

---

Université de Montréal

**PARTICIPATION DES TACHYKININES ET DE LEURS RÉCEPTEURS DANS  
LA RÉGULATION CENTRALE DU SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE ET DE  
L'ACTIVITÉ COMPORTEMENTALE CHEZ LE RAT ÉVEILLÉ**

par

Pierre Picard

Département de physiologie

Faculté de médecine

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

---

juin 1997

© Pierre Picard, 1997



W  
4  
U58  
1998  
V.012

Université de Montréal

L'ACTIVITÉ COMPORTIMENTALE CHEZ LE RAT ÉVEILLÉ  
LA RÉGULATION CENTRALE DU SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE ET DE  
PARTICIPATION DES TACHYKININES ET DE LEURS RÉCEPTEURS DANS

par

Pierre Picot

Département de physiologie

Faculté de médecine

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

juin 1997

© Pierre Picot, 1997



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Participation des tachykinines et de leurs récepteurs dans la régulation centrale  
du système cardiovasculaire et de l'activité comportementale chez le rat éveillé**

Présentée par:

Pierre Picard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

président du jury : .....

membre du jury : .....

membre du jury : .....

Examineur externe : .....

---

Thèse acceptée le: .....

## Sommaire

L'administration intracérébroventriculaire (i.c.v.) de tachykinines chez le rat non anesthésié induit des réponses sympathoexcitatrices, neuroendocriniennes et comportementales qui témoignent de leur participation dans divers mécanismes responsables du contrôle cardiovasculaire et comportemental. Cette étude a pour objectif de mieux comprendre les fondements pharmacologiques de ces réponses centrales aux tachykinines.

L'administration i.c.v. des tachykinines substance P (SP), neurokinine A (NKA), neuropeptide K (NPK) ou neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) entraîne des augmentations dose dépendantes de la pression artérielle (PA) et de la fréquence cardiaque (FC) ainsi que des changements communs d'activité comportementale : toilettage, grattement de la tête, enfouissement, reniflement, redressement et débarbouillage. L'utilisation d'antagonistes hautement sélectifs nous a permis d'établir le type de récepteur impliqué dans ces effets centraux des tachykinines. Il fut observé que la SP et la NKA ne sont pas des agonistes sélectifs des récepteurs NK-1 et NK-2. En effet, lorsque le récepteur NK-1 est bloqué par un antagoniste sélectif, la SP active le récepteur NK-2, et inversement, le blocage du récepteur NK-2 par un antagoniste sélectif, dévoile une activité mineure, mais significative, de la NKA sur le récepteur NK-1. En revanche, le NPK démontre une grande sélectivité pour le récepteur NK-1, alors que les réponses au NP $\gamma$  semblent dues en partie à l'activation du récepteur NK-2 et à un site encore indéterminé, n'appartenant pas aux types NK-1 ou NK-3. En plus du récepteur NK-1, notre étude démontre la présence d'un récepteur NK-2 central fonctionnel chez le rat. L'utilisation d'antagonistes plus sélectifs suggère que ce dernier serait du sous-type NK-2B.

D'autres types de réponses sont obtenues suite à l'administration i.c.v. de neurokinine B (NKB) ou d'agonistes du récepteur NK-3 (senktide et [MePhe<sup>7</sup>]NKB). Ceux-ci causent une réponse chronotrope positive ou biphasique sur la FC, augmentent la PA et induisent un patron de comportements différents des autres tachykinines, dont le principal est la secousse corporelle.



En résumé, l'administration i.c.v. des tachykinines induit deux types de réponses biologiques; l'une étant reliée à l'activation des récepteurs NK-1 et/ou NK-2 (SP, NKA, NPK, NPY), et l'autre à l'activation du récepteur NK-3 (NKB, [MePhe<sup>7</sup>]NKB, senktide). Ces études pharmacologiques suggèrent des corrélats physiologiques à ces deux types de réponses tachykininergiques : d'une part, l'activation des récepteurs NK-1/NK-2 centraux pourrait avoir un rôle dans la transmission nociceptive et dans la réaction de défense, et d'autre part, le récepteur NK-3 central pourrait être impliqué dans la régulation de l'équilibre hydrosodé.

Nous avons aussi démontré une interaction fonctionnelle directe entre l'antagoniste du récepteur AT-1 de l'angiotensine II (AII), le losartan, ainsi que son métabolite actif, le EXP-3174, avec le récepteur NK-3 central des tachykinines. Nous proposons que le losartan puisse être utilisé dans le développement d'une nouvelle classe d'antagonistes non peptidiques pour le récepteur NK-3. Actuellement, le manque de bons antagonistes pour le récepteur NK-3 freine considérablement l'avancement des connaissances reliées à ce récepteur chez le mammifère.

L'ensemble de ces résultats fournit des connaissances physiologiques et pharmacologiques nouvelles sur le rôle des tachykinines et de leurs récepteurs dans les mécanismes centraux de régulation cardiovasculaire et de l'activité comportementale chez le rat. Ces études ont aussi soulevé plusieurs questions, lesquelles ont été discutées en rapport avec l'ensemble de la littérature.

Mots clés : tachykinines, système nerveux central, récepteurs, pharmacologie, antagonistes, agonistes, comportement, pression artérielle, fréquence cardiaque

## *Table des matières*

<i>Sommaire</i> .....	<i>iii</i>
<i>Table des matières</i> .....	<i>v</i>
<i>Liste des Tableaux</i> .....	<i>xii</i>
<i>Liste des Figures</i> .....	<i>xiv</i>
<i>Liste des Abréviations</i> .....	<i>xvii</i>
<i>Remerciements</i> .....	<i>xix</i>
<i>Dédicace</i> .....	<i>xx</i>
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1. <i>Préface</i> .....	<i>1</i>
2. <i>Historique</i> .....	<i>6</i>
3. <i>Aspects moléculaires et cellulaires des tachykinines</i> .....	<i>15</i>
i) <i>Gènes et précurseurs des tachykinines</i> .....	<i>16</i>
ii) <i>Régulation de l'expression des gènes préprotachykinines</i> .....	<i>19</i>
a) <i>Effet stimulateur de la dopamine sur l'expression du gène préprotachykinine</i> .....	<i>20</i>
b) <i>Effets des cytokines sur l'expression du gène préprotachykinine</i> ..	<i>20</i>
c) <i>Éléments régulateurs cis sur le gène préprotachykinine-A</i> .....	<i>21</i>
iii) <i>Biosynthèse, entreposage et transport axonal des tachykinines</i> .....	<i>22</i>
iv) <i>Relâche des tachykinines</i> .....	<i>23</i>
v) <i>Métabolisme des tachykinines</i> .....	<i>24</i>
vi) <i>Coexistence des tachykinines avec d'autres neuromédiateurs</i> .....	<i>29</i>
4. <i>Pharmacologie des tachykinines</i> .....	<i>31</i>
i) <i>Récepteurs des tachykinines</i> .....	<i>34</i>
a) <i>Classification</i> .....	<i>34</i>
b) <i>Biologie moléculaire</i> .....	<i>36</i>
ii) <i>Outils pharmacologiques des tachykinines</i> .....	<i>37</i>
a) <i>Agonistes sélectifs</i> .....	<i>38</i>
b) <i>Antagonistes sélectifs</i> .....	<i>43</i>
- <i>Génération peptidique</i> .....	<i>43</i>
- <i>Génération non peptidique</i> .....	<i>45</i>
c) <i>Sous-types de récepteurs des tachykinines</i> .....	<i>49</i>
- <i>Récepteur NK-1</i> .....	<i>50</i>

- Récepteur NK-2	54
- Récepteur NK-3	58
iii) <i>Seconds messagers</i>	58
a) <i>Phospholipase C et calcium intracellulaire</i>	58
b) <i>Tachyphylaxie du récepteur NK-1</i>	59
c) <i>Effets des tachykinines sur les canaux ioniques</i>	62
- <i>inhibition des canaux potassiques à rectification interne</i>	63
- <i>inhibition des canaux potassiques à courant-M</i>	64
- <i>activation de canaux dépolarisants non-sélectifs</i>	65
- <i>inhibition des canaux calciques de type N</i>	66
- <i>signification fonctionnelle de cette modulation ionique</i>	66
d) <i>Autres seconds messagers des tachykinines</i>	68
5. <i>Fonctions des tachykinines</i>	69
i) <i>Système nerveux central</i>	69
a) <i>Régulation des fonctions cardiovasculaires</i>	72
- <i>Diencephale</i>	73
- <i>Cerveau postérieur</i>	81
- <i>Moelle épinière</i>	84
b) <i>Contrôle de l'équilibre hydrosodé</i>	86
c) <i>Centres du comportement et de la locomotion</i>	87
d) <i>Nociception</i>	90
e) <i>Implication des tachykinines dans les processus de la mémoire</i>	96
f) <i>Télencéphale</i>	96
g) <i>Tachykinines dans les fonctions sexuelles</i>	97
ii) <i>Périphérie</i>	97
a) <i>Fonctions "efférentes" des tachykinines</i>	98
- <i>inflammation</i>	101
- <i>effets cardiovasculaire</i>	102
b) <i>Tractus gastrointestinal</i>	104

**CHAPITRE 2 HETEROGENEITE PHARMACOLOGIQUE DES  
REponses CARDIOVASCULAIRES ET  
COMPORTEMENTALES SUIVANT L'ADMINISTRATION  
INTRACEREBROVENTRICULAIRE DE SUBSTANCE P  
ET DE NEUROKININE A CHEZ LE RAT EVEILLE**

.....	106
<i>Avant-propos au deuxième chapitre</i>	107

<i>Article original</i>	<i>Use of selective antagonists to dissociate the central cardiovascular and behavioural effects of tachykinins on NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors in the rat (Br. J. Pharmacol., 107: 750-755, 1992)</i> .....	108
1.	<i>Summary</i> .....	109
2.	<i>Introduction</i> .....	110
3.	<i>Methods</i> .....	111
	i) <i>Implantation of catheters and measurement of cardiovascular and behavioural parameters</i> .....	111
	ii) <i>Experimental protocols</i> .....	113
	iii) <i>Peptides and nonpeptides</i> .....	113
	iv) <i>Statistical analysis of data</i> .....	114
4.	<i>Results</i> .....	114
5.	<i>Discussion</i> .....	119
6.	<i>Acknowledgements</i> .....	121
7.	<i>References</i> .....	122
 <b>CHAPITRE 3 CARACTERISATION DES TROIS RECEPTEURS AUX TACHYKININES DANS LE CONTROLE CARDIOVASCULAIRE ET COMPORTEMENTAL SUPRASPINAL</b> .....		126
	<i>Avant-propos au troisième chapitre</i> .....	127
<i>Article original</i>	<i>Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered tachykinins in the rat: characterization of receptors with selective antagonists (Br. J. Pharmacol., 112: 240-249, 1994)</i> .....	128
1.	<i>Summary</i> .....	129
2.	<i>Introduction</i> .....	130
3.	<i>Methods</i> .....	132
	i) <i>Animal preparation</i> .....	132
	ii) <i>Measurement of cardiovascular and behavioural responses</i> .....	133

iii)	<i>Experimental protocols</i> . . . . .	134
iv)	<i>Peptides and non-peptides</i> . . . . .	135
v)	<i>Statistical analysis of data</i> . . . . .	135
4.	<i>Results</i> . . . . .	136
i)	<i>Central cardiovascular and behavioural effects induced by SP, NKA and [MePhe<sup>7</sup>]NKB</i> . . . . .	136
ii)	<i>Effects of tachykinin receptor antagonists on the responses to SP, NKA and [MePhe<sup>7</sup>]NKB</i> . . . . .	137
5.	<i>Discussion</i> . . . . .	153
6.	<i>Acknowledgements</i> . . . . .	156
7.	<i>References</i> . . . . .	157

