 77:155-66.
- Candy JM, Perry RH, Perry EK, Irving D, Blessed G, Fairbairn AF, Tomlinson BE (1983) Pathological changes in the nucleus of Meynert in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Neurol Sci* 59:277-89.
- Carlsson A (1988) The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1:179-86.
- Carr DB, Sesack SR (2000) GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* 38:114-123.
- Carraway R, Leeman SE (1973) The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 248:6854-61.
- Castel MN, Morino P, Frey P, Terenius L, Hokfelt T (1993) Immunohistochemical evidence for a neurotensin striatonigral pathway in the rat brain. *Neuroscience* 55:833-47.
- Cathala L, Paupardin-Tritsch D (1997) Neurotensin inhibition of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in the rat substantia nigra pars compacta implicates the protein kinase C pathway. *J Physiol* 503 (Pt 1):87-97.
- Centonze D, Usiello A, Gubellini P, Pisani A, Borrelli E, Bernardi G, Calabresi P (2002) Dopamine D2 receptor-mediated inhibition of dopaminergic neurons in mice lacking D2L receptors. *Neuropsychopharmacology* 27:723-6.
- 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* 268:17138-44.

- Chabry J, Labbe-Jullie C, Gully D, Kitabgi P, Vincent JP, Mazella J (1994a) Stable expression of the cloned rat brain neurotensin receptor into fibroblasts: binding properties, photoaffinity labeling, transduction mechanisms, and internalization. *J Neurochem* 63:19-27.
- Chalon P, Vita N, Kaghad M, Guillemot M, Bonnin J, Delpech B, Le Fur G, Ferrara P, Caput D (1996) Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett* 386:91-4.
- Checler F, Vincent JP, Kitabgi P (1986) Purification and characterization of a novel neurotensin-degrading peptidase from rat brain synaptic membranes. *J Biol Chem* 261:11274-81.
- Chung, H., Wisner, O., Ehlers, M., and Jan LY. Neuronal activity regulates GIRK channel trafficking. *Asbstr SFN* . 2005.
- Ciriello J, Caverson MM, Calaresu FR, Krukoff TL (1988) Neuropeptide and serotonin immunoreactive neurons in the cat ventrolateral medulla. *Brain Res* 440:53-66.
- Cragg SJ, Greenfield SA (1997) Differential autoreceptor control of somatodendritic and axon terminal dopamine release in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J Neurosci* 17:5738-46.
- Cragg SJ, Hawkey CR, Greenfield SA (1997) Comparison of serotonin and dopamine release in substantia nigra and ventral tegmental area: region and species differences. *J Neurochem* 69:2378-86.
- Cusack B, Richelson E, Pang YP, Zaidi J, Kozikowski AP (1993) Pharmacological studies on novel neurotensin mimetics: discovery of a pharmacologically unique agent exhibiting concentration-dependent dual effects as antagonist and agonist. *Mol Pharmacol* 44:1036-40.

- 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.
- Dailly E, Chenu F, Renard CE, Bourin M (2004) Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam Clin Pharmacol* 18:601-7.
- Dal Farra C, Sarret P, Navarro V, Botto JM, Mazella J, Vincent JP (2001) Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines. *Int J Cancer* 92:503-9.
- Davila V, Yan Z, Craciun LC, Logothetis D, Sulzer D (2003) D3 dopamine autoreceptors do not activate G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel currents in substantia nigra dopamine neurons. *J Neurosci* 23:5693-7.
- Dawson TM, Dawson VL (2003) Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *J Clin Invest* 111:145-51.
- Descarries L, Berthelet F, Garcia S, Beaudet A (1986) Dopaminergic projection from nucleus raphe dorsalis to neostriatum in the rat. *J Comp Neurol* 249:511-20, 484-5.
- Deutch AY, Ongur D, Duman RS (1995) Antipsychotic drugs induce Fos protein in the thalamic paraventricular nucleus: a novel locus of antipsychotic drug action. *Neuroscience* 66:337-46.
- Diaz-Cabiale Z, Fuxe K, Narvaez JA, Finetti S, Antonelli T, Tanganelli S, Ferraro L (2002) Neurotensin-induced modulation of dopamine D2 receptors and their function in rat striatum: counteraction by a NTR1-like receptor antagonist. *Neuroreport* 13:763-6.
- 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 U S A* 84:3516-20.

- Donato di Paola E, Cusack B, Yamada M, Richelson E (1993) Desensitization and down-regulation of neurotensin receptors in murine neuroblastoma clone N1E-115 by neurotensin(8-13). *J Pharmacol Exp Ther* 264:1-5.
- Dubuc I, Sarret P, Labbe-Jullie C, Botto JM, Honore E, Bourdel E, Martinez J, Costentin J, Vincent JP, Kitabgi P, Mazella J (1999) Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. *J Neurosci* 19:503-10.
- Ekelund J, Hovatta I, Parker A, Paunio T, Varilo T, Martin R, Suhonen J, Ellonen P, Chan G, Sinsheimer JS, Sobel E, Juvonen H, Arajärvi R, Partonen T, Suvisaari J, Lonnqvist J, Meyer J, Peltonen L (2001) Chromosome 1 loci in Finnish schizophrenia families. *Hum Mol Genet* 10:1611-7.
- Elde R, Schalling M, Ceccatelli S, Nakanishi S, Hokfelt T (1990) Localization of neuropeptide receptor mRNA in rat brain: initial observations using probes for neurotensin and substance P receptors. *Neurosci Lett* 120:134-8.
- Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, Karayiorgou M, Gogos JA (2004) Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia. *Nat Genet* 36:131-7.
- Faggin BM, Zubieta JK, Rezvani AH, Cubeddu LX (1990) Neurotensin-induced dopamine release in vivo and in vitro from substantia nigra and nucleus caudate. *J Pharmacol Exp Ther* 252:817-25.
- Falk T, Zhang S, Erbe EL, Sherman SJ (2006) Neurochemical and electrophysiological characteristics of rat striatal neurons in primary culture. *J Comp Neurol* 494:275-89.
- Falkenburger BH, Barstow KL, Mintz IM (2001) Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport. *Science* 293:2465-70.

- 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* 76:1968-81.
- 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* 231:21-4.
- Fassio A, Evans G, Grisshammer R, Bolam JP, Mimmack M, Emson PC (2000) Distribution of the neurotensin receptor NTS1 in the rat CNS studied using an amino-terminal directed antibody. *Neuropharmacology* 39:1430-42.
- Faure MP, Nouel D, Beaudet A (1995) Axonal and dendritic transport of internalized neurotensin in rat mesostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience* 68:519-29.
- Fawaz, C. S., Martel, P., and Trudeau, L. E. Presynaptic action of neurotensin on dopamine release through D2 receptor inhibition. *Communication personnelle*.
- Flores JA, Galan-Rodriguez B, Ramiro-Fuentes S, Fernandez-Espejo E (2005) Role for Dopamine Neurons of the Rostral Linear Nucleus and Periaqueductal Gray in the Rewarding and Sensitizing Properties of Heroin. *Neuropsychopharmacology*.
- Ford AP, Marsden CA (1990) In vivo neurochemical and behavioural effects of intracerebrally administered neurotensin and D-Trp11-neurotensin on mesolimbic and nigrostriatal dopaminergic function in the rat. *Brain Res* 534:243-50.
- Fortin GD, Desrosiers CC, Yamaguchi N, Trudeau LE (2006) Basal somatodendritic dopamine release requires snare proteins. *J Neurochem* 96:1740-9.
- Fuxe K, Agnati LF (1985) Receptor-receptor interactions in the central nervous system. A new integrative mechanism in synapses. *Med Res Rev* 5:441-82.

- Fuxe K, O'Connor WT, Antonelli T, Osborne PG, Tanganelli S, Agnati LF, Ungerstedt U (1992a) Evidence for a substrate of neuronal plasticity based on pre- and postsynaptic neurotensin-dopamine receptor interactions in the neostriatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5591-95.
- Fuxe K, Von Euler G, Agnati LF, Merlo Pich E, O'Connor WT, Tanganelli S, Li XM, Tinner B, Cintra A, Carani C, et al (1992b) Intramembrane interactions between neurotensin receptors and dopamine D2 receptors as a major mechanism for the neuroleptic-like action of neurotensin. *Ann N Y Acad Sci* 668:186-204.
- Fuxe K, Ferre S, Zoli M, Agnati LF (1998) Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev* 26:258-73.
- Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 27:107-44.
- Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prezeau L, Pin JP (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J* 20:2152-9.
- Gao K, Calabrese JR (2005) Newer treatment studies for bipolar depression. *Bipolar Disord* 7 Suppl 5:13-23.
- 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* 148:484-8.

- Gazi L, Lopez-Gimenez JF, Strange PG (2002) Formation of oligomers by G protein-coupled receptors. *Curr Opin Drug Discov Devel* 5:756-63.
- Gelb DJ, Oliver E, Gilman S (1999) Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol* 56:33-9.
- Genc B, Ulupinar E, Erzurumlu RS (2005) Differential Trk expression in explant and dissociated trigeminal ganglion cell cultures. *J Neurobiol* 64:145-56.
- Gendron L, Perron A, Payet MD, Gallo-Payet N, Sarret P, Beaudet A (2004) Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Mol Pharmacol* 66:1421-30.
- George SR, Lee SP, Varghese G, Zeman PR, Seeman P, Ng GY, O'Dowd BF (1998) A transmembrane domain-derived peptide inhibits D1 dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization. *J Biol Chem* 273:30244-8.
- Gilbert JA, Richelson E (1984) Neurotensin stimulates formation of cyclic GMP in murine neuroblastoma clone N1E-115. *Eur J Pharmacol* 99:245-6.
- Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluís C, Ferré S, Fuxe K, Franco R (2000) Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8606-11.
- Girault JA, Spampinato U, Savaki HE, Glowinski J, Besson MJ (1986) In vivo release of gamma-aminobutyric acid in the rat neostriatum--I. Characterization and topographical heterogeneity of the effects of dopaminergic and cholinergic agents. *Neuroscience* 19:1101-8.
- Goedert M, Pinnock RD, Downes CP, Mantyh PW, Emson PC (1984a) Neurotensin stimulates inositol phospholipid hydrolysis in rat brain slices. *Brain Res* 323:193-7.

- Goedert M, Pittaway K, Emson PC (1984b) Neurotensin receptors in the rat striatum: lesion studies. *Brain Res* 299:164-8.
- Gogos JA, Morgan M, Luine V, Santha M, Ogawa S, Pfaff D, Karayiorgou M (1998) Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *PNAS*, 95:9991-6.
- Goldman JE, Yen SH, Chiu FC, Peress NS (1983) Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science* 221:1082-4.
- Gonzales C, Chesselet MF (1990) Amygdalonigral pathway: an anterograde study in the rat with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol* 297:182-200.
- Gonzalez-Hernandez T, Barroso-Chinea P, De La Cruz Muros I, Del Mar Perez-Delgado M, Rodriguez M (2004) Expression of dopamine and vesicular monoamine transporters and differential vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons. *J Comp Neurol* 479:198-215.
- Govoni S, Hong JS, Yang HY, Costa E (1980) Increase of neurotensin content elicited by neuroleptics in nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 215:413-7.
- Grace AA, Bunney BS (1984) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* 4:2866-76.
- Grace AA, Onn SP (1989) Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci* 9:3463-81
- Gregerson KA, Flagg TP, O'Neill TJ, Anderson M, Luring O, Horel JS, Welling PA (2001) Identification of G protein-coupled, inward rectifier potassium channel gene products from the rat anterior pituitary gland. *Endocrinology* 142:2820-32.

- Gully D, Canton M, Boigegrain R, Jeanjean F, Molimard JC, Poncelet M, Gueudet C, Heaulme M, Leyris R, Brouard A, et al (1993) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:65-9.
- Gully D, Labeeuw B, Boigegrain R, Oury-Donat F, Bachy A, Poncelet M, Steinberg R, Suaud-Chagny MF, Santucci V, Vita N, Pecceu F, Labbe-Jullie C, Kitabgi P, Soubrie P, Le Fur G, Maffrand JP (1997) Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 280:802-12.
- Hara Y, Shiosaka S, Senba E, Sakanaka M, Inagaki S, Takagi H, Kawai Y, Takatsuki K, Matsuzaki T, Tohyama M (1982) Ontogeny of the neurotensin-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis. I. Forebrain and diencephalon. *J Comp Neurol* 208:177-95.
- Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (2002) Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 454:15-33.
- Hawkes C, Jhamandas JH, Harris KH, Fu W, MacDonald RG, Kar S (2006) Single transmembrane domain insulin-growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor regulates central cholinergic function by activating a G-protein-sensitive, protein kinase-C dependent pathway. *J Neurosci* 26:585-96.
- Hayakawa T, Chang MC, Rapoport SI, Appel NM (2001) Selective dopamine receptor stimulation differentially affects arachidonic acid incorporation, a surrogate marker for phospholipase A2-mediated neurotransmitter signal transduction, in a rodent model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 296:1074-84.

- Hazlett EA, Buchsbaum MS, Byne W, Wei TC, Spiegel-Cohen J, Geneve C, Kinderlehrer R, Haznedar MM, Shihabuddin L, Siever LJ (1999) Three-dimensional analysis with MRI and PET of the size, shape, and function of the thalamus in the schizophrenia spectrum. *Am J Psychiatry* 156:1190-9.
- Heaulme M, Leyris R, Le Fur G, Soubrie P (1997) Involvement of potentially distinct neurotensin receptors in neurotensin-induced stimulation of striatal dopamine release evoked by KCl versus electrical depolarization. *Neuropharmacology* 36:1447-54.
- 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. *Brain Res Mol Brain Res* 15:332-8.
- 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* 198:400-7.
- Hermans E, Gailly P, Gillis JM, Octave JN, Maloteaux JM (1995) Lack of rapid desensitization of Ca²⁺ responses in transfected CHO cells expressing the rat neurotensin receptor despite agonist-induced internalization. *J Neurochem* 64: 2518-25.
- 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 Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337:13-7.
- Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluís C, Franco R, Ferré S, Fuxe K (2002) Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A_{2A} receptors and dopamine D₂ receptors. *J Biol Chem* 277:18091-7.

- Hirayasu Y, Tanaka S, Shenton ME, Salisbury DF, DeSantis MA, Levitt JJ, Wible C, Yurgelun-Todd D, Kikinis R, Jolesz FA, McCarley RW (2001) Prefrontal gray matter volume reduction in first episode schizophrenia. *Cereb Cortex* 11:374-81.
- Hökfelt T, Everitt BJ, Theodorsson-Norheim E, Goldstein M (1984) Occurrence of neurotensinlike immunoreactivity in subpopulations of hypothalamic, mesencephalic, and medullary catecholamine neurons. *J Comp Neurol* 222:543-59.
- Hosli E, Stauffer S, Hosli L (1995) Autoradiographic and electrophysiological evidence for the existence of neurotensin receptors on cultured astrocytes. *Neuroscience* 66:627-33.
- Hu XT, Dong Y, Zhang XF, White FJ (2005) Dopamine D2 receptor-activated Ca²⁺ signaling modulates voltage-sensitive sodium currents in rat nucleus accumbens neurons. *J Neurophysiol* 93:1406-17.
- Inanobe A, Yoshimoto Y, Horio Y, Morishige KI, Hibino H, Matsumoto S, Tokunaga Y, Maeda T, Hata Y, Takai Y, Kurachi Y (1999) Characterization of G-protein-gated K⁺ channels composed of Kir3.2 subunits in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *J Neurosci* 19:1006-17.
- Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG (1996) Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35:1503-19.
- Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, Nielsen MS, Gliemann J, Petersen CM (2001) Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chem* 276:22788-96.

- Jakeman LB, Reier PJ, Bregman BS, Wade EB, Dailey M, Kastner RJ, Himes BT, Tessler A (1989) Differentiation of substantia gelatinosa-like regions in intraspinal and intracerebral transplants of embryonic spinal cord tissue in the rat. *Exp Neurol* 103:17-33.
- Jan LY, Jan YN (1994) Potassium channels and their evolving gates. *Nature* 371:119-22.
- Jennes L, Stumpf WE, Kalivas PW (1982) Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 210:211-24.
- Jiang ZG, Pessia M, North RA (1993) Dopamine and baclofen inhibit the hyperpolarization-activated cation current in rat ventral tegmental neurones. *J Physiol* 462:753-64.
- Jiang ZG, Pessia M, North RA (1994) Neurotensin excitation of rat ventral tegmental neurones. *J Physiol* 474:119-29.
- Jirousek MR, Gillig JR, Gonzalez CM, Heath WF, McDonald JH 3rd, Neel DA, Rito CJ, Singh U, Stramm LE, Melikian-Badalian A, Baevsky M, Ballas LM, Hall SE, Winneroski LL, Faul MM (1996) (S)-13-[(dimethylamino)methyl]-10,11,14,15-tetrahydro-4,9:16, 21-dimetheno-1H, 13H-dibenzo[e,k]pyrrolo [3,4-h] [1,4,13] oxadiazacyclohexadecene-1,3(2H)-dione (LY333531) and related analogues: isozyme selective inhibitors of protein kinase C beta. *J Med Chem* 39:2664-71.
- Johnson SW, North RA (1992) Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol* 450:455-68.
- Jolas T, Aghajanian GK (1996) Neurotensin excitation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. *Eur J Neurosci* 8:153-61.
- Jolicoeur FB, Gagne MA, Rivest R, Drumheller A, St-Pierre S (1993) Atypical neuroleptic-like behavioral effects of neurotensin. *Brain Res Bull* 32:487-91.

- Jomphe C, Tiberi M, Trudeau LE (2006) Expression of D2 receptor isoforms in cultured neurons reveals equipotent autoreceptor function. *Neuropharmacology* 50:595-605.
- Jones S, Kauer JA (1999) Amphetamine depresses excitatory synaptic transmission via serotonin receptors in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 19:9780-7.
- Jones SR, Gainetdinov RR, Jaber M, Giros B, Wightman RM, Caron MG (1998) Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4029-34.
- Kabbani N, Negyessy L, Lin R, Goldman-Rakic P, Levenson R (2002) Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J Neurosci* 22:8476-86.
- Kalivas PW, Duffy P (1990) Effect of acute and daily neurotensin and enkephalin treatments on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 10:2940-9.
- 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.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683-92.
- Karschin C, Schreibmayer W, Dascal N, Lester H, Davidson N, Karschin A (1994) Distribution and localization of a G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channel in the rat. *FEBS Lett* 348:139-44.
- Karschin C, Dissmann E, Stuhmer W, Karschin A (1996) IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J Neurosci* 16:3559-70.

- Kennedy RT, Jones SR, Wightman RM (1992) Dynamic observation of dopamine autoreceptor effects in rat striatal slices. *J Neurochem* 59:449-55.
- Khan ZU, Mrzljak L, Gutierrez A, de la Calle A, Goldman-Rakic PS (1998) Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7731-6.
- 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* 37:1547-54.
- Kim KM, Nakajima Y, Nakajima S (1995) G protein-coupled inward rectifier modulated by dopamine agonists in cultured substantia nigra neurons. *Neuroscience* 69:1145-58.
- Kinkead B, Nemeroff CB (1994) The effects of typical and atypical antipsychotic drugs on neurotensin-containing neurons in the central nervous system. *J Clin Psychiatry* 55 Suppl B:30-2.
- Kirkpatrick K, Bourque CW (1995) Effects of neurotensin on rat supraoptic nucleus neurones in vitro. *J Physiol* 482 (Pt 2):373-81.
- Kislauskis E, Bullock B, 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* 263:4963-8.
- Kitabgi P (2002) Targeting neurotensin receptors with agonists and antagonists for therapeutic purposes. *Curr Opin Dicov Dev* 5: 764-76.
- Kitabgi P, Kwan CY, Fox JE, Vincent JP (1984) Characterization of neurotensin binding to rat gastric smooth muscle receptor sites. *Peptides* 5:917-23.

- Kitabgi P, Checler F, Mazella J, Vincent JP (1985) Pharmacology and biochemistry of neurotensin receptors. *Rev Clin Basic Pharm* 5:397-486.
- Kitabgi P, Rostene W, Dussailant M, Schotte A, Laduron PM, Vincent JP (1987) Two populations of neurotensin binding sites in murine brain: discrimination by the antihistamine levocabastine reveals markedly different radioautographic distribution. *Eur J Pharmacol* 140:285-93.
- 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 U S A* 74:1846-50.
- Kiyama H, Inagaki S, Kito S, Tohyama M (1987) Ontogeny of neurotensin binding sites in the rat cerebral cortex: autoradiographic study. *Brain Res* 428:303-6.
- Kobayashi T, Ikeda K, Ichikawa T, Abe S, Togashi S, Kumanishi T (1995) Molecular cloning of a mouse G-protein-activated K⁺ channel (mGIRK1) and distinct distributions of three GIRK (GIRK1, 2 and 3) mRNAs in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 208:1166-73.
- Koga E, Momiyama T (2000) Presynaptic dopamine D2-like receptors inhibit excitatory transmission onto rat ventral tegmental dopaminergic neurones. *J Physiol* 523 Pt 1:163-73.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362:127-33.
- Kuczenski R, Segal DS, Aizenstein ML (1991) Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. *J Neurosci* 11:2703-12.

- Kulhara P, Avasthi A (2003) Influence of depressive symptoms and premorbid adjustment on factor structure of phenomenology of schizophrenia: a study from India. *Eur Psychiatry* 18:226-32.
- Kuzhikandathil EV, Yu W, Oxford GS (1998) Human dopamine D3 and D2L receptors couple to inward rectifier potassium channels in mammalian cell lines. *Mol Cell Neurosci* 12:390-402.
- Labbe-Jullie C, Dubuc I, Brouard A, Doulut S, Bourdel E, Pelaprat D, Mazella J, Martinez J, Rostene W, Costentin J, et al (1994) In vivo and in vitro structure-activity studies with peptide and pseudopeptide neurotensin analogs suggest the existence of distinct central neurotensin receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 268:328-36.
- Lacey MG, Mercuri NB, North RA (1987) Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J Physiol* 392:397-416.
- Lacey MG, Mercuri NB, North RA (1989) Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids. *J Neurosci* 9:1233-41.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, Gil R, Kegeles L, Innis R (1999) Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol Psychiatry* 46 : 56-72.
- Leeman SE, Carraway RE (1982) Neurotensin: discovery, isolation, characterization, synthesis and possible physiological roles. *Ann N Y Acad Sci* 400:1-16.
- Legault M, Congar P, Michel FJ, Trudeau LE (2002) Presynaptic action of neurotensin on cultured ventral tegmental area dopaminergic neurones. *Neuroscience* 111:177-87.

- 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.
- Levant B, Bancroft GN (1998) Inhibition of quinpirole binding by a monoamine oxidase inhibitor in subcellular fractions of rat striatum. *Life Sci* 63:1643-51.
- Leysen JE, Gommeren W, Mertens J, Luyten WH, Pauwels PJ, Ewert M, Seeburg P (1993) Comparison of in vitro binding properties of a series of dopamine antagonists and agonists for cloned human dopamine D2S and D2L receptors and for D2 receptors in rat striatal and mesolimbic tissues, using 2'-iodospiperone. *Psychopharmacology (Berl)* 110:27-36.
- Li AH, Hwang HM, Tan PP, Wu T, Wang HL (2001a) Neurotensin excites periaqueductal gray neurons projecting to the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 85:1479-88.
- Li AH, Yeh TH, Tan PP, Hwang HM, Wang HL (2001b) Neurotensin excitation of serotonergic neurons in the rat nucleus raphe magnus: ionic and molecular mechanisms. *Neuropharmacology* 40:1073-83.
- Li XM, Ferraro L, Tanganelli S, O'Connor WT, Hasselrot U, Ungerstedt U, Fuxe K (1995) Neurotensin peptides antagonistically regulate postsynaptic dopamine D2 receptors in rat nucleus accumbens: a receptor binding and microdialysis study. *J Neural Transm Gen Sect* 102:125-37.
- Liao YJ, Jan YN, Jan LY (1996) Heteromultimerization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel proteins GIRK1 and GIRK2 and their altered expression in weaver brain. *J Neurosci* 16:7137-50.

- Lieberman JA, Mailman RB, Duncan G, Sikich L, Chakos M, Nichols DE, Kraus JE (1998) Serotonergic basis of antipsychotic drug effects in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 44:1099-117.
- Lindgren N, Usiello A, Goiny M, Haycock J, Erbs E, Greengard P, Hokfelt T, Borrelli E, Fisone G (2003) Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4305-9.
- Lindskog M, Svenningsson P, Fredholm BB, Greengard P, Fisone G (1999) Activation of dopamine D2 receptors decreases DARPP-32 phosphorylation in striatonigral and striatopallidal projection neurons via different mechanisms. *Neuroscience* 88:1005-8.
- Liss B, Neu A, Roeper J (1999) The weaver mouse gain-of-function phenotype of dopaminergic midbrain neurons is determined by coactivation of *wvGirk2* and K-ATP channels. *J Neurosci* 19:8839-48.
- Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, Niznik HB (2000) Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* 403:274-80.
- Liu Y, Hillefors-Berglund M, von Euler G (1994) Modulation of dopamine D3 receptor binding by N-ethylmaleimide and neurotensin. *Brain Res* 643:343-8.
- Lledo PM, Homburger V, Bockaert J, Vincent JD (1992) Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptors to K⁺ and Ca²⁺ currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron* 8:455-63.
- Loewy AD, McKellar S (1980) The neuroanatomical basis of central cardiovascular control. *Fed Proc* 39:2495-503.

- Machida R, Tokumura T, Tsuchiya Y, Sasaki A, Abe K (1993) Pharmacokinetics of novel hexapeptides with neurotensin activity in rats. *Biol Pharm Bull* 16:43-7.
- Margolis EB, Hjelmstad GO, Bonci A, Fields HL (2003) Kappa-opioid agonists directly inhibit midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 23: 9981-6.
- Marsault R, Frelin C (1992) Activation by nitric oxide of guanylate cyclase in endothelial cells from brain capillaries. *J Neurochem* 59:942-5.
- Martin S, Navarro V, Vincent JP, Mazella J (2002) Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* 123:1135-43.
- Martin S, Vincent JP, Mazella J (2003) Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J Neurosci* 23:1198-205.
- Margolis EB, Hjelmstad GO, Bonci A, Fields HL (2003) Kappa-opioid agonists directly inhibit midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 23:9981-6.
- Margolis EB, Lock H, Hjelmstad GO, Fields HL (2006) The ventral tegmental area revisited: Is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *J Physiol*
- Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC (1992) Effects of dopaminergic transmission interruption on the D2 receptor isoforms in various cerebral tissues. *J Neurochem* 58:673-9.
- Mazella J (2001) Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* 13:1-6.

- Mazella J, Poustis C, Labbe C, Checler F, Kitabgi P, Granier C, van Rietschoten J, Vincent JP (1983) Monoiodo-[Trp¹¹]neurotensin, a highly radioactive ligand of neurotensin receptors. Preparation, biological activity, and binding properties to rat brain synaptic membranes. *J Biol Chem* 258:3476-81.
- Mazella J, Amar S, Bozou JC, Kitabgi P, Vincent JP (1987) Functional properties and molecular structure of central and peripheral neurotensin receptors. *J Recept Res* 7:157-65.
- Mazella J, Chabry J, Zsurger N, Vincent JP (1989) Purification of the neurotensin receptors from mouse brain by affinity chromatography. *J Biol Chem* 264:5559-63.
- Mazella J, Leonard K, Chabry J, Kitabgi P, Vincent JP, Beaudet A (1991) Binding and internalization of iodinated neurotensin in neuronal cultures from embryonic mouse brain. *Brain Res* 564:249-55.
- Mazella J, Botto JM, Guillemare E, Coppola T, Sarret P, Vincent JP (1996) Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J Neurosci* 16:5613-20.
- Mazella J, Zsurger N, Navarro V, Chabry J, Kaghad M, Caput D, Ferrara 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* 273:26273-6.
- Merchant KM, Dobner PR, Dorsa DM (1992) Differential effects of haloperidol and clozapine on neurotensin gene transcription in rat neostriatum. *J Neurosci* 12:652-63.
- Mercuri NB, Stratta F, Calabresi P, Bernardi G (1993) Neurotensin induces an inward current in rat mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci Lett* 153:192-6.

- Mercuri NB, Bonci A, Calabresi P, Stefani A, Bernardi G (1995) Properties of the hyperpolarization-activated cation current I_h in the rat midbrain dopaminergic neurones. *Eur J Neurosci* 7:462-9.
- Mercuri NB, Saiardi A, Bonci A, Picetti R, Calabresi P, Bernardi G, Borrelli E (1997) Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience* 79:323-7.
- Merschdorf U, Berg D, Csoti I, Fornadi F, Merz B, Naumann M, Becker G, Supprian T (2003) Psychopathological symptoms of depression in Parkinson's disease compared to major depression. *Psychopathology* 36:221-5.
- Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ (2000) Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9:1415-23.
- Miyamoto S, LaMantia AS, Duncan GE, Sullivan P, Gilmore JH, Lieberman JA (2003) Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv* 3:27-39.
- Morris BJ, Cochran SM, Pratt JA (2005) PCP: from pharmacology to modelling schizophrenia. *Curr Opin Pharmacol* 5: 101-6.
- 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* 273:3582-7.
- Motoi Y, Aizawa T, Haga S, Nakamura S, Namba Y, Ikeda K (1999) Neuronal localization of a novel mosaic apolipoprotein E receptor, LR11, in rat and human brain. *Brain Res* 833:209-15.
- Mueser KT, McGurk SR (2004) Schizophrenia. *Lancet* 363:2063-72.

- Mercuri NB, Bonci A, Calabresi P, Stefani A, Bernardi G (1995) Properties of the hyperpolarization-activated cation current I_h in the rat midbrain dopaminergic neurones. *Eur J Neurosci* 7:462-9.
- Mercuri NB, Saiardi A, Bonci A, Picetti R, Calabresi P, Bernardi G, Borrelli E (1997) Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience* 79:323-7.
- Merschdorf U, Berg D, Csoti I, Fornadi F, Merz B, Naumann M, Becker G, Supprian T (2003) Psychopathological symptoms of depression in Parkinson's disease compared to major depression. *Psychopathology* 36:221-5.
- Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ (2000) Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9:1415-23.
- Miyamoto S, LaMantia AS, Duncan GE, Sullivan P, Gilmore JH, Lieberman JA (2003) Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv* 3:27-39.
- Morris BJ, Cochran SM, Pratt JA (2005) PCP: from pharmacology to modelling schizophrenia. *Curr Opin Pharmacol* 5: 101-6.
- 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* 273:3582-7.
- Motoi Y, Aizawa T, Haga S, Nakamura S, Namba Y, Ikeda K (1999) Neuronal localization of a novel mosaic apolipoprotein E receptor, LR11, in rat and human brain. *Brain Res* 833:209-15.
- Mueser KT, McGurk SR (2004) Schizophrenia. *Lancet* 363:2063-72.