**CHAPITRE 4 EFFETS INTRACEREBROVENTRICULAIRES DU NEUROPEPTIDE GAMMA CHEZ LE RAT CONSCIENT; CARACTERISATION DES RECEPTEURS IMPLIQUES A L'AIDE D'ANTAGONISTES SELECTIFS . . . . . 161**

	<i>Avant-propos au quatrième chapitre</i> . . . . .	162
--	---	-----

<i>Article original</i>	<i>Intracerebroventricular responses to neuropeptide gamma in the conscious rat: characterization of its receptor with selective antagonists (Br. J. Pharmacol., 117: 241-249, 1996)</i> . . . . .	163
-------------------------	--	-----

1.	<i>Summary</i> . . . . .	164
2.	<i>Introduction</i> . . . . .	165
3.	<i>Methods</i> . . . . .	167
i)	<i>Animal preparation</i> . . . . .	167
ii)	<i>Measurement of cardiovascular and behavioural responses</i> . . . . .	168
iii)	<i>Experimental protocols</i> . . . . .	169
iv)	<i>Peptides and non-peptides</i> . . . . .	171
v)	<i>Statistical analysis of data</i> . . . . .	171
4.	<i>Results</i> . . . . .	172
i)	<i>Central cardiovascular and behavioural effects induced by NP<math>\gamma</math></i> . . . . .	172
ii)	<i>Reproduction of the central effects of NP<math>\gamma</math></i> . . . . .	173

iii) <i>Effects of selective tachykinin antagonists versus the central effects of NPY</i> .....	173
iv) <i>Effects of NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptor desensitization on central effects of NPY</i> .....	174
5. <i>Discussion</i> .....	186
i) <i>Central receptors activated by i.c.v. NPY</i> .....	187
ii) <i>Site of action for NPY</i> .....	188
iii) <i>Conclusion</i> .....	190
6. <i>Acknowledgements</i> .....	190
7. <i>References</i> .....	191
<b>CHAPITRE 5 CARACTERISATION DES RECEPTEURS AUX TACHYKININES IMPLIQUES DANS LA REGULATION SPINALE ET SUPRASPINALE CHEZ LE RAT EVEILLE</b> .....	196
<i>Avant-propos au cinquième chapitre</i> .....	197
<i>Article original</i> <i>Characterization of the tachykinin receptors involved in spinal and supraspinal cardiovascular regulation (Can. J. Physiol. Pharmacol., 73: 892-902, 1995)</i> .....	198
1. <i>Abstract</i> .....	199
2. <i>Résumé</i> .....	200
3. <i>Introduction</i> .....	201
4. <i>Material and Methods</i> .....	206
i) <i>Animal model</i> .....	206
ii) <i>Measurement of cardiovascular responses</i> .....	206
iii) <i>Experimental protocols</i> .....	207
iv) <i>Compounds</i> .....	207
v) <i>Statistical analysis of data</i> .....	208
5. <i>Results</i> .....	209
i) <i>Cardiovascular responses to intrathecally administered tachykinins</i> ..	209
ii) <i>Effects of neurokinin antagonists against intrathecal tachykinins</i> ..	209

iii)	<i>Cardiovascular responses to i.c.v. administered tachykinins</i>	209
iv)	<i>Effects of neurokinin antagonists against i.c.v. tachykinins</i>	210
6.	<i>Discussion</i>	221
i)	<i>Spinal action of tachykinins</i>	221
ii)	<i>Supraspinal action of tachykinins</i>	223
7.	<i>Conclusion</i>	224
8.	<i>Acknowledgements</i>	225
9.	<i>References</i>	225
	<b>CHAPITRE 6 INTERACTION FONCTIONNELLE ENTRE LE LOSARTAN ET LE RECEPTEUR NK-3 CENTRAL DES TACHYKININES CHEZ LE RAT EVEILLE</b>	232
	<i>Avant-propos au sixième chapitre</i>	233
	<i>Article original</i> <i>Functional interaction between losartan and central tachykinin NK<sub>3</sub> receptors in the conscious rat (Br. J. Pharmacol., 114: 1563-1570, 1995)</i>	234
1.	<i>Summary</i>	235
2.	<i>Introduction</i>	236
3.	<i>Methods</i>	238
i)	<i>Animal preparation</i>	238
ii)	<i>Measurement of cardiovascular and behavioural responses</i>	238
iii)	<i>Experimental protocols</i>	239
iv)	<i>Peptides and non-peptides</i>	240
v)	<i>Statistical analysis of data</i>	240
4.	<i>Results</i>	241
i)	<i>Cardiovascular and behavioural effects induced by SP, NKA, [MePhe<sup>7</sup>]NKB and AII</i>	241
ii)	<i>Effects of antagonists on the responses to SP, NKA, [MePhe<sup>7</sup>]NKB and AII</i>	241

5.	<i>Discussion</i> .....	252
	i) <i>Losartan, a putative ligand for the NK<sub>3</sub> tachykinin receptor</i> .....	252
	ii) <i>Lack of interaction between tachykinins and angiotensin in supraspinal cardiovascular regulation</i> .....	254
	iii) <i>Supraspinal site of action of tachykinins and AII</i> .....	255
	iv) <i>Conclusion</i> .....	256
6.	<i>Acknowledgements</i> .....	256
7.	<i>References</i> .....	256
 <i>CHAPITRE 7 DISCUSSION</i> .....		263
1.	<i>Actions supraspinales des tachykinines</i> .....	263
2.	<i>Pharmacologie supraspinale des tachykinines</i> .....	266
3.	<i>Site d'action des tachykinines</i> .....	270
4.	<i>Le losartan, un ligand pour le récepteur NK-3</i> .....	272
5.	<i>Absence d'interaction entre les tachykinines et l'AII dans la régulation cardiovasculaire supraspinale</i> .....	273
6.	<i>Conclusions générales</i> .....	274
 <i>REFERENCES</i> .....		276



## *Liste des Tableaux*

### *Chapitre 1*

<i>Tableau 1.</i>	<i>Structure des tachykinines . . . . .</i>	<i>9</i>
<i>Tableau 2.</i>	<i>Caractéristiques des trois récepteurs des tachykinines . . . . .</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 3.</i>	<i>Composition en acides aminés dans les positions variables des segments transmembranaires (TM1 - TM7) du récepteur NK-1 chez différentes espèces. . . . .</i>	<i>51</i>
<i>Tableau 4.</i>	<i>Critères pharmacologiques de distinction entre les récepteurs NK-2A et NK-2B . . . . .</i>	<i>56</i>
<i>Tableau 5.</i>	<i>Composition en acides aminés dans les positions variables des segments transmembranaires (TM1 - TM7) du récepteur NK-2 chez différentes espèces. . . . .</i>	<i>57</i>
<i>Tableau 6.</i>	<i>Distribution des tachykinines et de leurs récepteurs dans le système nerveux central du rat . . . . .</i>	<i>71</i>
<i>Tableau 7.</i>	<i>Peptides retrouvés dans les afférences sensorielles primaires des mammifères. . . . .</i>	<i>94</i>

### *Chapitre 2*

<i>Tableau 1.</i>	<i>Effects of selective tachykinin receptor antagonists on changes in mean arterial blood pressure elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P or neurokinin A in the conscious rat . . . . .</i>	<i>116</i>
<i>Tableau 2.</i>	<i>Effects of selective tachykinin receptor antagonists on changes in heart rate elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P or neurokinin A in the conscious rat . . . . .</i>	<i>117</i>
<i>Tableau 3.</i>	<i>Effects of selective tachykinin receptor antagonists on behavioural responses elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P or neurokinin A in the conscious rat . . . . .</i>	<i>118</i>

### *Chapitre 3*

<i>Tableau 1.</i>	<i>Effects of selective tachykinin receptor antagonists on changes in mean arterial blood pressure elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P, neurokinin A or [MePhe<sup>7</sup>]NKB in the conscious rat . . . . .</i>	<i>147</i>
<i>Tableau 2.</i>	<i>Effects of selective tachykinin receptor antagonists on changes in heart rate elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P, neurokinin A or [MePhe<sup>7</sup>]NKB in the conscious rat . . . . .</i>	<i>149</i>

Tableau 3.	<i>Effects of selective tachykinin receptor antagonists on behavioural changes elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P, neurokinin A or [MePhe<sup>7</sup>]NKB in the conscious rat</i> . . . . .	151
Tableau 4.	<i>Effects of selective tachykinin receptor antagonists on behavioural responses in the conscious rat</i> . . . . .	152

#### *Chapitre 4*

Tableau 1.	<i>Behavioural responses elicited by i.c.v. injection of neuropeptide <math>\gamma</math> in conscious rats</i> . . . . .	182
Tableau 2.	<i>Mean arterial blood pressure and heart rate baseline values from six groups of rats presented in Table 3 and Figure 3</i> . . . . .	183
Tableau 3.	<i>Effects of selective tachykinin antagonists on behavioural responses elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol neuropeptide <math>\gamma</math></i> . . . . .	184

## Liste des Figures

### Chapitre 1

Figure 1.	Précurseurs des tachykinines . . . . .	17
Figure 2.	Métabolisme de la substance P . . . . .	25
Figure 3.	Voies proposées du métabolisme de la substance P dans la vasculature . . .	27
Figure 4.	Représentation schématique du récepteur NK-1 . . . . .	32
Figure 5.	Structures chimiques des antagonistes non peptidiques du récepteur NK-1 des tachykinines . . . . .	46
Figure 6.	Effets des tachykinines sur l'excitabilité cellulaire . . . . .	60
Figure 7.	Schéma résumant l'échelle d'action des courants potassiques à rectification interne ( $I_{RI}$ ) et à courant-M ( $I_M$ ) ainsi que des canaux nonselectifs ( $I_{NS}$ ) en relation avec les potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) et inhibiteurs (PPSI) rapides et lents . . . . .	67
Figure 8.	Groupes cellulaires et projections contenant de la substance P dans le système nerveux central du rat . . . . .	70
Figure 9.	Principales voies descendantes projetants vers les neurones préganglionnaires sympathiques de la colonne intermédiolatérale . . . . .	74
Figure 10.	Principales afférences et efférences du centre vasomoteur bulbaire (noyau bulbaire rostroventrolatéral) chez le rat . . . . .	75
Figure 11.	Principales voies efférentes projetants du noyau solitaire vers la moelle épinière, le bulbe, la protubérance et l'hypothalamus ayant des fonctions cardiovasculaires . . . . .	76
Figure 12.	Voies centrales proposées comme étant l'origine de l'innervation cardiovasculaire périphérique . . . . .	77
Figure 13.	Voies centrales proposées dans le contrôle de la sécrétion neuroendocrinienne de l'hypothalamus . . . . .	78
Figure 14.	Modèle montrant les deux types de réponses cardiovasculaires observées suite à l'administration intracérébroventriculaire de tachykinines . . . . .	81
Figure 15.	Schéma représentant l'anatomie fonctionnelle des neurones afférentes sensorielles sensibles à la capsaïcine . . . . .	98

### Chapitre 3

Figure 1.	Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol substance P, neurokinin A and [MePhe <sup>7</sup> ]NKB on three consecutive days in conscious rats . . . . .	139
Figure 2.	Effects of several doses of substance P, neurokinin A and [MePhe <sup>7</sup> ]NKB injected intracerebroventricularly in conscious rats . . . . .	141

Figure 3.	Time course of mean arterial blood pressure and heart rate changes evoked by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P, neurokinin A and [MePhe <sup>7</sup> ]NKB in conscious rats . . . . .	143
Figure 4.	Effects of selective tachykinin receptor antagonists on maximal changes in mean arterial blood pressure and heart rate induced by i.c.v. injection of 25 pmol substance P, neurokinin A or [MePhe <sup>7</sup> ]NKB in the conscious rat .	144
Figure 5.	Direct effects of 6.5 nmol RP 67580, 6.5 nmol SR 48968, 6.5 nmol R 486 or CSF on mean arterial blood pressure and heart rate after i.c.v. injection in conscious rat . . . . .	146

#### Chapitre 4

Figure 1.	Time course of changes in mean arterial blood pressure and heart rate evoked by i.c.v. injections of NP $\gamma$ in conscious freely moving rats. . . . .	175
Figure 2.	Cardiovascular and behavioural effects to i.c.v. injection of CSF or 25 pmol neuropeptide $\gamma$ on day 1 and day 2 in the same rat. . . . .	177
Figure 3.	Effects of selective tachykinin receptor antagonists on maximal changes in mean arterial blood pressure and heart rate induced by the i.c.v. injection of vehicle or 25 pmol neuropeptide $\gamma$ in conscious rat . . . . .	179
Figure 4.	Cardiovascular and behavioural effects to i.c.v. injection of CSF or 25 pmol neuropeptide $\gamma$ in rats which have been previously desensitized to SP and NKA on day 2 . . . . .	180

#### Chapitre 5

Figure 1.	Schematic representation of the putative role played by SP and related tachykinins in spinal cardiovascular regulation . . . . .	202
Figure 2.	Dose-response curves showing the maximum increase in mean arterial pressure and heart rate induced by i.t. injection of substance P, neurokinin A, neurokinin B, neuropeptide $\gamma$ or neuropeptide K in conscious rat . . . . .	211
Figure 3.	Effects of selective tachykinin receptor antagonists on maximal changes in mean arterial blood pressure and heart rate elicited by the i.t. injection of 6.5 nmol substance P, 0.78 nmol neuropeptide $\gamma$ or 3.25 nmol neuropeptide K in the conscious rat . . . . .	213
Figure 4.	Dose-response curves showing the maximum increase in mean arterial blood pressure and heart rate induced by i.c.v. injection of substance P, neurokinin A, neurokinin B, neuropeptide $\gamma$ , neuropeptide K, senktide or [MePhe <sup>7</sup> ]-NKB in conscious rat . . . . .	215

Figure 5.	<i>Effects of selective tachykinin receptor antagonists on maximal changes in mean arterial blood pressure and heart rate elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol of agonists in the conscious rat</i> . . . . .	217
Figure 6.	<i>Effects of the inactive enantiomers CP-96,344 and RP-68,651 on maximal changes in mean arterial blood pressure and heart rate elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P in the conscious rat</i> . . . . .	219
Figure 7.	<i>Summary of the putative role of tachykinin receptors in spinal and supraspinal cardiovascular regulation</i> . . . . .	220

## Chapitre 6

Figure 1.	<i>Time course of mean arterial blood pressure and heart rate changes evoked by i.c.v. injections of 25 pmol substance P, neurokinin A, [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B and angiotensin II in conscious freely moving rats</i> . . . . .	243
Figure 2.	<i>Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol substance P, neurokinin A, [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B and angiotensin II in presence and absence of losartan</i> . . . . .	244
Figure 3.	<i>Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B and angiotensin II in presence and absence of EXP-3174</i> . . . . .	246
Figure 4.	<i>Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B and angiotensin II in presence and absence of PD-123,319</i> . . . . .	248
Figure 5.	<i>Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B and angiotensin II in presence and absence of R 486</i> . . . . .	250

## Liste des Abréviations

$^3\text{H}$	hydrogène tritié
$^{35}\text{S}$	souffre radioisotope 35
5-HT	sérotinine ou 5-hydroxytryptamine
6-OHDA	6-hydroxydopamine
ACh	acétylcholine
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
Ang II	angiotensine II
AMPc	adénosine monophosphate 3',5'-cyclique
ARNm	acide ribonucléique messager
AT-1, AT-2	récepteurs de l'angiotensine II de types 1 et 2
BH	Bolton-Hunter
$\text{Ca}^{2+}$	calcium
CGRP	peptide relié au gène de la calcitonine
CHO	cellules ovariennes du hamster chinois
COS	cellules SV40 d'origine CV1
CRF	Facteur de relâche de la corticotropine
D-1; D-2	récepteurs de la dopamine de types 1 et 2
DA	dopamine
DAG	diacylglycérol
ELE	élédoisine
FC	fréquence cardiaque
GABA	acide gamma-amino butyrique
GMPc	guanosine monophosphate 3',5'-cyclique
i.c.v.	intracérébroventriculaire
IL	interleukine
$\text{IP}_3$	inositol [1,4,5]-trisphosphate
i.t.	intrathécale
$\text{K}^+$	potassium
kDa	kilodalton

NGF	<i>facteur de croissance nerveux</i>
NK-1; NK-2; NK-3	<i>récepteurs des tachykinines de types 1, 2 et 3</i>
NKA	<i>neurokinine A</i>
NKB	<i>neurokinine B</i>
NMDA	<i>N-méthyl-D-aspartate</i>
NO	<i>oxyde nitreux</i>
NP $\gamma$	<i>neuropeptide gamma</i>
NPK	<i>neuropeptide K</i>
PA	<i>pression artérielle</i>
PAM	<i>pression artérielle moyenne</i>
PGI <sub>2</sub>	<i>prostacycline</i>
PHY	<i>physalaemine</i>
PKC	<i>protéine kinase C</i>
PPT	<i>préprotachykinine</i>
PPSE	<i>potentiel postsynaptique excitateur</i>
PPSI	<i>potentiel postsynaptique inhibiteur</i>
Protéine G	<i>Protéine hétérotrimérique membranaire sensible au nucléotide guanosine</i>
SNC	<i>système nerveux central</i>
SP	<i>substance P</i>
T <sub>x</sub>	<i>segment thoracique x</i>
TNF	<i>facteur de croissance nerveux</i>
TRH	<i>hormone de relâche thyroïdienne</i>

- Les abréviations pour les acides aminés sont conformes avec la nomenclature officielle (Biochem. J. 219: 345-373, 1984)

- Les abréviations des enzymes protéolytiques et des noyaux cérébraux sont énumérés sur les figures 2 et 8 respectivement

## *Remerciements*

*Je me considère excessivement chanceux d'avoir été sous la direction d'un chercheur aussi complet, dévoué, juste et compréhensif que le docteur Couture. Il a su m'offrir un encadrement scientifique riche et rigoureux, en plus de m'apporter une contribution humaine importante, tous deux essentiels à la formation d'un jeune chercheur. Grâce à lui, j'ai maintenant l'impression d'évoluer dans la communauté scientifique mais surtout, d'en faire partie intégrante. Je lui suis donc extrêmement reconnaissant, et ce sera toujours avec beaucoup de fierté que je m'identifierai comme étant étudiant de son laboratoire.*

*Pour toutes ces raisons et bien d'autres, merci Réjean. Ce bagage d'information recueilli pendant les 5 dernières années représente pour moi la pierre angulaire de ma future carrière en recherche.*

*Je tiens aussi à remercier les Drs Gabriel L Plaa, Réginald Nadeau, Thomas A Reader et Pédro D'Orléans-Juste qui ont accomplis un travail impeccable dans la correction et l'évaluation de cette thèse.*

*Les Drs Domenico Regoli et Jacques de Champlain méritent aussi toutes mes éloges pour leurs encouragements ainsi que leurs multiples conseils dans des moments critiques de mon cheminement académique. Ils ont aussi participé comme membres de mon jury d'examen pré-doctoral.*

*Je ne voudrais passer sous silence le généreux appui financier obtenu pendant mon doctorat de la Fondation des Maladies du Coeur du Canada, du Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, du Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome ainsi que de la Faculté des Etudes Supérieures de l'Université de Montréal.*

---



*Je dédicace cette thèse à mes parents qui ont cru en moi et  
m'ont supporté pendant toutes ces années.*

---

*“La meilleure façon de défendre ses idées et ses principes est de les faire connaître.”*

Wilfred Laurier, 1877 (discours)

---

## CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

### 1. Préface

Mise en situation du projet de recherche

Les tachykinines sont des neuropeptides impliqués dans une grande variété de processus biologiques impliquant l'activation de trois récepteurs nommés neurokinine-1 (NK-1), NK-2 et NK-3. Une revue approfondie sur l'anatomie, la biochimie, la pharmacologie et la physiologie de cette famille de peptides est présentée au premier chapitre.

L'étude des tachykinines dans les mécanismes centraux de régulation cardiovasculaire a été un domaine peu étudié jusqu'au début des années 1980. L'administration intracérébroventriculaire (i.c.v.) de substance P (SP) chez le rat éveillé induit un effet vasopresseur et une tachycardie, accompagnés de comportements d'éveil et de vigilance, ainsi qu'une augmentation de l'activité locomotrice et des taux plasmatiques d'oxytocine (Unger et coll., 1979; 1981; 1985). Ces réponses sont similaires à celles observées lors de la réaction de défense de l'animal (Unger et coll., 1988). Chez le rat anesthésié à l'uréthane, des augmentations de pression artérielle et de fréquence cardiaque ont aussi été observées suivant l'administration i.c.v. de tachykinines (Takano et coll., 1990; Hagio et coll., 1991). Ces réponses cardiovasculaires induites par la SP, la neurokinine A (NKA) ou le neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) sont secondaires à une activation sympathosurrénalienne, alors que celles induites par le senktide (agoniste sélectif du récepteur NK-3) sont secondaires à une libération de vasopressine de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Cette thèse a contribué à mieux définir le rôle des trois récepteurs des tachykinines dans les réponses centrales de ces neuropeptides.

Avec l'aide d'antagonistes hautement sélectifs, nous avons étudié le rôle des récepteurs NK-1 et NK-2 dans les réponses centrales (i.c.v.) à la SP et à la NKA chez le rat éveillé (deuxième chapitre). L'antagoniste ( $\pm$ )-CP 96,345 (récepteur NK-1) réduisait sélectivement les réponses cardiovasculaires à la SP sans affecter celles de la NKA, tandis que l'antagoniste R-396 (récepteur NK-2B) diminuait seulement les réponses cardiovasculaires à la NKA. Des effets résiduels significatifs persistaient cependant en

présence de ces antagonistes. En revanche, les antagonistes MEN-10,207 et MEN-10,376 (récepteur NK-2A) se sont avérés inaptes à bloquer les effets de la SP ou de la NKA. Ces résultats suggèrent que la SP agit en partie via l'activation du récepteur NK-1, alors que la NKA agit principalement via l'activation du récepteur NK-2B. Toutefois, les actions non-spécifiques de l'antagoniste ( $\pm$ )-CP 96,345 sur des canaux calciques de type L (Schmidt et coll., 1992; Guard et coll., 1993) et sodique voltage-dépendant (Caeser et coll., 1993) remettent en question les résultats obtenus avec cet antagoniste. Par conséquent, d'autres études ont été réalisées avec un nouvel antagoniste sélectif pour le récepteur NK-1 (RP-67,580) (chapitre 3).