- Mundell SJ, Pula G, McIlhinney RA, Roberts PJ, Kelly E (2004) Desensitization and internalization of metabotropic glutamate receptor 1a following activation of heterologous Gq/11-coupled receptors. *Biochemistry* 43:7541-51.
- Murer G, Adelbrecht C, Lauritzen I, Lesage F, Lazdunski M, Agid Y, Raisman-Vozari R (1997) An immunocytochemical study on the distribution of two G-protein-gated inward rectifier potassium channels (GIRK2 and GIRK4) in the adult rat brain. *Neuroscience* 80:345-57.
- Nagai T, McGeer PL, McGeer EG (1983) Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat forebrain and midbrain. *J Comp Neurol* 218:220-38.
- Namkung Y, Sibley DR (2004) Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem* 279:49533-41.
- 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 Lett* 495:100-5.
- 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* 11:15-37.
- Nemeroff CB, Luttinger D, Hernandez DE, Mailman RB, Mason GA, Davis SD, Widerlov E, Frye GD, Kilts CA, Beaumont K, Breese GR, Prange AJ Jr (1983) Interactions of neurotensin with brain dopamine systems: biochemical and behavioral studies. *J Pharmacol Exp Ther* 225:337-45.
- Nemeroff CB, Levant B, Myers B, Bissette G (1992) Neurotensin, antipsychotic drugs, and schizophrenia. Basic and clinical studies. *Ann N Y Acad Sci* 668:146-56.

- Newman EA (2003) Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci* 23: 1659-66.
- Ng GY, Mouillac B, George SR, Caron M, Dennis M, Bouvier M, O'Dowd BF (1994) Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *Eur J Pharmacol* 267:7-19.
- Ng GY, Trogadis J, Stevens J, Bouvier M, O'Dowd BF, George SR (1995) Agonist-induced desensitization of dopamine D1 receptor-stimulated adenylyl cyclase activity is temporally and biochemically separated from D1 receptor internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10157-61.
- Ng GY, Varghese G, Chung HT, Trogadis J, Seeman P, O'Dowd BF, George SR (1997) Resistance of the dopamine D2L receptor to desensitization accompanies the up-regulation of receptors on to the surface of Sf9 cells. *Endocrinology* 138:4199-206.
- Nguyen TV, Kosofsky BE, Birnbaum R, Cohen BM, Hyman SE (1992) Differential expression of c-fos and zif268 in rat striatum after haloperidol, clozapine, and amphetamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4270-4.
- Nicot A, Rostene W, Berod A (1994) Neurotensin receptor expression in the rat forebrain and midbrain: a combined analysis by in situ hybridization and receptor autoradiography. *J Comp Neurol* 341:407-19.
- Nilsson CL, Hellstrand M, Ekman A, Eriksson E (1998) Direct dopamine D2-receptor-mediated modulation of arachidonic acid release in transfected CHO cells without the concomitant administration of a Ca²⁺-mobilizing agent. *Br J Pharmacol* 124:1651-8.
- Nishi A, Snyder GL, Greengard P (1997) Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J Neurosci* 17:8147-55.

- Nordstrom AL, Farde L, Eriksson L, Halldin C (1995) No elevated D2 dopamine receptors in neuroleptic-naive schizophrenic patients revealed by positron emission tomography and N-methylspiperone. *Psychiatry Res* 61:67-83.
- 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* 17:1795-803.
- O'Connor WT, Tanganelli S, Ungerstedt U, Fuxe K (1992) The effects of neurotensin on GABA and acetylcholine release in the dorsal striatum of the rat: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 573:209-16.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol Chem* 276:19452-60.
- 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 Biochem* 135:81-8.
- Ottersen OP (1981) Afferent connections to the amygdaloid complex of the rat with some observations in the cat. III. Afferents from the lower brain stem. *J Comp Neurol* 202:335-56.
- Palacios JM, Kuhar MJ (1981) Neurotensin receptors are located on dopamine-containing neurones in rat midbrain. *Nature* 294:587-9.
- Palacios JM, Pazos A, Dietl MM, Schlumpf M, Lichtensteiger W (1988) The ontogeny of brain neurotensin receptors studied by autoradiography. *Neuroscience* 25:307-17.
- Park SK, Nguyen MD, Fischer A, Luke MP, Affar el B, Dieffenbach PB, Tseng HC, Shi Y, Tsai LH (2005) Par-4 links dopamine signaling and depression. *Cell* 122:275-87.

- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-7.
- 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* 272:3599-605.
- Pettibone DJ, Hess JF, Hey PJ, Jacobson MA, Leviten M, Lis EV, Mallorga PJ, Pascarella DM, Snyder MA, Williams JB, Zeng Z (2002) The effects of deleting the mouse neurotensin receptor NTR1 on central and peripheral responses to neurotensin. *J Pharmacol Exp Ther* 300:305-13.
- Picetti R, Saiardi A, Abdel Samad T, Bozzi Y, Baik JH, Borrelli E (1997) Dopamine D2 receptors in signal transduction and behavior. *Crit Rev Neurobiol* 11:121-42.
- Pillai G, Brown NA, McAllister G, Milligan G, Seabrook GR (1998) Human D2 and D4 dopamine receptors couple through betagamma G-protein subunits to inwardly rectifying K⁺ channels (GIRK1) in a Xenopus oocyte expression system: selective antagonism by L-741,626 and L-745,870 respectively. *Neuropharmacology* 37: 983-7.
- Pinnock RD (1985a) Neurotensin depolarizes substantia nigra dopamine neurones. *Brain Res* 338:151-4.
- Poinot-Chazel C, Portier M, Bouaboula M, Vita N, Pecceu F, Gully D, Monroe JG, Maffrand JP, Le Fur G, Casellas P (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase couples neurotensin receptor stimulation to induction of the primary response gene Krox-24. *Biochem J* 320 (Pt 1):145-51.

- Ponce A, Bueno E, Kentros C, Vega-Saenz de Miera E, Chow A, Hillman D, Chen S, Zhu L, Wu MB, Wu X, Rudy B, Thornhill WB (1996) G-protein-gated inward rectifier K⁺ channel proteins (GIRK1) are present in the soma and dendrites as well as in nerve terminals of specific neurons in the brain. *J Neurosci* 16:1990-2001.
- Quirion R, Gaudreau P, St-Pierre S, Rioux F, Pert CB (1982) Autoradiographic distribution of neurotensin receptors in rat brain: visualization by tritium-sensitive film. *Peptides* 3:757-63.
- Quirion R, Rowe WB, Lapchak PA, Araujo DM, Beaudet A (1992) Distribution of neurotensin receptors in mammalian brain. What it is telling us about its interactions with other neurotransmitter systems. *Ann N Y Acad Sci* 668:109-19.
- Radke JM, Owens MJ, Ritchie JC, Nemeroff CB (1998) Atypical antipsychotic drugs selectively increase neurotensin efflux in dopamine terminal regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11462-4.
- Rayport S, Sulzer D, Shi WX, Sawasdikosol S, Monaco J, Batson D, Rajendran G (1992) Identified postnatal mesolimbic dopamine neurons in culture: morphology and electrophysiology. *J Neurosci* 12:4264-80.
- Reinecke M, Forssmann WG, Thiekotter G, Triepel J (1983) Localization of neurotensin-immunoreactivity in the spinal cord and peripheral nervous system of the guinea pig. *Neurosci Lett* 37:37-42.
- Remaury A, Vita N, Gendreau S, Jung M, Arnone M, Poncelet M, Culouscou JM, Le Fur G, Soubrie P, Caput D, Shire D, Kopf M, Ferrara P (2002) Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res* 953:63-72.

- Richard F, Barroso S, Martinez J, **et al.** 2001 Agonism, inverse agonism, and neutral antagonism at the constitutively active human neurotensin receptor 2. *Mol Pharmacol* 60:1392-8.
- Robertson GS, Fibiger HC (1992) Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. *Neuroscience* 46:315-28.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC (2000) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 288:154-7.
- Wolfart J, Roeper J (2002) Selective coupling of T-type calcium channels to SK potassium channels prevents intrinsic bursting in dopaminergic midbrain neurons. *J Neurosci* 22: 3404-13.
- Rogue P, Zwiller J, Malviya AN, Vincendon G (1990) Phosphorylation by protein kinase C modulates agonist binding to striatal dopamine D2 receptors. *Biochem Int* 22: 575-82.
- Rostene WH, Alexander MJ (1997) Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 18:115-73.
- Rovere C, Barbero P, Kitabgi P (1996) Evidence that PC2 is the endogenous pro-neurotensin convertase in rMTC 6-23 cells and that PC1- and PC2-transfected PC12 cells differentially process pro-neurotensin. *J Biol Chem* 271:11368-75.
- Sadoul JL, Kitabgi P, Rostene W, Javoy-Agid F, Agid Y, Vincent JP (1984a) Characterization and visualization of neurotensin binding to receptor sites in human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 120:206-13.

- Sadoul JL, Mazella J, Amar S, Kitabgi P, Vincent JP (1984b) Preparation of neurotensin selectively iodinated on the tyrosine 3 residue. Biological activity and binding properties on mammalian neurotensin receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 120:812-9.
- Salim H, Ferre S, Dalal A, Peterfreund RA, Fuxe K, Vincent JD, Lledo PM (2000) Activation of adenosine A1 and A2A receptors modulates dopamine D2 receptor-induced responses in stably transfected human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 74:432-9.
- Sarret P, Gendron L, Kilian P, Nguyen HM, Gallo-Payet N, Payet MD, Beaudet A (2002a) Pharmacology and functional properties of NTS2 neurotensin receptors in cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 277:36233-43.
- Sato M, Lee Y, Zhang JH, Shiosaka S, Noguchi K, Morita Y, Tohyama M (1990) Different ontogenetic profiles of cells expressing prepro-neurotensin/neuromedin N mRNA in the rat posterior cingulate cortex and the hippocampal formation. *Brain Res Dev Brain Res* 54:249-55.
- Sato M, Shiosaka S, Tohyama M (1991) Neurotensin and neuromedin N elevate the cytosolic calcium concentration via transiently appearing neurotensin binding sites in cultured rat cortex cells. *Brain Res Dev Brain Res* 58:97-103.
- Sato M, Kiyama H, Tohyama M (1992) Different postnatal development of cells expressing mRNA encoding neurotensin receptor. *Neuroscience* 48:137-49.
- Schmitz Y, Lee CJ, Schmauss C, Gonon F, Sulzer D (2001) Amphetamine distorts stimulation-dependent dopamine overflow: effects on D2 autoreceptors, transporters, and synaptic vesicle stores. *J Neurosci* 21:5916-24.

- Schotte A, Leysen JE, Laduron PM (1986) Evidence for a displaceable non-specific neurotensin binding site in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 333:400-5.
- Schwab SG, Knapp M, Mondabon S, Hallmayer J, Borrmann-Hassenbach M, Albus M, Lerer B, Rietschel M, Trixler M, Maier W, Wildenauer DB (2003) Support for association of schizophrenia with genetic variation in the 6p22.3 gene, dysbindin, in sib-pair families with linkage and in an additional sample of triad families. *Am J Hum Genet* 72:185-90.
- Seabrook GR, McAllister G, Knowles MR, Myers J, Sinclair H, Patel S, Freedman SB, Kemp JA (1994) Depression of high-threshold calcium currents by activation of human D2 (short) dopamine receptors expressed in differentiated NG108-15 cells. *Br J Pharmacol* 111:1061-6.
- Seeman P (1987) Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse* 1:133-52.
- Seeman P, Lee T (1975) Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science* 188:1217-9.
- Seroogy KB, Mehta A, Fallon JH (1987) Neurotensin and cholecystokinin coexistence within neurons of the ventral mesencephalon: projections to forebrain. *Exp Brain Res* 68:277-89.
- Sesack SR, Aoki C, Pickel VM (1994) Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. *J Neurosci* 14:88-106.

- 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* 28:949-54.
- Shi WX, Bunney BS (1991a) Neurotensin modulates autoreceptor mediated dopamine effects on midbrain dopamine cell activity. *Brain Res* 543:315-21.
- Shi WX, Bunney BS (1991b) Effects of neurotensin on midbrain dopamine neurons: are they mediated by formation of a neurotensin-dopamine complex? *Synapse* 9: 157-64.
- Silva NL, Bunney BS (1988) Intracellular studies of dopamine neurons in vitro: pacemakers modulated by dopamine. *Eur J Pharmacol* 149:307-15.
- Skidgel RA, Engelbrecht S, Johnson AR, Erdos EG (1984) Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* 5:769-76.
- 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* 46:115-21.
- Sotty F, Souliere F, Brun P, Chouvet G, Steinberg R, Soubrie 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* 85:1173-82.
- Sotty F, Brun P, Leonetti M, Steinberg R, Soubrie P, Renaud B, Suaud-Chagny MF (2000) Comparative effects of neurotensin, neurotensin(8-13) and neurotensin applied into the ventral tegmental area on extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Neuroscience* 98:485-92.

- Spauschus A, Lentes KU, Wischmeyer E, Dissmann E, Karschin C, Karschin A (1996) A G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel (GIRK4) from human hippocampus associates with other GIRK channels. *J Neurosci* 16:930-8.
- St-Gelais F, Jomphe C, Trudeau LE (2006) Role of neurotensin in CNS pathophysiology : what is the evidence? *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 31:229-45.
- Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT, Hjaltason O, Birgisdottir B, Jonsson H, Gudnadottir VG, Gudmundsdottir E, Bjornsson A, Ingvarsson B, Ingason A, Sigfusson S, Hardardottir H, Harvey RP, Lai D, Zhou M, Brunner D, Mutel V, Gonzalo A, Lemke G, Sainz J, Johannesson G, Andresson T, Gudbjartsson D, Manolescu A, Frigge ML, Gurney ME, Kong A, Gulcher JR, Petursson H, Stefansson K (2002) Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71:877-92.
- Steinberg R, Brun P, Fournier M, Souilhac J, Rodier D, Mons G, Terranova JP, Le Fur G, Soubrie P (1994) SR 48692, a non-peptide neurotensin receptor antagonist differentially affects neurotensin-induced behaviour and changes in dopaminergic transmission. *Neuroscience* 59:921-9.
- Steinberg R, Brun P, Souilhac J, Bougault I, Leyris R, Le Fur G, Soubrie P (1995) Neurochemical and behavioural effects of neurotensin vs neurotensin on mesolimbic dopaminergic function. *Neuropeptides* 28:43-50.
- Stowe ZN, Nemeroff CB (1991) The electrophysiological actions of neurotensin in the central nervous system. *Life Sci* 49:987-1002.
- Strange PG (2005) Oligomers of D2 dopamine receptors: evidence from ligand binding. *J Mol Neurosci* 26:155-60.

- Suaud-Chagny MF, Ponec J, Gonon F (1991) Presynaptic autoinhibition of the electrically evoked dopamine release studied in the rat olfactory tubercle by in vivo electrochemistry. *Neuroscience* 45:641-52.
- Swanson LW (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* 9:321-353.
- 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* 279:128-37.
- Szigethy E, Leonard K, Beaudet A (1990) Ultrastructural localization of neurotensin binding sites to cholinergic neurons of the rat nucleus basalis magnocellularis. *Neuroscience* 36:377-91.
- Takahashi H, Yoshida K, Higuchi H, Shimizu T, Inoue T, Koyama T (2003) Addition of a dopamine agonist, cabergoline, to a serotonin-noradrenalin reuptake inhibitor, milnacipran as a therapeutic option in the treatment of refractory depression: two case reports. *Clin Neuropharmacol* 26:230-2.
- Tanaka K, Masu M, Nakanishi S (1990) Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 4:847-54.
- Tang L, Todd RD, Heller A, O'Malley KL (1994) Pharmacological and functional characterization of D2, D3 and D4 dopamine receptors in fibroblast and dopaminergic cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 268:495-502.