Des antagonistes sélectifs pour les récepteurs NK-1 (RP-67,580), NK-2 (SR-48,968) et NK-3 (R-486) ont été testés contre les effets i.c.v. de la SP, de la NKA et d'un agoniste sélectif du récepteur NK-3, le [MePhe<sup>7</sup>]neurokinine B ([MePhe<sup>7</sup>]NKB), chez le rat éveillé (chapitre 3). Cette étude révèle la faible sélectivité de la SP pour le récepteur NK-1, laquelle peut aussi activer le récepteur NK-2 lorsque le récepteur NK-1 est bloqué. Inversement, la NKA, qui agit principalement sur le récepteur NK-2, stimule le récepteur NK-1 lorsque le récepteur NK-2 est bloqué. Finalement, le [MePhe<sup>7</sup>]NKB induit des réponses cardiovasculaires exclusivement via l'activation du récepteur NK-3. Par conséquent, cette étude démontre la présence fonctionnelle des trois types de récepteurs aux tachykinines dans le système nerveux central du rat.

D'autre part, les effets cardiovasculaires du NP $\gamma$  sont réduits de moitié par un antagoniste du récepteur NK-2 (SR-48,968), alors qu'ils demeurent insensibles aux antagonistes sélectifs pour les récepteurs NK-1 (RP-67,580) ou NK-3 (R-820). De plus, une désensibilisation simultanée des récepteurs NK-1 et NK-2, ou un traitement combiné avec les antagonistes NK-1 et NK-2, ne bloquent pas complètement les réponses cardiovasculaires au NP $\gamma$ . Ces résultats suggèrent que le NP $\gamma$  agit centralement via l'activation du récepteur NK-2 et par l'intermédiaire d'un autre sous-type de récepteur qui demeure à être identifié (chapitre 4).

Une revue générale sur la caractérisation pharmacologique des récepteurs des tachykinines dans le contrôle spinal et supraspinal de l'activité cardiovasculaire, est reprise au cinquième chapitre. L'ordre de puissance des tachykinines i.c.v. pour

engendrer des réponses cardiovasculaires par voie i.c.v. est :  $NPK > NP\gamma > SP > NKA > \text{senktide} = [\text{MePhe}^7]\text{NKB} > \text{NKB}$ . L'action cardiovasculaire des tachykinines ne semble pas d'origine tonique car aucun des antagonistes administrés par la voie i.c.v. n'a d'effets sur les paramètres cardiovasculaires de base de l'animal éveillé. Il semble plus plausible, en revanche, que ces peptides aient un rôle putatif dans certains réflexes cardiovasculaires ou dans certaines situations d'activation centrale du système nerveux sympathique.

Récemment, des études de liaison ont démontré que l'antagoniste sélectif du récepteur AT-1 de l'angiotensine II (AII), le losartan, ainsi que son métabolite actif, le EXP-3174, possèdent une affinité modérée pour le récepteur NK-3 cérébral chez le rat et le cobaye (Chrétien et coll., 1994). Nous avons voulu, à l'aide de notre modèle, confirmer cette interaction entre le losartan, l'EXP-3174 et le récepteur NK-3 des tachykinines. Ainsi, les effets cardiovasculaires et comportementaux de la SP, de la NKA, du  $[\text{MePhe}^7]\text{NKB}$  et de l'AII en présence ou non d'antagonistes sélectifs pour les récepteurs AT-1 (losartan et EXP-3174), AT-2 (PD-123,319) ou NK-3 (R-486) ont été évalués (sixième chapitre). Le losartan et le EXP-3174 (à fortes doses) ont réduit les effets causés par l'administration i.c.v. du  $[\text{MePhe}^7]\text{NKB}$  en plus d'abolir les réponses cardiovasculaires et comportementales centrales de l'AII. Ces antagonistes n'ont pas modifié les réponses causées par la SP ou la NKA. Par ailleurs, en plus d'être inactif contre les effets centraux de l'AII, le PD-123,319 s'est avéré impuissant à modifier les réponses induites par le  $[\text{MePhe}^7]\text{NKB}$  qui ont été bloquées par le R-486. Ces résultats confirment donc l'interaction entre les antagonistes du récepteur AT-1 et le récepteur NK-3 central du rat. De plus, ils permettent de dissocier les effets centraux des tachykinines et de l'AII sur les paramètres mesurés.

Les résultats obtenus dans cette thèse ont soulevé de nouvelles questions fondamentales concernant la pharmacologie et la physiologie des tachykinines. Existe-t-il un récepteur sélectif pour le  $NP\gamma$  différent des trois récepteurs classiques? Nos résultats suggèrent l'existence d'un tel site, mais seul le clonage du récepteur pourra confirmer, hors de tout doute, cette hypothèse. La disparité entre la présence fonctionnelle du récepteur NK-2 dans le cerveau du rat que nous suggérons, et sa quasi-absence immunohistochimique observée par plusieurs équipes (Mantyh et coll.,

1989; Quirion et coll., 1991; Takeda et Krause, 1991; Mussap et coll., 1993), pourraient être le résultat d'une glycosylation différentielle entre les récepteurs NK-2 périphériques et centraux, expliquant ainsi leur différence d'affinité. Des études d'hybridation *in situ* démontrent peu ou pas d'ARNm codant pour le récepteur NK-2 dans le système nerveux central (SNC) du rat (Tsuchida et coll., 1990; Poosch et coll., 1991; Takeda et Krause, 1991). Ces questions fondamentales et plusieurs autres seront adressées dans la dernière partie de cet ouvrage (chapitre 7).

### Neurotransmission *versus* neuromodulation

Le neurotransmetteur est une substance libérée dans la fente synaptique qui agit soit pour exciter, soit pour inhiber la cellule postsynaptique. Il est localisé au niveau des neurones, avec ses enzymes de synthèse et de dégradation et peut être libéré des terminaisons axonales par un mécanisme  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant, sous l'influence de la dépolarisation propagée du potentiel d'action. Le transmetteur agit sur des récepteurs spécifiques au niveau de la jonction postsynaptique et produit une modification dans la conductance des canaux ioniques. Cette action, limitée dans le temps et dans l'espace, affecte une zone restreinte de la membrane. Le résultat est un changement rapide et local, de la perméabilité ionique et de la polarité membranaire.

Un neuromodulateur ne produit pas l'action synaptique que suscite le neurotransmetteur, mais lorsque libéré au voisinage des jonctions, il peut agir sur la neurotransmission. Un neuromodulateur peut être libéré à différents niveaux du neurone : axone, dendrite ou soma, dans des structures synaptiques ou extrasynaptiques. Il peut agir tantôt sur la perméabilité membranaire, tantôt sur les processus membranaires métaboliques. L'action neuromodulatrice serait en général de longue durée, plus tonique et plus prolongée que l'action du neurotransmetteur. Elle est aussi moins localisée, ne provoque pas par elle-même la décharge des neurones, mais la module en exerçant souvent une action permissive. Enfin, sa libération n'est pas nécessairement liée à l'arrivée d'un potentiel d'action (Bloom, 1979). La neuromodulation peut s'exercer à deux niveaux : 1) au niveau présynaptique, où elle exerce une action sur la synthèse, le transport, la recapture ou la libération d'un

neurotransmetteur, et 2) au niveau postsynaptique, où elle peut agir sur des changements d'excitabilité de la cellule cible.

La distinction entre neurotransmission, mécanisme bien délimité, et neuromodulation, processus au contour plus vague, apporte une vision plus moderne de la transmission chimique neuronale. Toutefois, elle n'autorise pas pour autant la séparation entre deux classes de substances qui seraient entièrement différentes, les unes transmettrices, les autres modulatrices. Elle est surtout opérationnelle : tel médiateur agit dans un cas comme transmetteur et dans un autre cas, ou ailleurs, comme modulateur.

Les tachykinines se situent sur cette frontière de la neuromédiation. Malgré la grande diversité des fonctions attribuées aux tachykinines, la règle de base de leur fonctionnement semble fort simple. Ces peptides sont, d'une façon générale, contenus dans les neurones et relâchés suite à une stimulation neuronale qui permettra aux tachykinines d'agir, via l'activation d'un récepteur sur la cellule cible, pour ainsi provoquer une réponse appropriée. Au cours de cet ouvrage, les tachykinines seront traitées comme neuromédiateurs.

## 2. Historique

La découverte de la substance P <sup>(1)</sup> en 1931 par Von Euler et Gaddum marqua le début d'une ère nouvelle en physiologie. Pour la première fois de l'histoire, un peptide a été identifié comme neuromédiateur. Ce premier membre de la famille des tachykinines, isolé à partir du cerveau équin, réduisait la pression artérielle du lapin atropinisé par un mécanisme de vasodilatation périphérique. La caractérisation des fonctions biologiques, la distribution tissulaire ainsi que la purification du nouvel agent ont occupé les chercheurs pendant les 40 années qui ont suivi sa découverte (Franz et coll., 1961a). Ce n'est qu'en 1971 que Chang et coll. ont séquencé cet undécapeptide à partir d'extraits d'hypothalamus de boeuf (tableau 1), ce qui a permis à Tregear et coll. (1971) de le synthétiser par des méthodes de synthèse peptidique conventionnelles.

L'iléon de cobaye isolé a constitué la première préparation sur laquelle l'application de SP entraînait une contraction musculaire insensible aux antagonistes de l'acétylcholine (ACh), de l'histamine ou de la sérotonine (5-HT) (Douglas et coll., 1951; Gaddum, 1953; Pernow, 1953) suggérant une action directe de la SP sur le muscle lisse. Des essais biologiques sur cette préparation ont permis de mesurer les concentrations relatives de SP extraite d'une variété de tissus et d'organes. A partir des activités biologiques et de la distribution tissulaire de la SP, plusieurs hypothèses encore d'actualité quant à son rôle physiologique ont été proposées. Les concentrations élevées de SP dans les parois intestinales et ses activités spasmogènes sur les tissus gastrointestinaux (Von Euler, 1936) suggéraient un rôle pour la SP dans la motilité gastrointestinale. Par ailleurs, l'observation d'une abondance relative de SP dans la corne dorsale de la moelle épinière par rapport aux taux observés dans la corne ventrale (Lembeck, 1953; Pernow, 1953) suggérait que la SP pourrait être un transmetteur des fibres sensorielles (Lembeck, 1953; Lembeck et Zetler, 1962; 1971; Otsuka et coll., 1972). Plus tard, des faits expérimentaux viendront confirmer ces deux hypothèses (voir chapitre 1, sections 5i (d) et 5ii (b)).

---

<sup>1</sup> Originellement, la substance P a été identifiée par P (pour préparation) sur les tracés de kymographes de Von Euler et Gaddum (1931). Le terme substance P est utilisé pour la première fois en 1935 par Gaddum et Schild.



Le terme tachykinine (tachy : préfixe tiré du grec *takhys*, signifiant rapide ; kinine : signifiant action) a pris son origine alors que Erspamer et son équipe isolaient une série de peptides de la peau d'amphibiens et de glandes salivaires de mollusques possédant une séquence d'acides aminés commune en position carboxy-terminale : Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub><sup>(2)</sup> (Erspamer, 1981; tableau 1). Tout comme la SP, ces peptides extraient de la peau de grenouille (physalaemine, phyllomedusine et kassinine) et de glandes salivaires de mollusques (élédoisine) possédaient des activités sialogogues et contractaient rapidement l'iléon de cobaye (Erspamer, 1971). Cette action rapide induite par les tachykinines contraste particulièrement avec l'action lente et retardée de la bradykinine (brady : tiré du grec *bradys*, signifiant lent) sur cette préparation. Cette différence dans la cinétique d'action de ces peptides représentait la base de leur nomenclature respective (Bertaccini, 1976).