- Tanganelli S, Li XM, Ferraro L, Von Euler G, O'Connor WT, Bianchi C, Beani L, Fuxe K (1993) Neurotensin and cholecystokinin octapeptide control synergistically dopamine release and dopamine D2 receptor affinity in rat neostriatum. *Eur J Pharmacol* 230:159-66.
- Tanganelli S, O'Connor WT, Ferraro L, Bianchi C, Beani L, Ungerstedt U, Fuxe K (1994) Facilitation of GABA release by neurotensin is associated with a reduction of dopamine release in rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 60:649-57.
- Thierry AM, Deniau JM, Herve D, Chevalier G (1980) Electrophysiological evidence for non-dopaminergic mesocortical and mesolimbic neurons in the rat. *Brain Res* 201:210-214.
- Tozzi A, Bengtson CP, Longone P, Carignani C, Fusco FR, Bernardi G, Mercuri NB (2003) Involvement of transient receptor potential-like channels in responses to mGluR-I activation in midbrain dopamine neurons. *Eur J Neurosci* 18:2133-45.
- Trivedi MH, Rush AJ, Carmody TJ, Donahue RM, Bolden-Watson C, Houser TL, Metz A (2001) Do bupropion SR and sertraline differ in their effects on anxiety in depressed patients? *J Clin Psychiatry* 62:776-81.
- Trudeau LE (2000) Neurotensin regulates intracellular calcium in ventral tegmental area astrocytes: evidence for the involvement of multiple receptors. *Neuroscience* 97:293-302.
- 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* 38:1027-34.
- Uchida S, Akaike N, Nabekura J (2000) Dopamine activates inward rectifier K⁺ channel in acutely dissociated rat substantia nigra neurones. *Neuropharmacology* 39:191-201.

- Uhl GR (1982) Distribution of neurotensin and its receptor in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 400:132-49.
- Uhl GR, Kuhar MJ (1984) Chronic neuroleptic treatment enhances neurotensin receptor binding in human and rat substantia nigra. *Nature* 309:350-2.
- Uhl GR, Kuhar MJ, Snyder SH (1977) Neurotensin: immunohistochemical localization in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:4059-63.
- Uhl GR, Goodman RR, Snyder SH (1979) Neurotensin-containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat: immunohistochemical mapping. *Brain Res* 167:77-91.
- Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408:199-203.
- Vallar L, Muca C, Magni M, Albert P, Bunzow J, Meldolesi J, Civelli O (1990) Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in LtK- fibroblasts, hyperpolarization, and cytosolic-free Ca²⁺ concentration decrease in GH4C1 cells. *J Biol Chem* 265:10320-6.
- Van Bockstaela EJ, Pickel VM (1995) GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain Res* 682:215-221.
- Vandenbulcke F, Nouel D, Vincent JP, Mazella J, Beaudet A (2000) Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor. *J Cell Sci* 113 (Pt 17):2963-75.

- van den Oord EJ, Sullivan PF, Jiang Y, Walsh D, O'Neill FA, Kendler KS, Riley BP (2003) Identification of a high-risk haplotype for the dystrobrevin binding protein 1 (DTNBP1) gene in the Irish study of high-density schizophrenia families. *Mol Psychiatry* 8:499-510.
- Vankova M, Arluison M, Leviel V, Tramu G (1992) Afferent connections of the rat substantia nigra pars lateralis with special reference to peptide-containing neurons of the amygdalo-nigral pathway. *J Chem Neuroanat* 5:39-50.
- Vial D, Piomelli D (1995) Dopamine D2 receptors potentiate arachidonate release via activation of cytosolic, arachidonate-specific phospholipase A2. *J Neurochem* 64:2765-72.
- Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P (1999) Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 20:302-9.
- 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* 317:139-42.
- Vita N, Oury-Donat F, Chalon P, Guillemot M, Kaghad M, Bachy A, Thurneyssen O, Garcia S, Poinot-Chazel C, Casellas P, Keane P, Le Fur G, Maffrand JP, Soubrie P, Caput D, Ferrara P (1998) Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Pharmacol* 360:265-72.
- von Euler G (1991) Biochemical characterization of the intramembrane interaction between neurotensin and dopamine D2 receptors in the rat brain. *Brain Res* 561:93-8.

- von Euler G, Meister B, Hökfelt T, Fuxe K (1989) Intraventricular injection of neurotensin reduces the binding of dopamine D-2 receptors in the rat forebrain. *Acta Physiol Scand* 137:309-10.
- von Euler G, Mailleux P, Vanderhaeghen JJ, Fuxe K (1990a) Neurotensin reduces the affinity of dopamine D2 receptors in membranes from post mortem human caudate-putamen. *Neurosci Lett* 109:325-30.
- von Euler G, Meister B, Hokfelt T, Eneroth P, Fuxe K (1990b) Intraventricular injection of neurotensin reduces dopamine D2 agonist binding in rat forebrain and intermediate lobe of the pituitary gland. Relationship to serum hormone levels and nerve terminal coexistence. *Brain Res* 531:253-62.
- 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* 56:178-83.
- Wagstaff JD, Bush LG, Gibb JW, Hanson GR (1994) Endogenous neurotensin antagonizes methamphetamine-enhanced dopaminergic activity. *Brain Res* 665:237-44.
- Wang HL, Wu T (1996) G alpha q/11 mediates neurotensin excitation of substantia nigra dopaminergic neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 36:29-36.
- Wang Y, Xu R, Sasaoka T, Tonegawa S, Kung MP, Sankoorikal EB (2000) Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions. *J Neurosci* 20:8305-14.
- Wanat MJ, Bonci A (2005) Corticotropin-releasing factor (CRF) increases the firing rate of dopamine neurons in the ventral tegmental area (VTA), *Abstr SFN*

- Waroux O, Massotte L, Alleva L, Graulich A, Thomas E, Liegeois JF, Scuvee-Moreau J, Seutin V (2005) SK-channels control the firing pattern of midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Eur J Neurosci* 22:3111-21.
- 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* 68:1043-8.
- Way KJ, Chou E, King GL (2000) Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci* 21:181-7.
- 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* 95:417-23.
- Werkman TR, Kruse CG, Nievelstein H, Long SK, Wadman WJ (2001) In vitro modulation of the firing rate of dopamine neurons in the rat substantia nigra pars compacta and the ventral tegmental area by antipsychotic drugs. *Neuropharmacology* 40:927-36.
- Wickman KD, Clapham DE (1995) G-protein regulation of ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 5:278-85.
- Widerlov E, Lindstrom 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* 139:1122-6.
- Williams PJ, MacVicar BA, Pittman QJ (1990) Synaptic modulation by dopamine of calcium currents in rat pars intermedia. *J Neurosci* 10:757-63.

- Willner P, Lappas S, Cheeta S, Muscat R (1994) Reversal of stress-induced anhedonia by the dopamine receptor agonist, pramipexole. *Psychopharmacology (Berl)* 115: 454-62.
- Wirtshafter D, Asin KE (1995) Dopamine antagonists induce fos-like-immunoreactivity in the substantia nigra and entopeduncular nucleus of the rat. *Brain Res* 670:205-14.
- Witkovsky P (2004) Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol* 108:17-40.
- Wong DF, Wagner HN Jr, Tune LE, Dannals RF, Pearlson GD, Links JM, Tamminga CA, Broussolle EP, Ravert HT, Wilson AA, et al (1986) Positron emission tomography reveals elevated D2 dopamine receptors in drug-naive schizophrenics. *Science* 234:1558-63.
- Wu T, Wang HL (1995) Protein kinase C mediates neurotensin inhibition of inwardly rectifying potassium currents in rat substantia nigra dopaminergic neurons. *Neurosci Lett* 184:121-4.
- Wu T, Li A, Wang HL (1995a) Neurotensin increases the cationic conductance of rat substantia nigra dopaminergic neurons through the inositol 1,4,5-trisphosphate-calcium pathway. *Brain Res* 683:242-50.
- Yamada M, Yamada M, Watson MA, Richelson E (1993) Neurotensin stimulates cyclic AMP formation in CHO-rNTR-10 cells expressing the cloned rat neurotensin receptor. *Eur J Pharmacol* 244:99-101.
- Yamada M, Yamada M, Watson MA, Richelson E (1994) Deletion mutation in the putative third intracellular loop of the rat neurotensin receptor abolishes polyphosphoinositide hydrolysis but not cyclic AMP formation in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol* 46:470-6.

- Yan Z, Feng J, Fienberg AA, Greengard P (1999) D(2) dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11607-12.
- Yang J, Jan YN, Jan LY (1995) Control of rectification and permeation by residues in two distinct domains in an inward rectifier K⁺ channel. *Neuron* 14:1047-54.
- Young WS 3rd, Kuhar MJ (1981) Neurotensin receptor localization by light microscopic autoradiography in rat brain. *Brain Res* 206:273-85.
- Zahm DS, Grosu S, Williams EA, Qin S, Berod A (2001) Neurons of origin of the neurotensinergic plexus enmeshing the ventral tegmental area in rat: retrograde labeling and in situ hybridization combined. *Neuroscience* 104:841-51.
- Zahm DS, Gruber C, Veh RW, Geisler S (2005) Inputs to the central extended amygdala recipient region of the nigral complex in the rat. *SFN Abstr*.
- Zawarynski P, Tallerico T, Seeman P, Lee SP, O'Dowd BF, George SR (1998) Dopamine D2 receptor dimers in human and rat brain. *FEBS Lett* 441:383-6.
- Zhang M, Turnbaugh D, Cofie D, Dogan S, Koshida H, Fugate R, Kem DC (1996) Protein kinase C modulation of cardiomyocyte angiotensin II and vasopressin receptor desensitization. *Hypertension* 27:269-75.
- Zsurger N, Mazella J, Vincent JP (1994) Solubilization and purification of a high affinity neurotensin receptor from newborn human brain. *Brain Res* 639:245-52.

Annexe

L'identification des neurones dopaminergiques dans les cultures primaires de neurone est problématique. Comme le montre la figure 2 de l'article ci-joint, aucun critère électrophysiologique ne permet de discriminer les neurones dopaminergiques des autres neurones. Les cultures de neurones du mésencéphale contiennent une population hétérogène de neurones. Des critères pharmacologiques peuvent être utilisés pour identifier les neurones dopaminergiques. En effet, un agoniste du récepteur D2 induira une inhibition de l'activité des neurones dopaminergiques, qui se traduit par une hyperpolarisation du potentiel membranaire et une diminution de la fréquence de décharge. Comme nous l'avons expliqué précédemment, l'application d'un agoniste D2 pour déterminer le phénotype du neurone est peu pratique, considérant la durée de la période de lavage qui doit suivre l'application de l'agoniste. De même l'immunohistochimie contre la tyrosine hydroxylase effectuée après l'enregistrement électrophysiologique d'un neurone est peu pratique et peu productive du fait que la proportion des neurones dopaminergiques en culture est d'au plus 20-30%.

La transfection de la GFP sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase est une technique que nous avons utilisée pour palier à la difficulté d'identifier les neurones dopaminergique en culture. Mais cette technique comporte aussi plusieurs inconvénients, comme nous l'avons décrit précédemment. Le développement de modèles de souris transgéniques exprimant la EGFP (enhanced green fluorescence protein) sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase (Sawamoto et al., 2001; Matsushita et al., 2002) offre la perspective intéressante d'utiliser ces animaux pour effectuer des cultures primaires de mésencéphale et faciliter ainsi l'identification des neurones dopaminergiques. Dans l'article présenté en annexe, nous avons caractérisé les propriétés des neurones mis en culture à partir du mésencéphale de ces souris transgéniques. Dans un premier temps, nous avons déterminé la proportion de neurones exprimant la GFP ayant un phénotype dopaminergique dans ces cultures. Après 14 jours de culture, ce qui correspond en général au moment où les cellules sont utilisées pour les enregistrements électrophysiologiques, 70% des neurones

exprimant la GFP sont dopaminergiques. Cette proportion élevée devrait permettre d'améliorer de beaucoup le taux de succès des enregistrements électrophysiologiques. Dans plusieurs séries d'expériences, nous avons ensuite évalué divers aspects du fonctionnement de ces neurones pour valider l'utilisation de ce modèle.

Ma contribution à cet article a été de réaliser les expériences d'électrophysiologie présentées à la figure 2, qui décrivent les propriétés électrophysiologiques des neurones dopaminergiques en culture. J'ai également participé à la rédaction du manuscrit.

Use of TH-EGFP transgenic mice as a source of identified dopaminergic neurons for physiological studies in postnatal cell culture

C. Jomphe^a, M.-J. Bourque^a, G.D. Fortin^a, F. St-Gelais^a, H. Okano^b, K. Kobayashi^c and L.-E. Trudeau^a

^aDepartment of Pharmacology, Faculty of Medicine, Centre de Recherche en Sciences Neurologiques, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Que., Canada H3C 3J7

^bDepartment of Physiology, Keio University School of Medicine, Japan

^cDepartment of Molecular Genetics, Fukushima Medical University, Japan

Journal of Neuroscience Methods, Volume 146, Issue 1, 2005, Pages 1-12

Abstract

The physiological and pharmacological properties of dopaminergic neurons in the brain are of major interest. Although much has been learned from cell culture studies, the physiological properties of these neurons remain difficult to study in such models because they are usually in minority and are difficult to distinguish from other non-dopaminergic neurons. Here we have taken advantage of a recently engineered transgenic mouse model expressing enhanced green fluorescence protein (EGFP) under the control of the tyrosine hydroxylase promoter to establish a more effective dopaminergic neuron cell culture model. We first evaluated the specificity of the EGFP expression. Although ectopic expression of EGFP was found in cultures derived from postnatal day 0 pups, this decreased over time in culture such that after 2 weeks, approximately 70% of EGFP-expressing neurons were dopaminergic. We next sought to validate this dopaminergic neuron culture model. We evaluated whether EGFP-expressing dopaminergic neurons displayed some of the well-established properties of dopaminergic neurons. Autoreceptor stimulation inhibited the activity of dopaminergic neurons while neurotensin receptor activation produced the opposite effect. Confocal imaging of the synaptic vesicle optical tracer FM4-64 in EGFP-expressing dopaminergic neurons demonstrated the feasibility of high resolution monitoring of the activity of single terminals established by these neurons. Together, this work provides evidence that primary cultures of postnatal TH-EGFP mice currently represent an excellent model to study the properties of these cells in culture.