Quelques années plus tard, plusieurs équipes ont identifié deux nouveaux peptides chez les mammifères ayant une séquence C-terminale identique à celle de la SP, soit la neurokinine A<sup>(3)</sup> (NKA) et la neurokinine B<sup>(3)</sup> (NKB) (Harmar et coll., 1981; Maggio et coll., 1983; Kimura et coll., 1983; Kangawa et coll., 1983; Minamino et coll., 1984; voir revue Munekada, 1991; tableau 1). Plus récemment, deux autres membres des tachykinines ont été identifiés chez les mammifères, soit le neuropeptide K<sup>(4)</sup> (NPK; Tatemoto et coll., 1985) et le neuropeptide  $\gamma$ <sup>(4)</sup> (NP $\gamma$ ; Kage et coll., 1988) (tableau 1). Ce sont des peptides bioactifs de 36 et 21 acides aminés chacun possédant une réplique de la séquence de la NKA en position C-terminale (Takeda et Krause, 1989a, b). Un nouveau peptide ressemblant à la SP a été identifié dans une ligné cellulaire de carcinome de la thyroïde médullaire du rat (Cremins et coll., 1992). Ce dernier peptide pourrait représenter une nouvelle tachykinine chez les mammifères. Une multitude de

---

<sup>2</sup> Les tachykinines possèdent tous une fonction amide à l'extrémité C-terminale qui est essentielle à leur activité biologique (Sandberg, 1985).

<sup>3</sup> Les termes substance K, neuromédine L et neurokinine  $\alpha$  sont des synonymes de la NKA alors que ceux de neuromédine K et neurokinine  $\beta$  réfèrent à la NKB. NKA et NKB ont été retenues comme nomenclature officielle (Henry, 1987).

<sup>4</sup> Malgré que ces peptides ont été proposés comme neuromédiateurs, il n'existe toujours aucune évidence expérimentale sur leur libération synaptique.

tachykinines issues de Classes d'embranchements inférieurs aux mammifères (amphibiens, insectes, oiseaux, poissons, reptiles, mollusques) ont été ajoutées à cette liste des tachykinines <sup>(5)</sup> toujours grandissante (tableau 1). En fait, une immunoréactivité croisée aux tachykinines est observée dans tout le phylum reliant les coelentérés aux vertébrés, suggérant que les tachykinines sont non seulement les plus anciens neuropeptides ayant été identifiés en science mais aussi dans l'évolution phylogénique (Maggio et Mantyh, 1994).

Aujourd'hui, on attribue un rôle pour les tachykinines dans une multitude de fonctions physiologiques, dont la transmission nociceptive, la sécrétion et la croissance cellulaire, la motilité gastrointestinale, la réaction de défense, le contrôle des voies respiratoires et de l'équilibre hydrosodé, la régulation des fonctions autonomes sympathiques et parasympathiques et donc des fonctions cardiovasculaires. Les tachykinines agissent via l'activation de récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Trois de ces récepteurs aux tachykinines nommés neurokinine-1 <sup>(6)</sup> (NK-1), NK-2 et NK-3 ont été clonés chez plusieurs espèces animales. Leur activation provoque une stimulation de la phospholipase C (PLC) membranaire, conduisant à l'hydrolyse du phosphatidylinositol et à la formation de diacylglycérol (DAG) et d'inositol [1,4,5]-trisphosphate (IP<sub>3</sub>), engendrant une cascade d'événements intracellulaires menant à une élévation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. L'importance de ce système peptidergique dans une variété de pathologies (e.g. arthrite rhumatoïde, asthme, douleur) commence à être dévoilée. Par conséquent, l'étude des tachykinines et de leurs récepteurs dans divers modèles expérimentaux demeure essentielle tant au niveau fondamental que clinique.

---

<sup>5</sup> Chez les mammifères, les tachykinines possèdent une nomenclature additionnelle et distincte, les neurokinines (Jordan et Oheme, 1985).

<sup>6</sup> La nomenclature des tachykinines et de leurs récepteurs a été officiellement adoptée lors d'un symposium tenu à Montréal en 1986 (Henry, 1987).

Tableau 1. Structure des tachykinines

Tachykinine	Structure	Référence
<i>Mammifères</i>		
SP	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Chang et coll., 1971
NKA	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Kimura et coll., 1983
NKA(3-10)	Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Kimura et coll., 1983
NKB	Asp-Met-His-Asp-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Kimura et coll., 1983
NPK	[26 résidus]-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Tatemoto et coll., 1985
NPγ	[11 résidus]-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Kage et coll., 1988
<i>Oiseaux</i>		
SP de poulet	Arg-Pro-Arg-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Conlon et coll., 1988
NKA de poulet	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Conlon et coll., 1988

Suite page suivante

Tableau 1. Structure des tachykinines

Tachykinine	Structure	Référence
<i>Amphibiens</i>		
Physalaemine	pGlu-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Erspamer et coll., 1964
Phyllomedusine	pGlu-Asn-Pro-Asn-Arg-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Anastasi et coll., 1970
Uperoleine	pGlu-Pro-Asp-Pro-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Anastasi et coll., 1975
Kassinine	Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Anastasi et coll., 1977
Lys <sup>5</sup> Thr <sup>6</sup> -physalaemine	pGlu-Ala-Asp-Pro-Lys-Thr-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Nakajima et coll., 1980
Hylambatine	Asp-Pro-Pro-Asp-Pro-Asp-Arg-Phe-Tyr-Gly-Met-Met-NH <sub>2</sub>	Nakajima et coll., 1980
Glu <sup>2</sup> Pro <sup>5</sup> -kassinine	Asp-Glu-Pro-Lys-Pro-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Yasuhara et coll., 1981
Entero-hylambatine	Asp-Pro-Pro-Asn-Pro-Asp-Arg-Phe-Tyr-Gly-Met-Met-NH <sub>2</sub>	Melchiorri et Negri, 1984
Entero-kassinine	Asp-Glu-Pro-Asn-Ser-Asp-Gln-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Melchiorri et Negri, 1984
Peptide ressemblant à la SP	Asp-Ile-Pro-Lys-Pro-Asp-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Melchiorri et Negri, 1984
PG-KI*	pGlu-Pro-His-Pro-Asp-Glu-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Simmaco et coll., 1990

Suite page suivante

Tableau 1. Structure des tachykinines

Tachykinine	Structure	Référence
PG-KII*	pGlu-Pro-Asn-Pro-Asp-Glu-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Simmaco et coll., 1990
PG-KIII*	pGlu-Pro-His-Pro-Asn-Glu-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Simmaco et coll., 1990
PG-SPI*	pGlu-Pro-Asn-Pro-Asp-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Simmaco et coll., 1990
PG-SPII*	pGlu-Pro-Asn-Pro-Asn-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Simmaco et coll., 1990
Ranatachykinine A	Lys-Pro-Ser-Pro-Asp-Arg-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Kozawa et coll., 1991
Ranatachykinine B	Tyr-Lys-Ser-Asp-Ser-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Kozawa et coll., 1991
Ranatachykinine C	His-Asn-Pro-Ala-Ser-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Kozawa et coll., 1991
Ranatachykinine D	Lys-Pro-Asn-Pro-Glu-Arg-Phe-Tyr-Ala-Pro-Met-NH <sub>2</sub>	Kozawa et coll., 1991
Ranakinine	Lys-Pro-Asn-Pro-Glu-Arg-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	O'Harte et coll., 1991
NKB de grenouille	Asp-Met-His-Asp-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	O'Harte et coll., 1991
NKA de grenouille	His-Lys-Leu-Asp-Ser-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Wang et coll., 1992a

Suite page suivante

Tableau 1. Structure des tachykinines

Tachykinine	Structure	Référence
<i>Insectes</i>		
Locutatachykinine I	Gly-Pro-Ser-Gly-Phe-Tyr-Gly-Val-Arg-NH <sub>2</sub>	Schoofs et coll., 1990a
Locutatachykinine II	Ala-Pro-Leu-Ser-Gly-Phe-Tyr-Gly-Val-Arg-NH <sub>2</sub>	Schoofs et coll., 1990a
Locutatachykinine III	Ala-Pro-Gln-Ala-Gly-Phe-Tyr-Gly-Val-Arg-NH <sub>2</sub>	Schoofs et coll., 1990b
Locutatachykinine IV	Ala-Pro-Ser-Leu-Gly-Phe-His-Gly-Val-Arg-NH <sub>2</sub>	Schoofs et coll., 1990b
Sialokinine I	Asn-Thr-Gly-Asp-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Champagne et Ribeiro, 1994
Sialokinine II	Asp-Thr-Gly-Asp-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Champagne et Ribeiro, 1994
<i>Reptiles</i>		
SP d'alligator	Arg-Pro-Arg-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Wang et coll., 1992b
NP $\gamma$ d'alligator	[11 résidus]-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Wang et coll., 1992b
NKA d'alligator	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Wang et coll., 1992b

Suite page suivante

Tableau 1. Structure des tachykinines

Tachykinine	Structure	Référence
<i>Mollusques</i>		
Eledoisine	pGlu-Pro-Ser-Lys-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Erspamer et Anastasi, 1962
<i>Poissons</i>		
Scyliorhinine I	Ala-Lys-Phe-Asp-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Conlon et coll., 1986
Scyliorhinine II	[8 résidus]-Asp-Gly-Pro-Asp-Cys-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Conlon et coll., 1986
Des[Ser <sup>1</sup> Pro <sup>2</sup> ]Scyliorhinine II	[6 résidus]-Asp-Gly-Pro-Asp-Cys-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Conlon et Thim, 1988
Carassine	[11 résidus]-His-Lys-Ile-Asn-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Conlon et coll., 1991
SP de truite	Lys-Pro-Arg-Pro-His-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Jensen et Conlon, 1992
SP de morue	Lys-Pro-Arg-Pro-Gln-Gln-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Jensen et Conlon, 1992
NKA de morue / truite	His-Lys-Ile-Asn-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Jensen et Conlon, 1992
SP de rousette	Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Waugh et coll., 1993

Suite page suivante

Tableau 1. Structure des tachykinines

Tachykinine	Structure	Référence
NKA de raie	His-Lys-Leu-Gly-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Waugh et coll., 1993
His <sup>3</sup> -Scylliorhinine I	Ala-Lys-His-Asp-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Waugh et coll., 1993
SP de raie	His-Lys-His-Asp-Lys-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Waugh et coll., 1994
SP de lamproie	Arg-Lys-Pro-His-Pro-Lys-Glu-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	Waugh et coll., 1994
Séquence canonique des tachykinines	-PHE- X -GLY-LEU-MET-NH <sub>2</sub>	

Sauf pour la SP, la NKA, la NKB, le NPK et le NPγ, la nomenclature de toutes les autres tachykinines origine du Genre où le peptide a été isolé pour la première fois (e.g. physalaemine, *Physalaemus fuscumaculatus*; eledoisine, *Eledone moschata*; kassinine, *Kassina senegalensis*).

\* PG-K et PG-SP : peptides de *Pseudophyrine gäntheri* ressemblant à la kassinine et à la substance P respectivement.