Keywords: Dopamine; Culture; Fluorescence; Patch-clamp; Transgenic; Green fluorescent protein

1. Introduction

Dopaminergic neurons of the ventral mesencephalon are implicated in the regulation of motivated behavior. They are also a direct target of many drugs of abuse such as amphetamine and cocaine. Their physiological and pharmacological properties are thus of major interest. These neurons have been studied *in vivo* as well as in a number of more reduced models such as brain slices and primary cultures prepared from embryonic and postnatal rodent pups. Although primary culture models offer significant experimental advantages under many circumstances such as for fluorescence imaging experiments, for pharmacological approaches or for acute transfection strategies, the use of such models in single-cell physiological experiments is complicated by the fact that dopaminergic neurons typically account for only a small percentage of the total population of neurons. In embryonic cultures, dopaminergic neurons usually represent 1–5% of total neurons (di Porzio et al., 1987, Heyer, 1984 and Silva et al., 1988) while in postnatal cultures, they usually account for 10–30% (Rayport et al., 1992 and St-Gelais et al., 2004) (but see Masuko et al. (1992) and Shimoda et al. (1992) for microdissection strategies yielding higher percentages of dopaminergic neurons). A strategy to distinguish dopaminergic from non-dopaminergic neurons is thus required.

Differentiating between living dopaminergic and non-dopaminergic neurons on the basis of morphological features has been evaluated, but in practice this represents a highly unreliable method (Masuko et al., 1992 and Ort et al., 1988). Electrophysiological criteria have also been proposed. For example, recordings made *in vivo* or in brain slice preparations have associated a unique action potential waveform with a duration of more than 2 s to dopaminergic neurons (Grace and Bunney, 1995). Other criteria such as a slow irregular (1–10 Hz) firing rate, a prominent afterhyperpolarization or the presence of an Ih-like hyperpolarization-activated inward current have also been described (Bunney et al., 1991 and Johnson and North, 1992). Unfortunately, electrophysiological criteria of this

type are highly unreliable in culture models. For instance, the firing pattern of identified dopaminergic neurons in culture was found to be regular (Cardozo, 1993) or silent (Rayport et al., 1992), this being probably due to the absence of the synaptic input that is normally present in the intact brain (Grace and Onn, 1989). Spike duration and the presence of an I_h current also do not allow to distinguish reliably between dopaminergic and non-dopaminergic neurons in culture (Cardozo, 1993, Masuko et al., 1992 and Rayport et al., 1992).

To date the most reliable way to identify living dopaminergic neurons involves probing for their selective pharmacological properties (Johnson and North, 1992 and Rayport et al., 1992). Unlike mesencephalic GABAergic neurons, dopaminergic neurons express D2-type autoreceptors. Therefore, only the latter respond to D2 agonists with a decrease in their firing rate. Conversely, mesencephalic GABAergic neurons, but not dopaminergic neurons, express somatodendritic μ -opioid receptors that lead to a decrease in firing when activated. Although such pharmacological criteria are as reliable in culture (Bergevin et al., 2002 and Congar et al., 2002) as they are in vivo (Lacey et al., 1989), the application of receptor agonists and drug washout considerably lengthens experimental protocols and is not possible in dynamic fluorescence imaging experiments that are not accompanied by electrophysiological recordings.

The development of an alternative approach relying on optical signal would prove most useful. Such an attempt was made with the autofluorescent serotonin analogue, 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) (Cardozo, 1993, Silva et al., 1988 and Steensen et al., 1995). This experimental approach was based on the assumption that mesencephalic cultures are devoid of serotonin neurons and on the observation that serotonin derivatives, such as 5,7-DHT can be accumulated by catecholamine neurons through both serotonin and dopamine transporters (Dowling and Ehinger, 1975). However, one of the major disadvantages of this approach is the rapid photobleaching of the 5,7-DHT signal during

UV illumination (Cardozo, 1993). More problematic is the fact that this approach has been found to be highly unreliable to identify dopaminergic neurons. Indeed in a recent study, this compound was found to accumulate preferentially in serotonin neurons and not in dopaminergic neurons (Franke et al., 2002). Another more effective strategy is to retrogradely label dopaminergic neurons a few days before tissue dissection by injecting a fluorescent tracer in projection areas such as striatum (Rayport et al., 1992). Although this approach identifies dopaminergic neurons with high fidelity, it only labels a small proportion of dopaminergic neurons and is quite time-consuming.

Transgenic mouse models offer an alternate approach. To study dopaminergic neurons of the retina, Gustincich and co-workers (Gustincich et al., 1997) developed transgenic mice that express human placental alkaline phosphatase (PLAP) under the regulation of the tyrosine hydroxylase (TH) promoter. Catecholamine-containing neurons from these mice express PLAP on the outer surface of their cell membrane, allowing identification of living dopaminergic neurons using a PLAP antibody–fluorochrome conjugate. Although the use of these mice has been profitable to study retinal dopaminergic neurons in culture (Contini and Raviola, 2003, Feigenspan et al., 1998, Feigenspan et al., 2000, Gustincich et al., 1999 and Puopolo et al., 2001), this approach is relatively complex because it requires pre-exposure of living neurons to a fluorochrome–antibody conjugate. Although successful, this procedure can be quite expensive and under certain circumstances can be limited by poor penetration of antibodies in the experimental preparation. Antibodies could also possibly perturb living neurons. Finally, the usefulness of this model for the identification of midbrain dopaminergic neurons is unclear since only one previous study of mesencephalic dopaminergic neurons has been published (Mundorf et al., 2001).

More recently, Sawamoto and co-workers (Matsushita et al., 2002 and Sawamoto et al., 2001) developed a new transgenic mouse model allowing direct visualization of midbrain dopaminergic neurons (see also Chuhma et al., 2004). Mice were engineered to

express enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the control of the TH promoter. The capacity of neurons derived from these mice to survive and differentiate in long-term culture has not yet been examined. The aim of this study was hence to develop a reliable primary culture model allowing a rapid and direct identification of postnatal dopaminergic neurons. Our first objective was to evaluate the selectivity of EGFP expression in dopaminergic neurons cultured from these mice. Our second objective was to evaluate whether the physiological properties of EGFP-expressing dopaminergic neurons were normal. We find that the majority of EGFP-expressing neurons cultured from the ventral mesencephalon of TH-EGFP mice are dopaminergic neurons and that EGFP-expressing dopaminergic neurons possess the typical physiological properties of dopaminergic neurons.

2. Materials and methods

2.1. Transgenic mice

All experiments were performed using the transgenic mice TH-EGFP/21-31 line carrying the EGFP gene under the control of the TH promoter (Matsushita et al., 2002 and Sawamoto et al., 2001). Offsprings that carried the transgene were identified by PCR on the genomic DNA extracted from tail biopsies. A 475 bp fragment of EGFP DNA was amplified by PCR, using the primers: AAGTTCATCTGCACCACCG and TGCTCAGGTATGGTTGTCG. Transgenic lines were maintained as heterozygous by breeding with C57BL/6J inbred mice.

2.2. Cell culture

Primary cultures of mesencephalic neurons from TH-GFP/21-31 transgenic mice were prepared according to recently described protocols (Bourque and Trudeau, 2000, Congar et al., 2002 and Michel and Trudeau, 2000) derived from Cardozo (1993) and

Sulzer et al. (1998). Dissociated neurons were plated on mesencephalic astrocytes grown in monolayers on pre-coated glass coverslips.

To prepare mesencephalic astrocyte cultures, TH-EGFP/21-31 mice pups (P0–P2) were cryoanesthetized. Cells from the mesencephalon were enzymatically dissociated using papain (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA) and were grown in culture flasks for 5–10 days in Basal Medium Eagle with Earl's Salts (Sigma-Aldrich, Oakville, Ont., Canada) supplemented with penicillin/streptomycin, GlutaMAX-1 (Gibco), Mito+ serum extender (VWR Canlab, Montreal, Canada) and 10% fetal calf serum (Gibco). A cold wash with vigorous shaking was used to dislodge neurons and microglial cells after 2 days in culture. After reaching confluence, astrocytes were trypsinized, washed, collected and plated at 100 000 living cells per milliliter on collagen/poly-l-lysine-coated coverslips. For single neuron microcultures, astrocytes were plated at a concentration of 60 000 living astrocytes per milliliter on poly-l-ornithine/agarose-covered glass coverslips, which had been sprayed with collagen (0.75 mg/ml) microdroplets (50–150 μ M in diameter). This permitted the establishment of small groups of isolated cells (Segal et al., 1998).

To prepare neurons, a 1–2 mm thick coronal slice was cut at the level of the midbrain flexure. The ventral tegmental area and substantia nigra were isolated by microdissection. As for preparation of astrocytes, the tissue was digested with papain before being gently triturated. The dissociated cells were then collected by centrifugation and diluted at a density to optimize neuronal viability (240 000 living cells) and plated onto a pre-established mesencephalic astrocyte monolayer. For single neurons microcultures, dissociated cells were plated onto astrocyte microislands at a density of 80 000 living cells per milliliter. Cultures were incubated at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere and maintained in Neurobasal-A/B27 medium (Gibco) supplemented with penicillin/streptomycin, GlutaMAX-1 (Gibco) and 10% fetal calf serum (Gibco, Logan, UT, USA). Astrocyte-

conditioned Basal Medium Eagle was added to the standard Neurobasal-A medium to a proportion of 1:2.

2.3. Immunocytochemistry

Cultured neurons were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered solution (PBS) (pH 7.4) and incubated with a monoclonal anti-TH antibody (TH-2 clone) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ont., Canada) to confirm dopaminergic phenotype. The primary antibody was visualized using an Alexa-546-labeled secondary antibody (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Coverslips were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and observed by epifluorescence microscopy on a Nikon Eclipse TE-200 inverted microscope. Images of EGFP and TH immunofluorescence were acquired using a Hamamatsu Orca-II digital cooled CCD camera and an Inovision workstation using Isee software (Inovision Corporation, Raleigh, NC, USA).

Ectopic EGFP expression was evaluated by two complementary approaches. First, living, unfixed neurons were examined by epifluorescence microscopy. A field containing one or more EGFP-expressing neuron was randomly selected. All neurons showing unambiguous EGFP fluorescence, whether strong or weak, were counted. A phase-contrast image of the field was then captured and then blue fluorescent microspheres were deposited locally using a glass pipette. After fixation and immunocytochemistry against TH, the exact same field was localized using the fluorescent spheres and the phase-contrast image as an index. This permitted reliable determination of the dopaminergic or non-dopaminergic phenotype of all EGFP-expressing neurons. A second approach was to evaluate the phenotype of only the brightest EGFP-expressing neurons that were selected for electrophysiological experiments. Here again, a phase-contrast image was captured and fluorescent microspheres were used to identify the recorded neuron after fixation and immunocytochemistry.

2.4. Electrophysiology

Electrophysiological recordings were performed at room temperature on EGFP-expressing living neurons maintained for 10–18 days in culture. Cultures were transferred to a recording chamber that was fixed to the stage of an inverted Nikon Eclipse TE-200 microscope. The coverslip was constantly superfused with physiological saline solution using a gravity flow system (2.5–3 ml/min) with a standard extracellular bathing solution containing (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, pH 7.35, 305 mOsm. Sucrose (6 mM) was added to the extracellular medium to adjust osmolarity. Drugs were bath applied, with a delay between valve opening and onset of drug action of approximately 15 s. Action potentials were recorded using the whole-cell current-clamp technique with a Warner PC-505 patch-clamp amplifier (Warner Instruments Corp., Hamden, CT, USA). Signals were filtered at 1 kHz, digitized at 10 kHz and recorded and analyzed using Pclamp7 software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) and Mini Analysis software (Version 5.6) (Synaptosoft Inc., Leonia, NJ, USA), respectively. Borosilicate glass patch pipettes (5–7 M Ω) were filled with a potassium methylsulfate intrapipette solution containing (in mM): 145 KMeSO₄, 20 KCl, 10 NaCl, 0.1 EGTA, 2 ATP (Mg salt), 0.6 GTP (Tris salt), 10 HEPES, 10 phosphocreatine (Tris salt), pH 7.35, 295–300 mOsm.

Synaptic (or “autaptic”) responses in single neurons were recorded with the perforated patch-clamp technique (amphotericin B, 150–200 μ g/ml). Under conditions where dopaminergic neurons grow in isolation in microculture, they establish synaptic contacts on their own dendritic arbor and co-release glutamate together with dopamine. This allows the activity of synaptic terminals to be readily monitored (Bourque and Trudeau, 2000, Congar et al., 2002 and Sulzer et al., 1998). During recordings, autaptic responses were evoked every 15 s by a brief (1 ms) depolarizing voltage step from a holding potential (VH) of –50 mV. In dopaminergic neurons, this usually elicited a sodium

“action current” followed by a 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)-sensitive glutamate-mediated inward autaptic EPSC. Input resistance was usually between 300 and 600 M Ω and was monitored periodically throughout experiments.

2.5. Calcium imaging

Changes in cytosolic intracellular calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) were measured with Fura2-AM ratio fluorescence. Briefly, cells were loaded with Fura2-AM by incubating cells grown on 15-mm coverslips in saline containing 5 μ M Fura2-AM and 0.02% pluronic acid (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 50–60 min at room temperature. For $[Ca^{2+}]_i$ measurements, the coverslip was mounted in a recording chamber that was fixed to the stage of an inverted Nikon Eclipse TE-200 microscope. The coverslip was constantly superfused with physiological saline solution containing (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, 6 sucrose at a pH of 7.35. Imaging of Fura2-AM was performed using standard epifluorescence imaging through a GenIII+-intensified progressive line scan CCD camera (Stanford Photonics, Palo Alto, CA, USA) and a computer-controlled two-channel fast excitation wavelength switcher (DX-1000, Stanford Photonics). Standard image ratio pairs (340/380 nm) were acquired every 5 s and ratio values were analyzed using Axon Imaging Workbench software 4.0 (Axon Instruments).

2.6. Confocal imaging

Cells plated on 25 mm diameter coverslips were placed in an imaging chamber with integrated platinum stimulating electrodes (Warner Instruments, Hamden, USA), and the chamber was connected to a gravity perfusion system on the stage of the microscope. For loading with the vesicle recycling indicator FM4-64 (Molecular Probes), cells were exposed for 2 min to a saline solution containing 5 μ M FM4-64 and 90 mM potassium (which replaced an equimolar concentration of NaCl). The cells were then rinsed for 10 min with saline solution. Images were taken with a point-scanning confocal microscope

from Prairie Technologies LLC (Middleton, WI, USA). Excitation was performed with the 488 nm line of an argon ion laser and fluorescence emitted above 550 nm (yellow to orange) was measured. Images were taken every 15 s. After 2 min of recording, electrical field stimulation was applied at 2 Hz for 150 s or at 10 Hz for 60 s. Cells were then exposed to high potassium saline to completely release any remaining and releasable FM4-64 from the terminals. Images were analyzed using Metamorph software v4.5 from Universal Imaging Corp (USA).

3. Results

3.1. Selectivity of EGFP expression in dopaminergic neurons increases over time in culture

As previously reported (Matsushita et al., 2002), we first confirmed using immunocytochemistry that expression of EGFP co-localizes with TH in the ventral mesencephalon of TH-EGFP mice, thus validating expression in dopaminergic neurons of the substantia nigra and ventral tegmental area (not shown). Because postnatal cultures are usually prepared from P0 pups, we also evaluated co-localization at this developmental stage. We found that co-localization was also present but less extensive at this stage (not shown) perhaps due to lower or altered activity of the TH promoter around birth (Matsushita et al., 2002). All further experiments were performed on cultured mesencephalic neurons prepared from TH-EGFP mice. In total, 312 EGFP-expressing neurons were examined in detail.