### 3. Aspects moléculaires et cellulaires des tachykinines

On s'accorde pour conférer aux neuropeptides un rôle de médiateur différent des médiateurs de type acides aminés, bioamines et composés puriques sur la base des propriétés suivantes : les neuropeptides ont une taille beaucoup plus grande; leur concentration dans le cerveau est de l'ordre du femtomole au picomole par gramme de tissus, alors que celle des acides aminés et bioamines est beaucoup plus élevée; ils sont formés par clivage de peptides précurseurs, synthétisés à partir d'acide ribonucléique messenger (ARNm); ils ne subissent pas de recapture; ils sont souvent associés soit à d'autres peptides, soit à des amines, soit à des acides aminés, jouant ainsi le rôle de co-transmetteurs; ils sont souvent libérés à distance de leur point d'action et de leur récepteur, et agissent dans ce cas, comme des "neurohormones"; le coût énergétique lié à la synthèse peptidique dépasse de beaucoup celle des amines bioactifs. Cette dernière distinction des peptides est d'autant plus importante par le fait que les neuromédiateurs de faible poids moléculaire sont récupérés par recapture ou par traitement enzymatique alors que les neuropeptides sont entièrement dégradés. L'investissement énergétique considérable lié à la neuromédiation peptidique suggère un mode de communication plus spécifique et plus modéré que celui des neurotransmetteurs classiques. D'autre part, la synthèse des neuropeptides devient plus complexe et offre plus de possibilités grâce à la machinerie nucléaire d'épissage alternatif, qui permet d'obtenir plusieurs variantes d'un neuropeptide issu d'un même gène. Tous ces éléments de distinction entre neuropeptides et neurotransmetteurs classiques sont essentiels à la bonne compréhension du système de transmission tachykininergique.

Cette section décrit d'une façon sommaire les connaissances actuelles du système tachykininergique tant au niveau cellulaire que moléculaire.

### i) Gènes et précurseurs des tachykinines

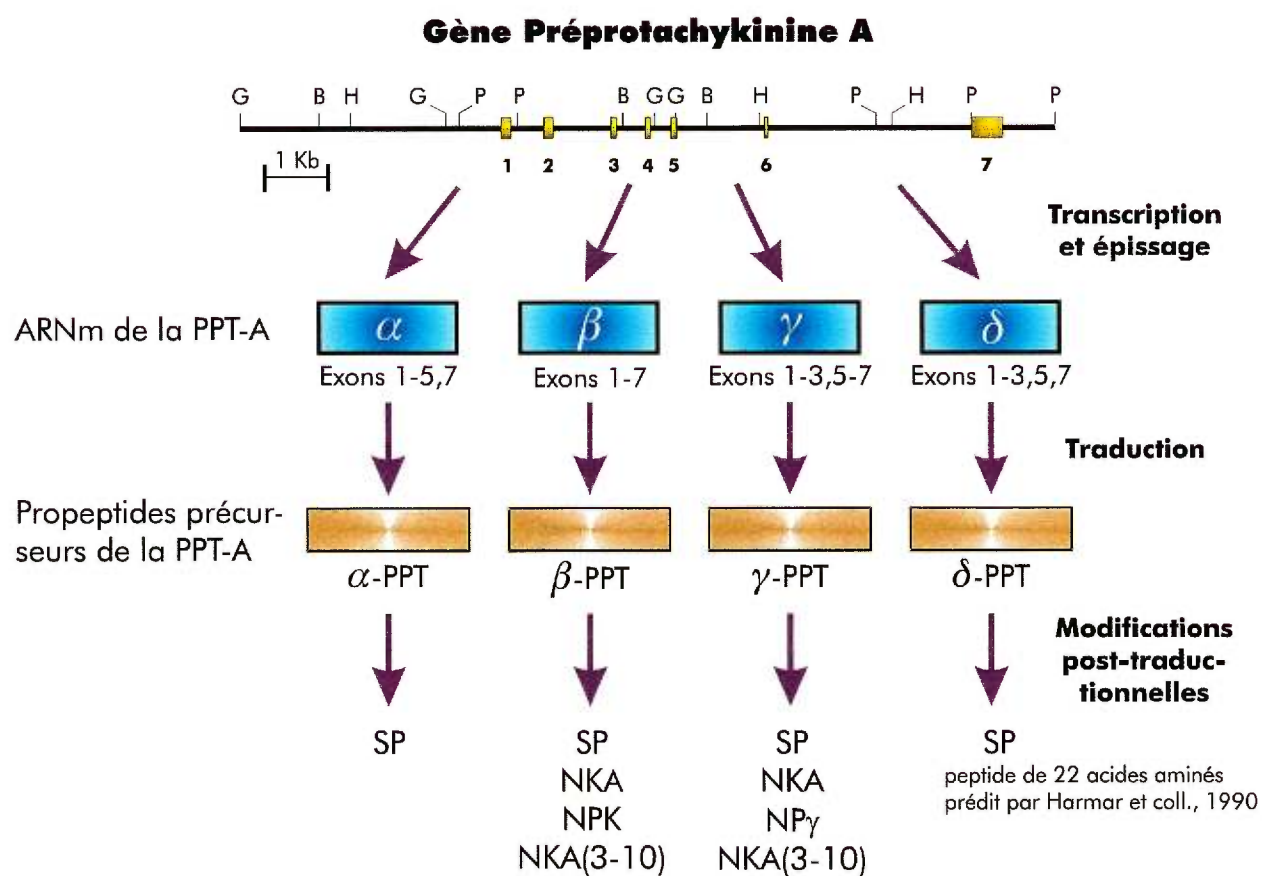
Les tachykinines présentes chez les mammifères sont issues de deux gènes nommés préprotachykinines-A (PPT-A) et PPT-B ayant évolués à partir d'un même gène ancestral par duplication (Kotani et coll., 1986; Kawagushi et coll., 1986). Le gène PPT-A code pour la SP, la NKA ainsi que pour les deux formes allongées de la NKA, soit le NPK et le NP $\gamma$ , alors que le gène PPT-B code exclusivement pour la NKB (Nakanishi, 1987) (figure 1).

Lors de la transcription de l'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) en ARNm, le transcrit du gène PPT-A contenant 7 exons peut subir un épissage alternatif et ainsi générer au moins 4 types d'ARNm, soit les formes  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -PPT-A chez le rat <sup>(7)</sup> (figure 1). Alors que tous ces précurseurs possèdent la séquence de la SP, le transcrit  $\beta$ -PPT-A détient, en plus, les séquences de la NKA, de la NKA(3-10) et du NPK, le transcrit  $\gamma$ -PPT-A peut générer la NKA, la NKA(3-10) et le NP $\gamma$  (Nakanishi, 1987), alors que l'ARNm  $\delta$ -PPT-A pourrait générer une nouvelle tachykinine de 22 acides aminés tel que prédit par Harmar et coll. (1990).

Le mécanisme d'épissage alternatif découvert par Berget et coll. (1977) était relativement bien décrit d'un point de vue enzymologique. Toutefois, d'un point de vue pratique, on ne comprenait pas le besoin biologique d'une telle modification post-transcriptionnelle (Berget et coll., 1977; Chow et coll., 1977). Il est clair que l'épissage alternatif du gène PPT-A permet une distribution distincte et précise des différentes tachykinines à travers l'organisme. Il a été démontré que ce mécanisme de maturation post-transcriptionnel est régulé d'une façon tissu-spécifique et entraîne des concentrations relatives de SP et de NKA propres à chaque tissu (Carter et Krause, 1990). En périphérie chez le rat, les quantités relatives des transcrits  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -PPT-A sont de <1%, 80% et 20%, respectivement (Carter et Krause, 1990). Toutefois, dans le SNC du rat, l'ARNm  $\gamma$ -PPT-A représente 80%, la forme  $\beta$ -PPT-A correspond à 20% alors

---

<sup>7</sup> Les structures humaines des ARNm issus des gènes des tachykinines ressemblent aux structures du rat (Harmar et coll., 1986; Bonner et coll., 1987; Krause et coll., 1987; Carter et Krause, 1990).



**Gène Préprotachykinine B**

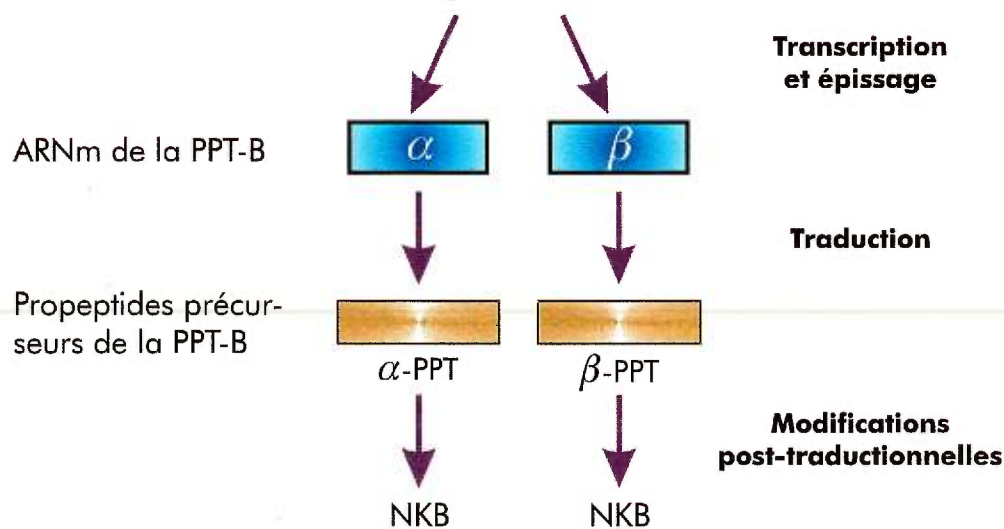


Figure 1. Gènes et précurseurs des tachykinines (Modifié de Helke et coll., 1990)

**Figure 1.** Structures schématiques de la biologie moléculaire des tachykinines chez les mammifères. Lorsque exprimés, les gènes préprotachykinine A (PPT-A) et PPT-B sont transcrits puis épissés en acides ribonucléiques messagers (ARNm), sous les formes  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -PPT-A et  $\alpha$ - et  $\beta$ -PPT-B. Par la suite, ces transcrits sont traduits en propeptides précurseurs du même nom pour finalement subir des modifications post-traductionnelles donnant naissance aux formes actives des tachykinines. Alors que toutes les formes d'ARNm de la PPT-A synthétisent de la substance P (SP), le transcrit  $\beta$ -PPT-A génère la neurokinine A (NKA), la NKA(3-10) et le neuropeptide K (NPK). Le transcrit  $\gamma$ -PPT-A code pour la NKA, le fragment NKA(3-10) et le neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ). La forme  $\delta$ -PPT-A possède aussi, théoriquement (selon Harmar et coll., 1990) la séquence pour une nouvelle tachykinine de 22 acides aminés. Les précurseurs issus de la transcription et de la traduction du gène PPT-B codent exclusivement pour la neurokinine B (NKB).

que le transcrit  $\alpha$ -PPT-A demeure très faiblement représenté avec moins de 1% du total (Krause et coll., 1987; Carter et Krause, 1990). La proportion relative d'expression des trois principales isoformes d'ARNm issues du gène PPT-A dépend aussi de l'espèce. Ainsi, le transcrit  $\alpha$ -PPT-A est majoritaire chez le boeuf (Nawa et coll., 1984).

Par ailleurs, les fragments de la NKA : NKA(3-10) et NKA(4-10), se retrouvent en grande quantité dans certaines tumeurs (Theodorsson-Norheim et coll., 1987) sans toutefois, que l'on connaisse leur origine exacte. Ces fragments très peu décrits dans la littérature peuvent être directement synthétisés des ARNm  $\beta$ - ou  $\gamma$ -PPT-A ou encore issus d'une dégradation massive de NKA. Leurs rôles demeurent inconnus et demandent à être étudiés davantage. De plus, une forme allongée de la SP a aussi été décrite dans le liquide céphalorachidien humain et dans la moelle épinière du rat (Brodin et coll., 1986; Toresson et coll., 1988). Celle-ci pourrait originer des transcrits  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -PPT-A.

L'expression génique des PPT en réponse à des signaux extracellulaires, commence à être dévoilée. La compréhension de ces mécanismes régulateurs moléculaires devient cruciale dans la détermination des fonctions et de l'identité neuronale.