We first evaluated the selectivity of EGFP expression in cultured dopaminergic neurons prepared from P0–P2 TH-EGFP mice. Ventral mesencephalic neurons were isolated by microdissection and enzymatically dissociated (Fig. 1A and B). They were then

cultured together with mesencephalic astrocytes for periods of 24 h to 15 days. EGFP expression of living cultured neurons was detected by epifluorescence and confirmation of dopaminergic phenotype was obtained by immunocytochemistry using an antibody directed against TH. We observed numerous EGFP-expressing neurons in cultures prepared from these mice. Some neurons showed very bright EGFP fluorescence while others showed more modest signal. To directly quantify the selectivity of the expression of EGFP in dopaminergic neurons, we selected fields of living neurons where one or more EGFP-expressing neurons could be detected together with EGFP-negative neurons and locally deposited blue fluorescent microspheres so as to be able to localize the same field after immunocytochemistry against TH (Fig. 1C–E). In total, 220 EGFP-expressing neurons were evaluated in this set of experiments. We found that 1 day after cell plating, $43 \pm 7\%$ of EGFP-expressing neurons were immunoreactive for TH (Fig. 1F). This proportion gradually increased over time spent in culture, reaching $71 \pm 4\%$ (after 15 days (Fig. 1F)) ($\chi^2(3) = 10.225$, $p = 0.017$). These experiments also revealed that a population of TH-immunoreactive neurons did not express EGFP (not shown).

To evaluate the usefulness of EGFP expression as a criterion for selecting dopaminergic neurons in physiological experiments, we observed living cultured dopaminergic neurons by epifluorescence and selected for patch-clamp recordings neurons that appeared to be the brightest EGFP-expressing cells. After recording, we deposited fluorescent microspheres next to the recorded neurons and processed the cells for TH immunocytochemistry to identify all dopaminergic neurons. We found that 90% of recorded neurons (36 of 40) were indeed dopaminergic neurons.

3.2. Electrophysiological characteristics cannot help identify cultured dopaminergic neurons

As described previously, dopaminergic neurons in vivo or in brain slices can be identified using a number of electrophysiological characteristics (Bunney et al., 1991). For

example, in brain slice preparations, the major electrophysiological characteristic that allows discrimination of dopaminergic from non-dopaminergic neurons is the presence of an I_h current induced by hyperpolarizing steps (Grace and Bunney, 1995, Jiang et al., 1993 and Lacey et al., 1989). We thus evaluated the presence of an I_h -like current in EGFP-expressing and EGFP-negative neurons in culture. For these experiments, the dopaminergic phenotype of neurons was confirmed by post-recording immunocytochemistry for TH. Although an I_h current could be detected in a minor proportion of neurons, it could not be reliably detected in EGFP-expressing dopaminergic neurons (Fig. 2A). A comparison of current–voltage relationships in EGFP-expressing and EGFP-negative neurons confirmed that there was no significant difference in the inward current induced by hyperpolarizing steps between these two populations of neurons (two-way ANOVA, $F(1,24) = 1.985$, $p = 0.702$). Moreover, there was no difference between EGFP-expressing and EGFP-negative neurons in spike width, evaluated from spikes evoked by a short depolarizing step at hyperpolarized membrane potential (t-test, $p = 0.88$) (Fig. 2B), nor in spontaneous firing rate (t-test, $p = 0.89$) (Fig. 2C). Accommodation, evaluated during a prolonged depolarizing step, was also not different between the two types of neurons. Accommodation, defined by a cessation of firing during the 500 ms depolarizing step, occurred in 2/5 EGFP-expressing dopaminergic neurons and in 2/5 EGFP-negative neurons.

3.3. Activation of somatodendritic dopamine D2 receptors inhibits firing rate

To validate the use of cultures prepared from TH-EGFP mice, we evaluated whether dopaminergic neurons in these cultures possess some of the well-known physiological and pharmacological properties of dopaminergic neurons. We first evaluated the ability of a D2 receptor agonist to activate D2-like receptors and inhibit the firing rate of cultured dopaminergic neurons. Whole-cell patch-clamp recordings were obtained from EGFP-expressing dopaminergic neurons, identified by epifluorescence prior to recording and by post-recording immunocytochemistry against TH. As expected, quinpirole (1 μM), a D2

receptor selective agonist, significantly reduced spontaneous firing rate ($51 \pm 11\%$ inhibition; $n = 7$, t-test, $p = 0.002$) in comparison to the mean frequency observed in the baseline period (Fig. 3A–C). These results show that cultured dopaminergic neurons prepared from TH-EGFP mice possess functional somatodendritic D2 autoreceptors.

3.4. Terminal D2 receptors inhibit neurotransmitter release in dopaminergic neurons

D2 autoreceptors are also located on the axon terminals of dopaminergic neurons. To evaluate the function of such receptors in cultured EGFP-expressing dopaminergic neurons, we took advantage of the ability of isolated dopaminergic neurons in culture to co-release glutamate together with dopamine (Bourque and Trudeau, 2000 and Sulzer et al., 1998). The glutamate-mediated synaptic currents recorded from neurons under such conditions are known to be robustly inhibited by D2 receptor activation (Congar et al., 2002). Experiments were thus performed on single EGFP-expressing dopaminergic neurons in a microisland culture system. During whole-cell recording a brief (1 ms) depolarizing voltage step evoked a fast inward sodium current (generating an unclamped action potential) followed by a postsynaptic, CNQX-sensitive α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor-mediated EPSC (autaptic EPSC) (Fig. 4A and B). Bath application of quinpirole (1 μ M) reversibly decreased the peak amplitude of autaptic EPSCs in EGFP-expressing dopaminergic neurons (Fig. 4A and B). Quinpirole caused a $34.5 \pm 7.4\%$ inhibition of autaptic EPSCs amplitude when neurons were recorded in whole-cell mode (Fig. 4C) ($n = 6$, t-test, $p = 0.07$) whereas this inhibition reached $66.8 \pm 10.6\%$ when the recordings were made in perforated-patch configuration (Fig. 4D) ($n = 5$, Student's paired t-test, $p \leq 0.05$). These observations show that cultured dopaminergic neurons prepared from TH-EGFP mice possess functional terminal D2 autoreceptors.

3.5. Dopaminergic neurons show an increased firing rate in response to neurotensin

To extend our physiological profiling of EGFP-expressing cultured dopaminergic neurons, we evaluated the effect of the peptide neurotensin on the firing rate of these neurons. The excitatory effect of this tridecapeptide on dopaminergic neurons is well established (Legault et al., 2002, Pinnock, 1985, Seutin et al., 1989 and St-Gelais et al., 2004). The effect of the active fragment of neurotensin (NT(8–13)) on neuronal excitability was evaluated by whole-cell current-clamp recordings. Similarly to the response previously described in cultured rat dopaminergic neurons (St-Gelais et al., 2004), cultured dopaminergic neurons from TH-EGFP mice showed a significant increase in their firing rate in response to 100 nM NT(8–13) ($115.6 \pm 37.7\%$; $n = 8$, t-test, $p = 0.01$) (Fig. 5). Intracellular calcium imaging experiments with Fura-2 showed that NT(8–13) (100 nM) also caused a significant increase in intracellular calcium concentration in cultured dopaminergic neurons (average ratio increase was 1.74 ± 0.13 , $n = 12$, Student's paired t-test, $p < 0.001$) (Fig. 6). This response was quantitatively similar to what was previously shown in cultured dopaminergic neurons from rat (St-Gelais et al., 2004).

3.6. Confocal imaging of EGFP-expressing dopaminergic neuron axon terminals with FM4-64

The ability to culture dopaminergic neurons and to identify them using EGFP fluorescence will facilitate investigations of the function of the axon terminals established by these neurons. For instance, the synaptic vesicle cycle can be studied optically using fluorescent styryl dyes that act as activity-dependent indicators of endocytosis and exocytosis (Aravanis et al., 2003 and Betz et al., 1996). To establish the feasibility of such experiments, we evaluated the use of the styryl dye FM4-64 in EGFP-expressing single dopaminergic neurons in microisland cultures. Because this molecule emits at wavelengths above 550 nm (Wang and Zucker, 1998), measurements of its fluorescence emission should

be possible without interference from EGFP, thus allowing us to study the exocytotic kinetics of dopaminergic terminals.

Axon terminals were first loaded by depolarizing cells with saline containing 90 mM K⁺ together with 5 μ M FM4-64. After thoroughly rinsing the non-sequestered FM4-64, action potentials were evoked by electrical field stimulation at either 2 Hz for 150 s (300 pulses) or at 10 Hz for 60 s (600 pulses). Neurons were then exposed to high K⁺ saline to release any remaining and releasable FM4-64 from the terminals. Fig. 7 shows the characteristic dotted or punctate appearance of the fluorescent signal (Fig. 7A and B), which has been attributed to the varicose nature of axonal terminals, where the dye accumulates within small vesicles (Everett et al., 2002). The two stimulation protocols elicited release along different kinetics and, as expected, exocytosis occurred at a faster rate at the higher stimulation frequency (Fig. 7C). Together these data demonstrate the feasibility of using FM4-64 to image synaptic vesicle cycling in single EGFP-expressing dopaminergic neurons.

4. Discussion

On the basis of the data presented here, we conclude that primary cultures prepared from TH-EGFP mice reliably allow the identification of dopaminergic neurons and hence provide an excellent model to study their physiological regulation. Indeed, dopaminergic neurons cultured from TH-EGFP mice show physiological properties very similar to those previously reported for these neurons *in vivo*, such as an inhibition of firing rate and neurotransmitter release in response to a D2 receptor agonist as well as an increase in excitability and in intracellular calcium in response to the neuromodulatory peptide neurotensin. Moreover, as EGFP expression by dopaminergic neurons does not interfere with fluorescent dyes like Fura-2 or FM4-64, this model can be useful for a number of

dynamic fluorescence imaging studies. Overall, the use of the present model for the study of identified living dopaminergic neurons in culture is reliable and shows numerous advantages over alternate approaches.

In several previous studies, discrimination between dopaminergic and non-dopaminergic neurons was performed on the basis of a number of electrophysiological characteristics. This electrophysiological signature included a broad action potential, a slow irregular (1–10 Hz) firing rate, a prominent afterhyperpolarization and the presence of an Ih-like hyperpolarization-activated inward current (Bunney et al., 1991). However, consistent with previous findings (Masuko et al., 1992 and Rayport et al., 1992), we show here that such properties cannot adequately identify dopaminergic neurons in culture. Indeed, we found that contrarily to the situation in vivo, these properties are variably expressed both in dopaminergic and non-dopaminergic mesencephalic neurons in culture. The reason for this difference is unclear but the absence of appropriate synaptic inputs or some regulatory signals under culture conditions could readily influence the level of expression of ionic channels that mediate Ih or influence cellular excitability. An alternate explanation could be that a proportion of dopaminergic neurons express very low levels of TH and are thus mistakenly identified as non-dopaminergic, thus masking any differences between dopaminergic and non-dopaminergic neurons. This possibility cannot be rejected off hand, but TH immunoreactivity is very efficient and even low level expression is readily detected, making it unlikely that a significant proportion of dopaminergic neurons were misclassified.

Dopaminergic neurons also display a unique pharmacological signature (Lacey et al., 1989). This includes (1) inhibitory response to a D2 autoreceptor agonist, (2) excitatory response to neurotensin and (3) lack of response to a μ -opioid receptor agonist (not shown). We find that similar to the in vivo situation, this pattern is found in cultured TH-EGFP

dopaminergic neurons. Expression of EGFP therefore visibly does not interfere with the major signalling pathways activated by D2 and neurotensin receptors. In the present set of experiments, we have not re-investigated the responsiveness of mesencephalic GABA neurons to μ -opioid receptor agonists. However, in a recent study we have confirmed that cultured rat mesencephalic GABA neurons indeed continue to express this receptor (Bergevin et al., 2002). Although the pharmacological signature is a reliable strategy to identify dopaminergic neurons in culture, it is a time-consuming approach and it is incompatible with dynamic fluorescence imaging experiments that are not accompanied by electrophysiological recordings.

The use of primary cultures derived from TH-EGFP mice is also advantageous relative to other strategies that have been previously established as effective to identify dopaminergic neurons in culture. First, the approach is less time-consuming than microdissection strategies (Masuko et al., 1992) or retrograde labelling approaches (Rayport et al., 1992). Relative to the first of these two approaches, it also has the advantage of preserving the usual complement of dopaminergic and non-dopaminergic neurons present in the ventral mesencephalon.

Although we believe that using TH-EGFP mice is currently the most advantageous strategy to identify living dopaminergic neurons in culture, this model is not without its shortcomings. First, although the vast majority of EGFP-expressing neurons were confirmed to be bona fide dopaminergic neurons, ectopic expression of EGFP was detected in a small proportion of non-dopaminergic neurons. Fortunately, we found that ectopic expression decreased with time in culture such that this does not represent a significant problem unless one wishes to study acutely dissociated dopaminergic neurons from neonatal mice. This limited ectopic expression of EGFP has also been reported in vivo in these mice (Matsushita et al., 2002) and is likely to result from the absence of some regulatory elements in the TH promoter that was used to prepare the mice. However, the

level of ectopic expression reported by this group (8%) is significantly lower than the level that we have estimated here (29% after 2 weeks in culture). This apparent discrepancy is likely to be due to methodological considerations. Indeed, Matsushita and co-workers examined EGFP-expression by dopaminergic neurons in fixed brain section. This is likely to have somewhat underestimated the level of ectopic EGFP expression since tissue fixation usually attenuates the brightness of EGFP fluorescence. To avoid this limitation, we counted live EGFP positive neurons and re-localized them after TH immunocytochemistry, an approach that would not be easy to implement in tissue sections. In support of this interpretation, we found that ectopic expression was only 10% when only the bright EGFP neurons were considered in patch-clamp experiments. This selectivity of EGFP expression in dopaminergic neurons is practically the same as that determined by Matsushita and colleagues (2002) and is low enough to insure that most EGFP-expressing neurons selected in physiological experiments will be dopaminergic.

A second limitation of the present model is that the specific TH-EGFP line that we used requires to be maintained as heterozygotes. The reason is that we have noted that homozygote pups display a slowed growth curve and eventually die after approximately 2–3 weeks. The reason for this is unclear but most likely results from insertion of one of the transgene copies within the coding region or the promoter region of an important gene. It should be possible to circumvent this problem by preparing additional mice lines or by using alternate engineering strategies (see for example, Chuhma et al. (2004)). In conclusion, this work provides evidence that primary cultures of postnatal TH-EGFP mice currently represent an excellent model to study the properties of these cells in culture.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to L.-E.T. and by a grant from the Ministry of Education, Science, Sports, Culture, and Technology of Japan to K.K. and O.H.L.-E.T. receives salary support from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). C.J., F.St-G. and G.D.F. were supported by scholarships from the FRSQ.