## ii) Régulation de l'expression des gènes préprotachykinines

L'effet régulateur de plusieurs cytokines et transmetteurs a été mis en évidence sur l'expression des gènes PPT. A l'instar du facteur de croissance nerveux (NGF), la dopamine (DA), le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), l'interleukine-1 (IL-1) et les glucocorticoïdes se sont avérés de puissants stimulants de l'expression du gène de la PPT (Lindsay et Harmar, 1989; Bannon et coll., 1991; Jonakait et coll., 1991; Smith et coll., 1991; Kessler et coll., 1993; Vedder et coll., 1993; Voorn et coll., 1994). La régulation de l'expression génique des tachykinines (surtout du gène PPT-A) a été étudiée principalement dans deux modèles : 1) dans les neurones nigrostriés du rat où

la DA joue un rôle important, et 2) dans les ganglions sympathiques du rat où le NGF et l'IL-1 démontrent un effet stimulateur substantiel.

a) Effet stimulateur de la dopamine sur l'expression du gène préprotachykinine

Le taux de transcription de la PPT-A nigrostriée est accentué par un traitement à la métamphétamine (Bannon et coll., 1991), à la sérotonine (5-HT) (Walker et coll., 1991), à la corticostérone (Chao et McEwen, 1991), au tétrahydrocannabinol (Mailleux et Vanderhaeghen, 1994), suivant une stimulation des neurones de l'hippocampe (Brene et coll., 1993) ou suite à une ischémie cérébrale (Salin et Chesselet, 1992). Inversement, chez le Parkinsonien ou suite à un traitement à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), ou avec des antagonistes sélectifs pour les récepteurs D-1 ou D-2 de la DA ou avec de la N-méthyl-D-aspartate (NMDA; Sommers et Beckstead, 1992), les niveaux d'expression de la PPT intra-nigrostriée chutent substantiellement (Clevers et Beal, 1989; Bannon et coll., 1991; Srinivasan et coll., 1991; Nisenbaum et coll., 1994; Campbell et Björklund, 1995). D'une façon intéressante, la chute de PPT-A observée dans le striatum suite à une lésion chimique à la 6-OHDA, revient à ses niveaux de base, 12 mois suivant une greffe locale de neurones dopaminergiques (Mendez et coll., 1993), suggérant que la DA module positivement la synthèse de SP à ce niveau. Par ailleurs, les niveaux de PPT-A demeurent inchangés par l'administration locale d'agonistes sélectifs pour les récepteurs NK-1, NK-2 ou NK-3 des tachykinines (Humpel et Saria, 1993). L'interaction complexe existant entre les tachykinines et la dopamine dans les noyaux gris centraux sera revue dans la section traitant du comportement (chapitre 1, section 5i (c)).

b) Effets des cytokines sur l'expression du gène préprotachykinine

Le facteur de croissance nerveux (NGF) est une molécule trophique essentielle à la survie des neurones sympathiques et sensorielles au cours de l'ontogénèse du rat (Thoenen et Barde, 1980). La diminution de l'immunoréactivité à la SP suivant une

section du nerf sciatique chez le rat était renversée par l'application locale de NGF (Fitzgerald et coll., 1985). De plus, en présence de NGF, on a observé des augmentations de l'expression des ARNm pour les précurseurs de la SP et du CGRP dans des cultures neuronales du ganglion de la racine dorsale de la moelle épinière du rat (Lindsay et Harmar, 1989). Ces auteurs proposaient alors qu'un apport rétrograde constant de NGF, provenant des cellules cibles, serait requis pour conserver un niveau de base de neuromédiateur peptidique dans les neurones sensoriels matures. Pour sa part, l'IL-1 stimule la synthèse de la SP dans les plexus myentériques (Hurst et coll., 1993), dans le ganglion cervical supérieur (Jonakait et coll., 1991; Shadiack et coll., 1994), ainsi que dans d'autres neurones du système nerveux sympathique (Kessler et coll., 1993). Ces effets stimulants de l'IL-1 sur l'expression génique de la SP dans les ganglions sympathiques sont inhibés par des agents dépolarisants, l'interféron gamma, les glucocorticoides ou les inhibiteurs de la cyclooxygénase (Hart et coll., 1991). Ces mécanismes de régulation de l'expression du gène de la PPT semblent relier la SP à une fonction réparatrice, au niveau des ganglions sympathiques endommagés (voir chapitre 1, section 5ii (a)).

### c) Éléments régulateurs *cis* sur le gène préprotachykinine-A

Plusieurs éléments régulateurs *cis* ont été identifiés dans les régions 5' et 3' du site d'initiation de transcription du gène PPT-A dont des régions sensibles à l'AMPc (Kageyama et coll., 1991; Morrison et coll., 1994), deux séquences sensibles au NGF (Gilchrist et coll., 1991) et un élément commun avec un des éléments de la région promotrice du canal sodique de type II (qui n'a pas été identifié) liant une protéine de 40 kDa (élément *trans*) dans le SNC du rat (Quinn et McAllister, 1993). On dénombre aussi deux éléments riches en guanine de part et d'autre du site d'initiation de la transcription qui pourraient réguler la structure de la chromatine (Clark et coll., 1990) ou être reliés aux effets du facteur de croissance épidermique (Bachwich et coll., 1992). Plusieurs autres éléments ont été identifiés, dans la région promotrice du gène PPT-A, sans toutefois que leur fonction ne soit connue (Mendelson et Quinn, 1993).

Chez les mammifères, les tachykinines possèdent donc une grande diversité, grâce à une variété de mécanismes cellulaires, dont la duplication génétique, l'expression différentielle et l'épissage alternatif des ARNm.

### iii) Biosynthèse, entreposage et transport axonal des tachykinines

La biosynthèse de la SP a été examinée en incubant une préparation de cellules ganglionnaires de la racine dorsale du rat avec de la [<sup>35</sup>S]méthionine et de la [<sup>3</sup>H]proline. En suivant l'incorporation de ces acides aminés marqués, Harmar et coll. (1980; 1981) ont démontré que la synthèse de la SP était sensible aux inhibiteurs de la synthèse protéique (cycloheximide, anisomycine) suggérant un mécanisme conventionnel de synthèse protéique par ribosome pour ce peptide.

Les précurseurs peptidiques des tachykinines subissent une maturation post-transcriptionnelle via l'activation d'un enzyme ("peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygénase") qui coupe le pro-peptide au niveau du résidu glycine en position C-terminale tout en gardant une fonction amide sur la protéine mature (Marchand et coll., 1990; Eipper et coll., 1992).

Les terminaisons nerveuses tachykininergiques contiennent des petites vésicules claires ainsi que de grandes vésicules granuleuses (Difiglia et coll., 1982a; Ribeiro-Da-Sylva et coll., 1989). Des études immunohistochimiques tendent à suggérer que les tachykinines sont emmagasinées surtout dans les grandes vésicules synaptiques granuleuses ayant un diamètre d'environ 100 nm<sup>(8)</sup> (Barber et coll., 1979; Hökfelt et coll., 1980; Difiglia et coll., 1982a; 1982b; Floor et coll., 1982; Matthews et coll., 1987; Ribeiro-Da-Sylva et coll., 1989), alors que les petites vésicules de 50 nm contiennent plutôt des neurotransmetteurs classiques (Floor et coll., 1982).

Pour arriver à la terminaison nerveuse, les tachykinines synthétisées dans le corps cellulaire, utilisent le transport axonal direct. Le corps cellulaire des fibres

---

<sup>8</sup> L'équipe de Floor (1982) a estimé le diamètre des vésicules contenant la SP, provenant d'une préparation médullaire de rat, à 117 nm.



sensorielles de type C, localisé dans les ganglions de la racine dorsale, synthétise de grandes quantités de SP et l'emmagasine dans des vésicules de transport axonal (Cuello et coll., 1977; Floor et coll., 1982) permettant ainsi aux tachykinines de voyager vers les terminaisons synaptiques en empruntant le transport axonal rapide (300 et 400 mm/jour). Curieusement, l'embranchement périphérique de ces fibres reçoit 80% de la SP synthétisée (Brimijoin et coll., 1980) alors que l'embranchement central ne reçoit que 20% de ce peptide chez le rat (Takahashi et Otsuka, 1975; Harmar et Keen, 1982). Cette distinction importante peut s'expliquer par une plus grande demande de neuromédiateurs sensoriels en périphérie due à la longueur de l'axone et à une distribution plus large de l'innervation périphérique (Harmar et Keen, 1982)

#### iv) Relâche des tachykinines

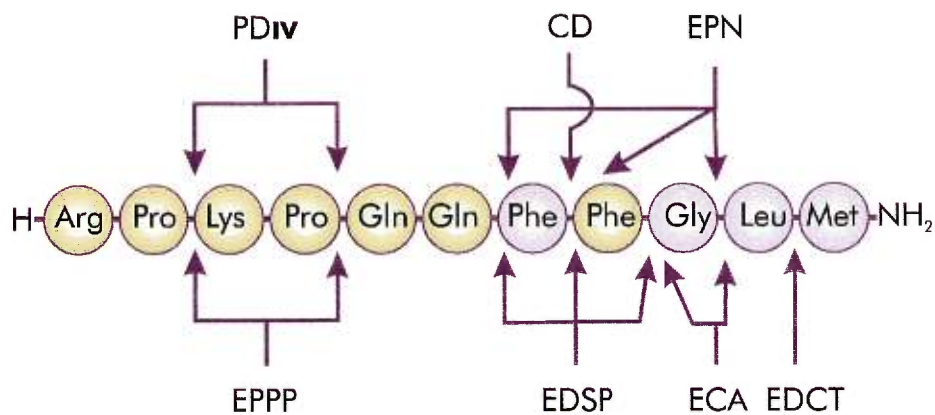
Les neuromédiateurs classiques contenus dans les petites vésicules sont relâchés à de faibles fréquences de stimulation contrairement aux neuromédiateurs peptidiques qui sont relâchés à des fréquences plus élevées (Bartfai et coll., 1988; Iverfeldt et coll., 1989).

La relâche de la SP à partir des neurones du ganglion de la racine dorsale suivant l'application de fortes concentrations de  $K^+$  est bloquée par un antagoniste des canaux calciques de type dihydropyridine et facilitée par un traitement à la BAY K 8644 (agoniste du canal calcique), suggérant une implication des canaux calciques de type L dans le mécanisme de relâche de la SP (Perney et coll., 1986; Rane et coll., 1987; Holz et coll., 1988). Au contraire, la relâche de la norépinéphrine et de plusieurs autres neuromédiateurs à faibles poids moléculaires est insensible à ces bloqueurs calciques (Ogura et Takahashi, 1984; Perney et coll., 1986; Miller, 1987). Par ailleurs, la norépinéphrine et le GABA, qui inhibent les courants calciques des neurones ganglionnaires de la racine dorsale chez le poulet (Dunlap et Fischbach, 1981), bloquent aussi la relâche de la SP de ces cellules (Fischbach et coll., 1981; Holz et coll., 1989). Inversement, l'endothéline semble stimuler la relâche de la SP des neurones de la racine dorsale via l'activation des canaux calciques de type L (Yoshizawa et coll., 1989). Une

autre étude a démontré que la libération de SP, suivant une stimulation électrique des neurones du ganglion de la racine dorsale, n'était pas affectée par la nifédipine (antagoniste des canaux calciques de type L) mais plutôt par la  $\omega$ -conotoxine (Holz et coll., 1988), qui est un bloqueur non spécifique des canaux calciques de type L et N (McCleskey et coll., 1987). Par conséquent, la relâche de SP résulterait d'une entrée de calcium par les canaux de type L ou N, ou des deux canaux, dépendant des conditions expérimentales (Holz et coll., 1988). Quoiqu'il en soit, la relâche de SP des terminaisons nerveuses est un mécanisme  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant.