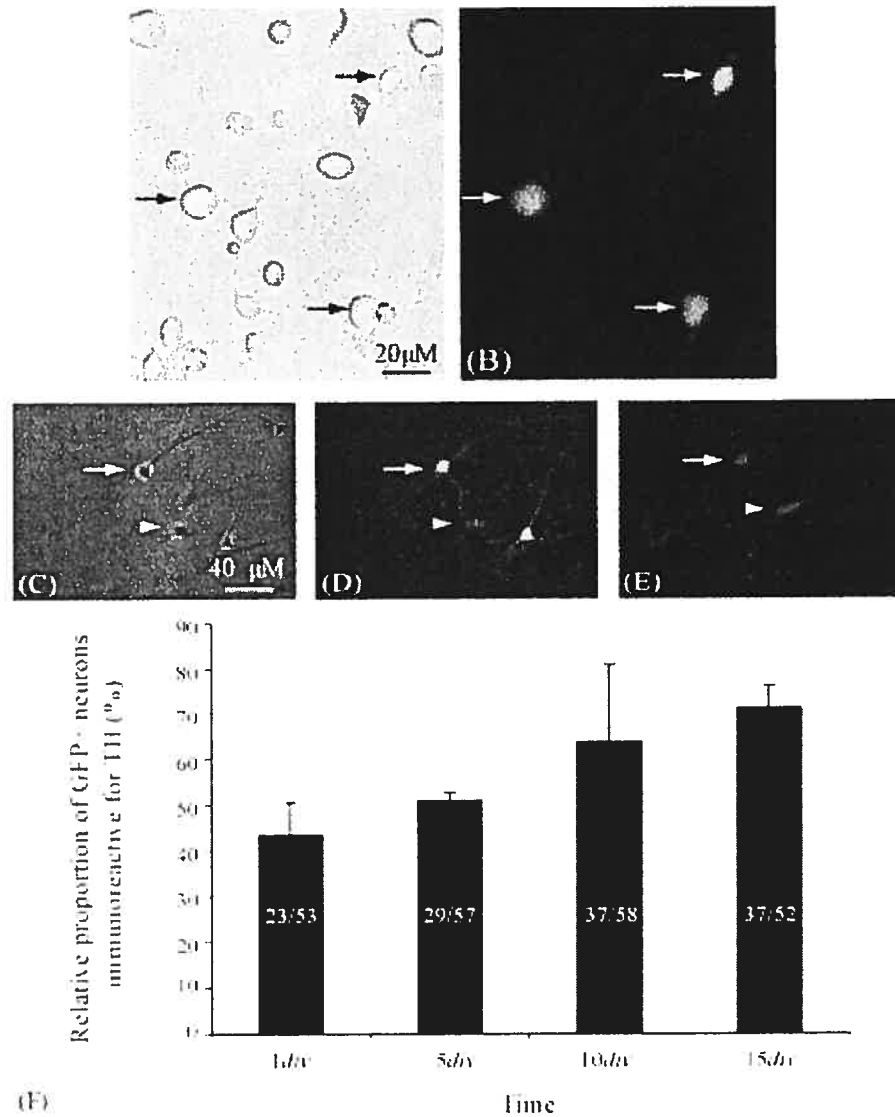


Fig. 1. Selectivity of EGFP expression in dopaminergic neurons increases over time in culture. (A and B) Living acutely dissociated neurons from the mesencephalon of TH-EGFP mice in phase contrast (A) and during epifluorescence (B). The white arrows identify three neurons that were EGFP-positive. (C–E) Live cultured neurons from the mesencephalon of EGFP-TH mice in phase contrast (C), during epifluorescence (D) and after fixation and post-hoc immunocytochemistry against TH (E). The white arrows

identify two EGFP-positive neurons that were also TH-immunopositive. Note the presence of blue fluorescent microspheres that were used to localize neurons after immunocytochemistry. Ectopic expression of EGFP was found in a variable, but minor proportion of neurons. (F) Summary graph showing the selectivity of EGFP expression in dopaminergic neurons over time in culture (1–15 days in vitro; div). The proportion of EGFP expressing neurons that was immunoreactive for TH increases over time in culture. $\chi^2(3) = 10.225$, $p = 0.017$.

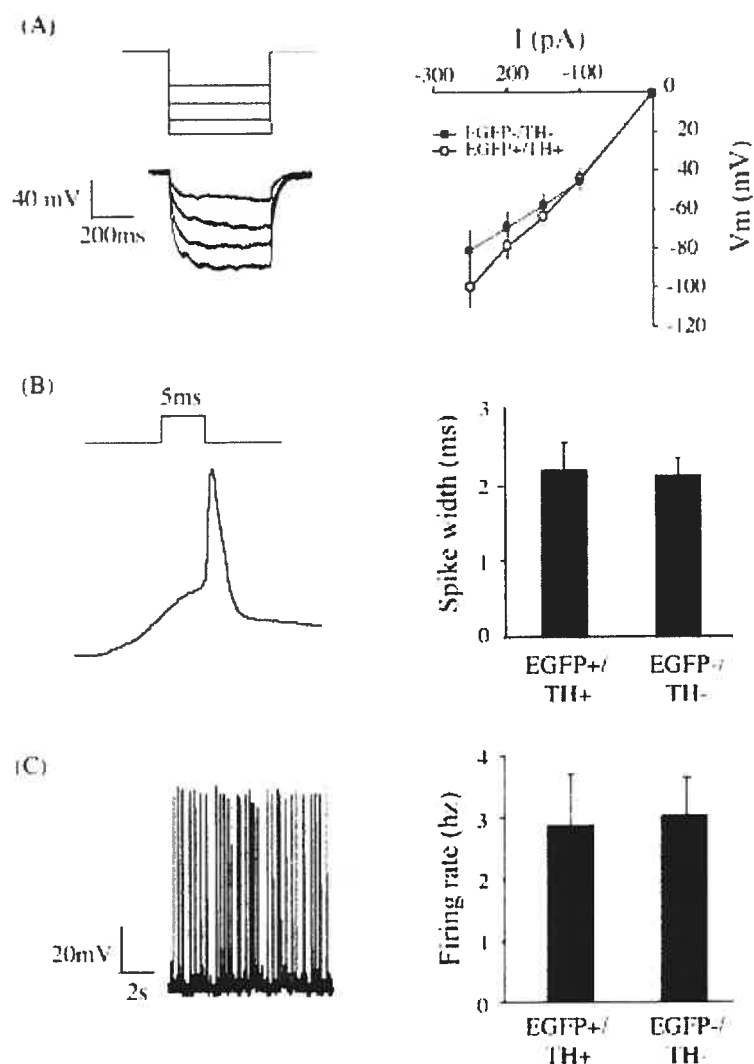


Fig. 2. Electrophysiological characteristics cannot help discriminate dopaminergic neurons in culture. (A) I-V relation of neurons expressing EGFP ($n = 5$, circles) and of other neurons not expressing EGFP ($n = 5$, black squares). The hyperpolarizing stimulation protocol and representative responses are shown to the left. (B) Action potential width of dopaminergic (EGFP+/TH+) ($n = 7$) and non-dopaminergic (EGFP-/TH-) ($n = 6$) neurons induced by a short depolarizing step. A typical action potential recorded from an EGFP+ neuron is shown to the left. (C) Spontaneous firing rate of dopaminergic and non-

dopaminergic neurons. A typical firing rate pattern recorded from an EGFP+ neuron is shown to the left. Neurons expressing EGFP were confirmed to be dopaminergic by post-recording immunolabelling with an anti-TH antibody.

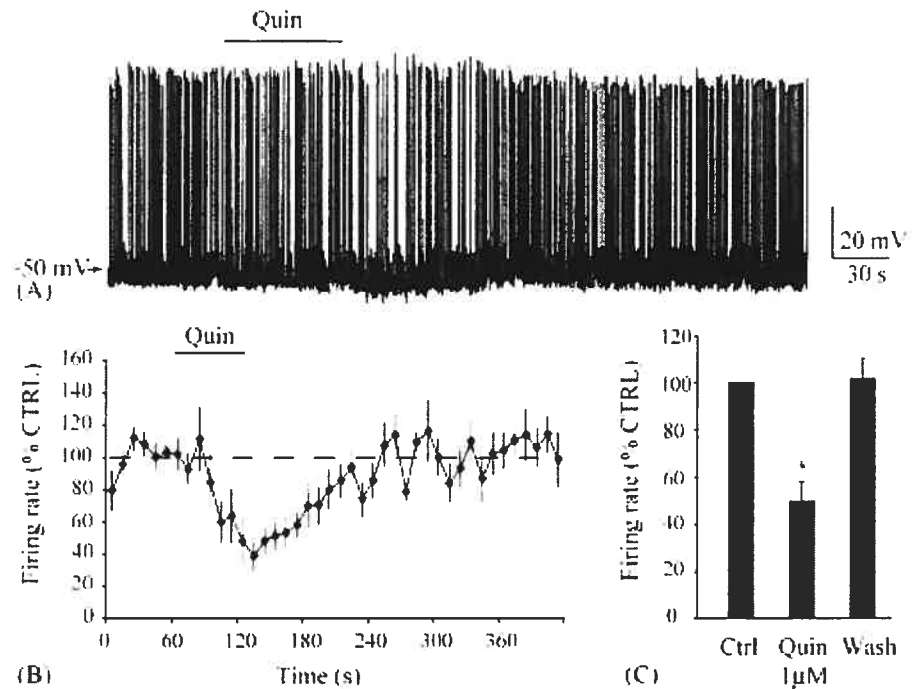


Fig. 3. Activation of somatodendritic dopamine D2 receptors inhibits firing rate. (A) Patch-clamp recording of spontaneous action potentials in an EGFP-expressing dopaminergic neuron. Quinpirole (1 μ M) caused a strong reduction in firing rate. (B) Time-course of quinpirole's effect on firing rate ($n = 7$). Firing rate was measured as the number of action potentials per 10 s bins and expressed as percent of control. (C) Summary graph of the effect of quinpirole on firing frequency in EGFP-expressing dopaminergic neurons ($n = 7$). The magnitude of the response to quinpirole was measured for 1 min at the maximum and normalized to that observed during the baseline period. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * $p \leq 0.05$.

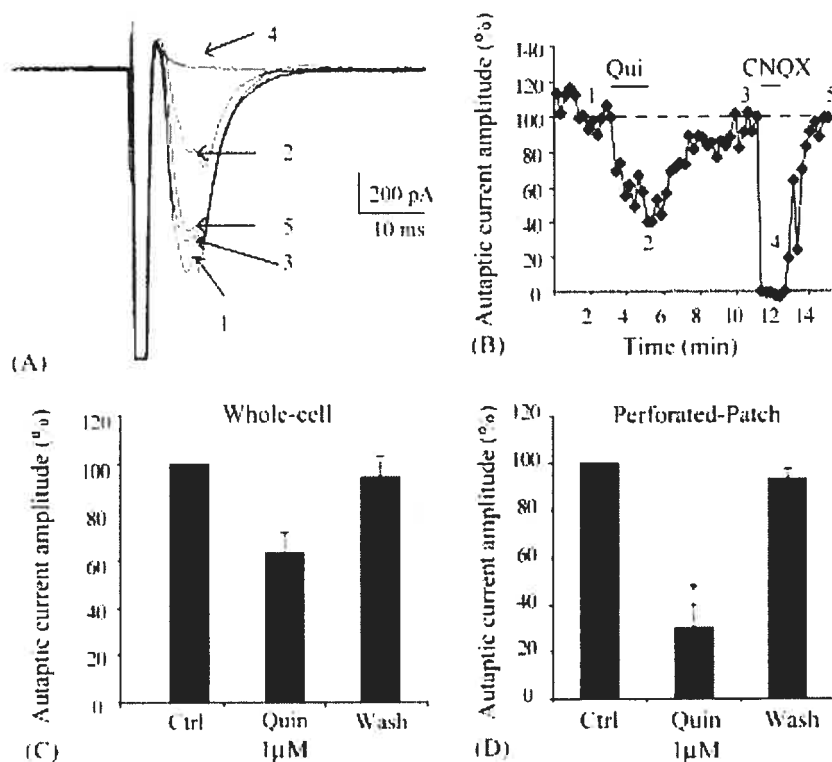


Fig. 4. Terminal D2 receptors inhibit neurotransmitter release in dopaminergic neurons. (A and B) Patch-clamp recording of EPSCs evoked by a single action potential in an isolated EGFP-expressing dopaminergic neuron. CNQX-sensitive glutamate-mediated autaptic EPSC were recorded in dopaminergic neurons (trace 4). Quinpirole (1 μ M) caused a strong reduction of the amplitude of the autaptic current (trace 2). The baseline period and quinpirole and CNQX washout are shown, respectively, as traces 1, 3 and 5. (C and D) Summary graph of the effect of quinpirole on the amplitude of autaptic responses in EGFP-expressing dopaminergic neurons when recorded in whole-cell configuration (C) ($n = 6$) or in perforated patch configuration (D) ($n = 5$). The amplitude of autaptic responses was normalized to that observed during the baseline period. Data are expressed as mean \pm S.E.M. * $p \leq 0.05$.

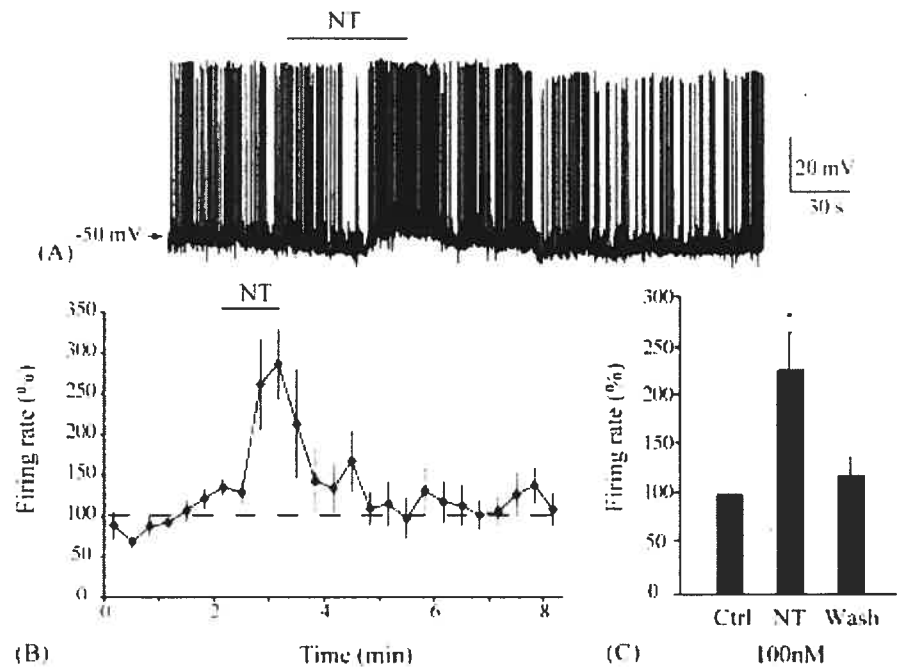


Fig. 5. Dopaminergic neurons show an increased firing rate in response to neurotensin. (A) Patch-clamp recording of spontaneous action potentials in an EGFP-expressing dopaminergic neuron. NT(8–13) (100 nM) produced an increase in firing rate. (B) Time-course of the response to NT(8–13) on dopaminergic neurons firing rate ($n = 8$). (C) Summary graph showing the average enhancement in firing rate caused by NT(8–13) (100 nM) ($n = 8$). The magnitude of response to NT(8–13) was measured for 1 min at the maximum and normalized to that observed during the baseline period. Data are expressed as means \pm S.E.M. * $p \leq 0.05$.

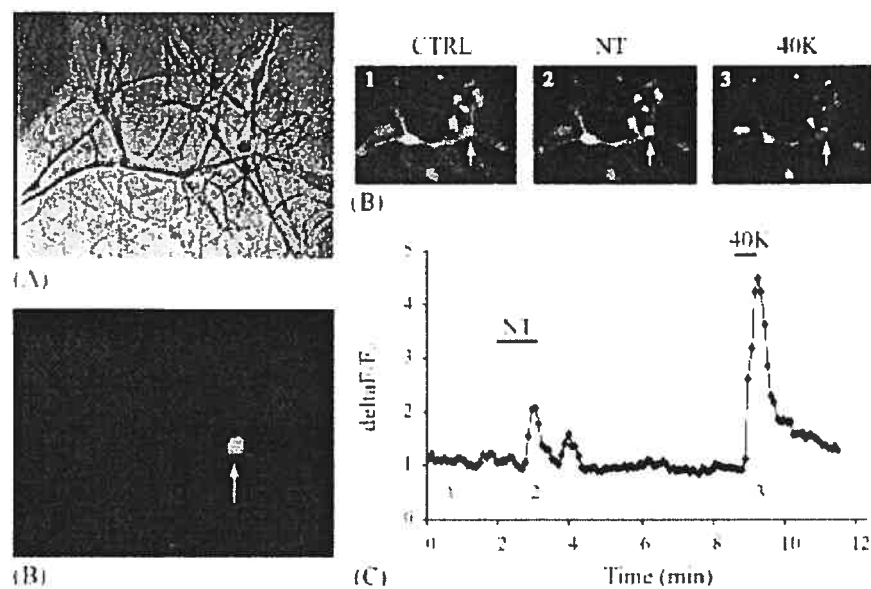


Fig. 6. Neurotensin induces an increase in intracellular calcium in dopaminergic neurons. (A) Phase contrast (upper image) and epifluorescence (lower image) were used to identify EGFP-expressing dopaminergic neurons prior to Fura-2 calcium imaging experiments. (B) False-colored image sequence illustrating that NT(8–13) (middle panel) caused a rise in intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in an EGFP-positive dopaminergic neuron (white arrow). It should be noted that some EGFP-negative but dopaminergic neurons in the field also responded to NT(8–13). (C) Time-course of the rise in $[Ca^{2+}]_i$ in an EGFP-expressing dopaminergic neuron during a 60-s exposure to 100 nM NT(8–13) ($n = 12$). The cells were exposed to saline containing 40 mM K^+ (40 K) to depolarize neurons and evaluate their viability at the end of experiments. Data are represented as the mean fluorescence ratio as a function of time ($\Delta F/F_0$).

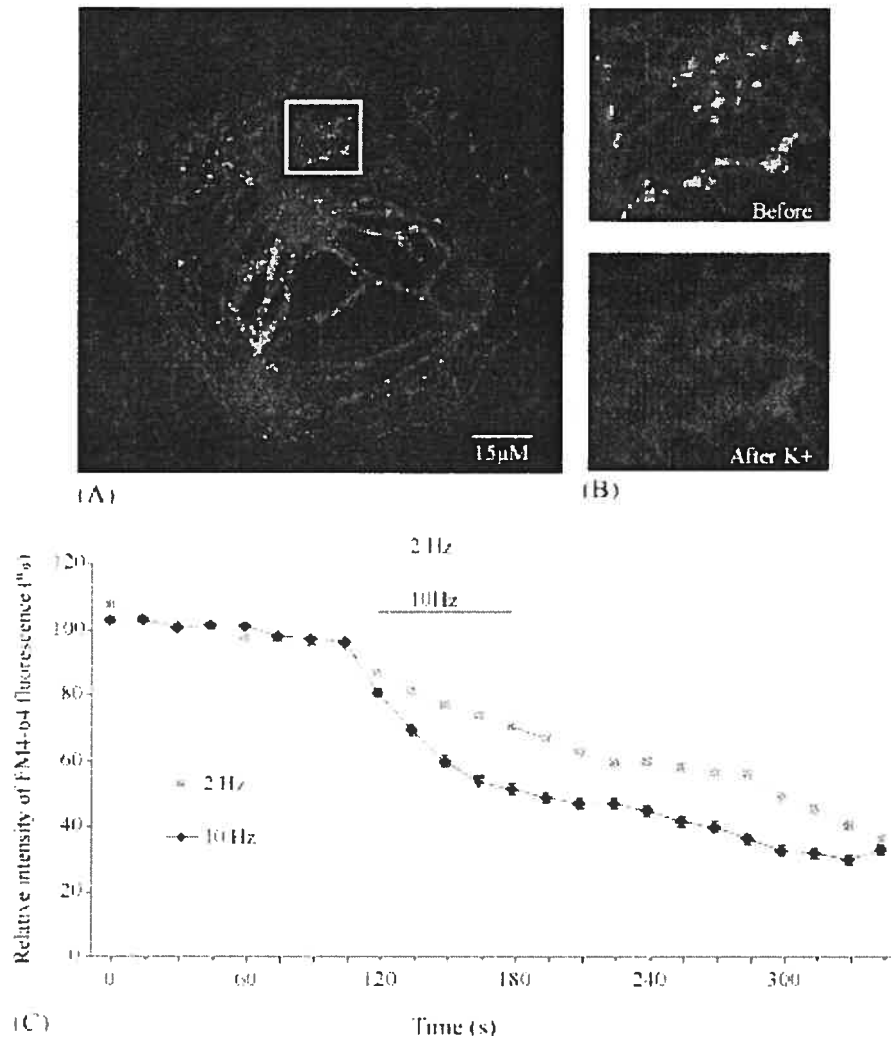


Fig. 7. FM4-64 allows the study of neurotransmitter release kinetics in dopaminergic neurons. (A) Cells exposed to FM4-64 and 90 mM potassium for 2 min and subsequently rinsed for 10 min in physiological saline display a dotted fluorescent signal. This signal represents internalized FM4-64 in presumed axon terminals. (B) Enlargement of (A) showing the FM4-64 signal before and after stimulation with 40 mM potassium. (C) Confocal imaging of FM4-64 showing the release kinetics upon electrical stimulation at 2

Hz for 150 s (300 pulses) and 10 Hz for 60 s (600 pulses). Images are taken every 15 s and data are expressed relative to the first 2 min of the control period. Bars represent the mean \pm S.E.M. (n = 5 cells for 2 Hz; n = 4 cells for 10 Hz).

References

- Aravanis et al., 2003 A.M. Aravanis, J.L. Pyle, N.C. Harata and R.W. Tsien, Imaging single synaptic vesicles undergoing repeated fusion events: kissing, running, and kissing again, *Neuropharmacology* 45 (2003) (6), pp. 797–813.
- Bergevin et al., 2002 A. Bergevin, D. Girardot, M.J. Bourque and L.E. Trudeau, Presynaptic mu-opioid receptors regulate a late step of the secretory process in rat ventral tegmental area GABAergic neurons, *Neuropharmacology* 42 (2002) (8), pp. 1065–1078.
- Betz et al., 1996 W.J. Betz, F. Mao and C.B. Smith, Imaging exocytosis and endocytosis, *Curr Opin Neurobiol* 6 (1996) (3), pp. 365–371.
- Bourque and Trudeau, 2000 M.J. Bourque and L.E. Trudeau, GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture, *Eur J Neurosci* 12 (2000) (9), pp. 3172–3180.
- Bunney et al., 1991 B.S. Bunney, L.A. Chiodo and A.A. Grace, Midbrain dopamine system electrophysiological functioning: a review and new hypothesis, *Synapse* 9 (1991) (2), pp. 79–94.
- Cardozo, 1993 D.L. Cardozo, Midbrain dopaminergic neurons from postnatal rat in long-term primary culture, *Neuroscience* 56 (1993) (2), pp. 409–421.
- Chuhma et al., 2004 N. Chuhma, H. Zhang, J. Masson, X. Zhuang, D. Sulzer and R. Hen et al., Dopamine neurons mediate a fast excitatory signal via their glutamatergic synapses, *J Neurosci* 24 (2004) (4), pp. 972–981.

- Congar et al., 2002 P. Congar, A. Bergevin and L.E. Trudeau, D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K⁺ channels, *J Neurophysiol* 87 (2002) (2), pp. 1046–1056.
- Contini and Raviola, 2003 M. Contini and E. Raviola, GABAergic synapses made by a retinal dopaminergic neuron, *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003) (3), pp. 1358–1363.
- di Porzio et al., 1987 U. di Porzio, G. Rougon, E.A. Novotny and J.L. Barker, Dopaminergic neurons from embryonic mouse mesencephalon are enriched in culture through immunoreaction with monoclonal antibody to neural specific protein 4 and flow cytometry, *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (1987) (20), pp. 7334–7338.
- Dowling and Ehinger, 1975 J.E. Dowling and B. Ehinger, Synaptic organization of the amine-containing interplexiform cells of the goldfish and Cebus monkey retinas, *Science* 188 (1975) (4185), pp. 270–273.
- Everett et al., 2002 A.W. Everett, S.J. Edwards and S.J. Etherington, Structural basis for the spotted appearance of amphibian neuromuscular junctions stained for synaptic vesicles, *J Neurocytol* 31 (2002) (1), pp. 15–25.
- Feigenspan et al., 1998 A. Feigenspan, S. Gustincich, B.P. Bean and E. Raviola, Spontaneous activity of solitary dopaminergic cells of the retina, *J Neurosci* 18 (1998) (17), pp. 6776–6789.
- Feigenspan et al., 2000 A. Feigenspan, S. Gustincich and E. Raviola, Pharmacology of GABA(A) receptors of retinal dopaminergic neurons, *J Neurophysiol* 84 (2000) (4), pp. 1697–1707.

- Franke et al., 2002 H. Franke, J. Grosche, P. Illes and C. Allgaier, 5,7-Dihydroxytryptamine—a selective marker of dopaminergic or serotonergic neurons?, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366 (2002) (4), pp. 315–318.
- Grace and Bunney, 1995 A.A. Grace and B.S. Bunney, Electrophysiological properties of midbrain dopamine neurons, *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*, Floyd E. Bloom and David J. Kupfer, New York (1995) p. 163–77.
- Grace and Onn, 1989 A.A. Grace and S.P. Onn, Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro, *J Neurosci* 9 (1989) (10), pp. 3463–3481.
- Gustincich et al., 1999 S. Gustincich, A. Feigenspan, W. Sieghart and E. Raviola, Composition of the GABA(A) receptors of retinal dopaminergic neurons, *J Neurosci* 19 (1999) (18), pp. 7812–7822.
- Gustincich et al., 1997 S. Gustincich, A. Feigenspan, D.K. Wu, L.J. Koopman and E. Raviola, Control of dopamine release in the retina: a transgenic approach to neural networks, *Neuron* 18 (1997) (5), pp. 723–736.
- Heyer, 1984 E.J. Heyer, Electrophysiological study of mammalian neurons from ventral mesencephalon grown in primary dissociated cell culture, *Brain Res* 310 (1984) (1), pp. 142–148.
- Jiang et al., 1993 Z.G. Jiang, M. Pessia and R.A. North, Dopamine and baclofen inhibit the hyperpolarization-activated cation current in rat ventral tegmental neurones, *J Physiol* 462 (1993), pp. 753–764.
- Johnson and North, 1992 S.W. Johnson and R.A. North, Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs, *J Physiol* 450 (1992), pp. 455–468.

- Lacey et al., 1989 M.G. Lacey, N.B. Mercuri and R.A. North, Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids, *J Neurosci* 9 (1989) (4), pp. 1233–1241.
- Legault et al., 2002 M. Legault, P. Congar, F.J. Michel and L.E. Trudeau, Presynaptic action of neurotensin on cultured ventral tegmental area dopaminergic neurones, *Neuroscience* 111 (2002) (1), pp. 177–187.
- Masuko et al., 1992 S. Masuko, S. Nakajima and Y. Nakajima, Dissociated high-purity dopaminergic neuron cultures from the substantia nigra and the ventral tegmental area of the postnatal rat, *Neuroscience* 49 (1992) (2), pp. 347–364.
- Matsushita et al., 2002 N. Matsushita, H. Okada, Y. Yasoshima, K. Takahashi, K. Kiuchi and K. Kobayashi, Dynamics of tyrosine hydroxylase promoter activity during midbrain dopaminergic neuron development, *J Neurochem* 82 (2002) (2), pp. 295–304.
- Michel and Trudeau, 2000 F.J. Michel and L.E. Trudeau, Clozapine inhibits synaptic transmission at GABAergic synapses established by ventral tegmental area neurones in culture, *Neuropharmacology* 39 (2000) (9), pp. 1536–1543.
- Mundorf et al., 2001 M.L. Mundorf, J.D. Joseph, C.M. Austin, M.G. Caron and R.M. Wightman, Catecholamine release and uptake in the mouse prefrontal cortex, *J Neurochem* 79 (2001) (1), pp. 130–142.
- Ort et al., 1988 C.A. Ort, K.J. Futamachi and J.H. Peacock, Morphology and electrophysiology of ventral mesencephalon nerve cell cultures, *Brain Res* 467 (1988) (2), pp. 205–215.

- Pinnock, 1985 R.D. Pinnock, Neurotensin depolarizes substantia nigra dopamine neurones, *Brain Res* 338 (1985) (1), pp. 151–154.
- Puopolo et al., 2001 M. Puopolo, S.E. Hochstetler, S. Gustincich, R.M. Wightman and E. Raviola, Extrasynaptic release of dopamine in a retinal neuron: activity dependence and transmitter modulation, *Neuron* 30 (2001) (1), pp. 211–225.
- Rayport et al., 1992 S. Rayport, D. Sulzer, W.X. Shi, S. Sawasdikosol, J. Monaco and D. Batson et al., Identified postnatal mesolimbic dopamine neurons in culture: morphology and electrophysiology, *J Neurosci* 12 (1992) (11), pp. 4264–4280.
- Sawamoto et al., 2001 K. Sawamoto, N. Nakao, K. Kobayashi, N. Matsushita, H. Takahashi and K. Kakishita et al., Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons, *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) (11), pp. 6423–6428.
- Segal et al., 1998 M.M. Segal, R.W. Baughman, K.A. Jones and J.E. Huettner, Mass cultures and microislands of neurons from postnatal rat brain. In: G. Banker and K. Goslin, Editors, *Culturing nerve cells*, MIT Press, Cambridge (1998), pp. 309–338.
- Seutin et al., 1989 V. Seutin, L. Massotte and A. Dresse, Electrophysiological effects of neurotensin on dopaminergic neurones of the ventral tegmental area of the rat in vitro, *Neuropharmacology* 28 (1989) (9), pp. 949–954.
- Shimoda et al., 1992 K. Shimoda, Y. Sauve, A. Marini, J.P. Schwartz and J.W. Commissiong, A high percentage yield of tyrosine hydroxylase-positive cells from rat E14 mesencephalic cell culture, *Brain Res* 586 (1992), pp. 319–331.

- Silva et al., 1988 N.L. Silva, A.P. Mariani, N.L. Harrison and J.L. Barker, 5,7-Dihydroxytryptamine identifies living dopaminergic neurons in mesencephalic cultures, *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (1988) (19), pp. 7346–7350.
- Steensen et al., 1995 B.H. Steensen, S. Nedergaard, K. Ostergaard and J.D. Lambert, Electrophysiological characterization of dopaminergic and non-dopaminergic neurones in organotypic slice cultures of the rat ventral mesencephalon, *Exp Brain Res* 106 (1995) (2), pp. 205–214.
- St-Gelais et al., 2004 F. St-Gelais, M. Legault, M.J. Bourque, P.P. Rompre and L.E. Trudeau, Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons, *J Neurosci* 24 (2004) (10), pp. 2566–2574.
- Sulzer et al., 1998 D. Sulzer, M.P. Joyce, L. Lin, D. Geldwert, S.N. Haber and T. Hattori et al., Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro, *J Neurosci* 18 (1998) (12), pp. 4588–4602.
- Wang and Zucker, 1998 C. Wang and R.S. Zucker, Regulation of synaptic vesicle recycling by calcium and serotonin, *Neuron* 21 (1998) (1), pp. 155–167.