#### v) Métabolisme des tachykinines

Les tachykinines sont des substrats de plusieurs enzymes protéolitiques. Les principaux enzymes impliqués dans la dégradation des tachykinines sont décrits à la figure 2 et incluent l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA; EC 3.4.15.1), l'endopeptidase neutre (EPN; EC 3.4.24.11), l'enzyme de dégradation de la SP (EDSP; EC 3.4.24.non déterminé), la peptidase amino-dipeptidyl IV (PDIV; EC 3.4.14.5), l'endopeptidase postproline (EPPP; EC 3.4.21.26), l'aminopeptidase M (AmM; EC 3.4.11.2) et la cathepsin D (CD; EC 3.4.3.23). Suite à leur relâche par la terminaison nerveuse, les tachykinines hydrophiles demeurent dans l'espace extracellulaire et sont donc soumises à l'action des peptidases dans ce milieu. Ceci explique pourquoi l'EPN et l'ECA, qui sont des enzymes membranaires, sont les plus efficaces dans des études *in vivo* ou dans des préparations d'organes isolés alors qu'ils perdent cet avantage dans des homogénats de tissus (Regoli et coll., 1994a). La SP et la NKA ont un métabolisme distinct. D'une part, la SP est inactivée par l'EPN, l'ECA (Couture et Regoli, 1981), le PDIV et l'AmM, et d'autre part, la NKA est uniquement dégradée par l'EPN et l'AmM (Wang et coll., 1994). La résistance de la NKA à l'ECA et à la PDIV lui confère une demie-vie plasmatique prolongée (Hooper et Turner, 1987; Wang et coll., 1991). L'AmM plasmatique ne désactive pas la NKA mais forme le métabolite actif NKA(4-10) (Wang et coll., 1994) qui est un agoniste sélectif pour le récepteur NK-2 (Regoli et coll., 1994b). La dégradation plasmatique lente de la NKA dépend donc des faibles niveaux



- CD : cathepsine D
- ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine
- EDCT : enzyme de dégradation carboxy-terminale
- EDSP : enzyme de dégradation de la substance P
- EPN : endopeptidase neutre
- EPPP : endopeptidase postproline
- PDIV : peptidase amino-dipeptidyl IV

Figure 2. Métabolisme de la substance P (Modifié de Mussap et coll., 1993)  
Représentation schématique des sites de dégradation de la substance P (SP) suivant l'action enzymatique de la CD, l'ECA, l'EDCT, l'EDSP et de la PDIV. L'aminopeptidase M a été omise de cette figure car cet enzyme ne clive que les fragments de dégradation de la SP (voir figure 3).

d'EPN plasmatiques et endothéliaux et possiblement d'autres enzymes non-identifiés. L'inactivation de la SP par le plasma, l'endothélium et la musculature vasculaire est représentée à la figure 3.

L'endopeptidase neutre semble impliquée dans le métabolisme des tachykinines dans le cerveau (Matsas et coll., 1985; Hooper et Turner, 1987), la moelle épinière (Sakurada et coll., 1990), et les tissus périphériques : intestins (Nau et coll., 1986), bronches et reins (Kenny et coll., 1987; Sale et coll., 1991), muscles lisses et autres cellules (voir revue de Roques et coll., 1993; Gao et Rubinstein, 1995). La distribution de cet ectoenzyme sensible au phosphoramidon et au thiorphan, a été déterminée par immunohistochimie, et par immunoautoradiographie dans le SNC du rat. Ce metalloenzyme membranaire, qui dégrade aussi les enképhalines, se retrouve en grande quantité dans les régions riches en SP et en enképhalines, tel que le noyau caudé du putamen et les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (Matsas et coll., 1985; Waksman et coll., 1986; Pollard et coll., 1989). Toutefois, dans certaines régions du SNC, un "mismatch" a été observé entre les niveaux d'EPN et ceux des tachykinines (Pollard et coll., 1989).

Possédant une sélectivité remarquable pour la SP, l'EDSP a été identifié chez le rat et l'humain (Lee et coll., 1981; Laüfer et coll., 1985a). Des études de localisation par immunohistochimie démontrent une ressemblance étroite entre les taux de EDSP et les concentrations de SP, ce qui suggère une fonction spécifique de cet enzyme dans le métabolisme de la SP (Probert et Hanley, 1987). Cet enzyme insensible au phosphoramidon, est retrouvé principalement dans les cellules gliales normales et tumorales du rat (Endo et coll., 1989a; b). Par ailleurs, deux activités distinctes de dégradation de la SP ont été observées dans le liquide céphalorachidien humain, soit une activité de lyse des liens peptidiques Phe<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup> et Phe<sup>8</sup>-Gly<sup>9</sup>, probablement résultant de l'action de l'EDSP et EPPP qui produit les fragments SP(3-11) et SP(5-11) (Nyberg et coll., 1987; Taneko et al., 1994). Dans le SNC, l'ECA et la EPPP ont été détectés dans le liquide céphalorachidien (Lantz et coll., 1991; Taneko et al., 1994) et dans la substance noire du rat (Oblin et coll., 1989) et pourraient donc participer à la

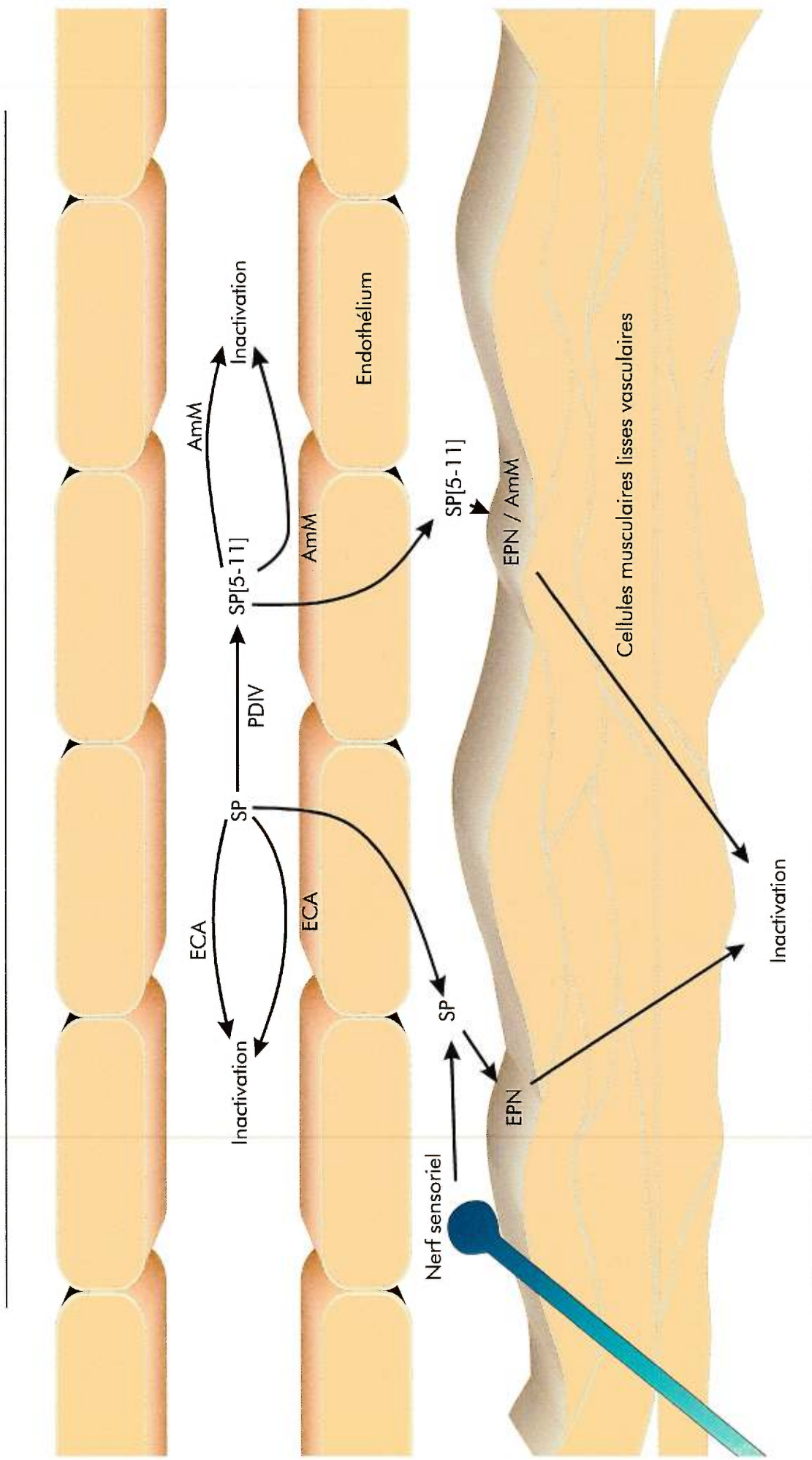


Figure 3. Voies proposées du métabolisme de la substance P (SP) dans la vasculature (Tiré de Wang et coll., 1994)

*Figure 3.* La principale voie d'inactivation de la substance P (SP) plasmatique est l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) circulant et lié à la membrane de l'endothélium vasculaire. Dans cet environnement, la SP est aussi sensible à la peptidase amino-dipeptidyl IV (PDIv) qui entrainera la formation du fragment actif SP(5-11). A l'instar de la SP, ce fragment est inactivé par un enzyme présent en circulation et sur la membrane plasmique de l'endothélium, soit l'aminopeptidase M (AmM). Tout comme la SP libérée dans le tissu vasculaire par les afférences sensorielles, la SP et le fragment SP(5-11) qui échappent à la lumière vasculaire vers le tissu vasculaire seront inactivés par l'action de l'endopeptidase neutre (EPN) et de l'AmM.

---

dégradation de la SP ainsi qu'au métabolisme des fragments issus de l'action de l'EPN centrale (Oblin et coll., 1989).

Tout comme l'EPN, l'ECA joue un rôle important dans l'inactivation des tachykinines pulmonaires. Chez le cobaye, l'augmentation de résistance bronchiale suivant l'administration par aérosol de SP est augmenté par le phosphoramidon (Suzuki et coll., 1992) alors que l'effet vasodilatateur sur la vasculature pulmonaire induit par l'injection intraveineuse de SP est augmenté en présence de captopril (Subissi et coll., 1990). Par conséquent, il semble que l'EPN dégrade préférentiellement les tachykinines dans l'épithélium pulmonaire alors que l'ECA se retrouve majoritaire dans la vasculature pulmonaire.

#### vi) Coexistence des tachykinines avec d'autres neuromédiateurs

Vers la fin des années '70, plusieurs équipes ont démontré la coexistence de la SP et de la 5-HT dans les projections descendantes du raphé innervant la moelle épinière (Chan-Palay et coll., 1978; Hökfelt et coll., 1978; Potter et coll., 1981). La mise en évidence de plusieurs médiateurs dans le même neurone est venu révolutionner un dogme de la neurotransmission chimique voulant qu'un neurone ne puisse fabriquer qu'un seul neuromédiateur <sup>(9)</sup>.

Le raphé et plusieurs autres noyaux du bulbe ventral projettent à la corne ventrale, à la colonne intermédiolatérale et à la corne dorsale de la moelle épinière (Kuypers et Maisky, 1975; Leichnetz et coll., 1978; Martin et coll., 1978; Watkins et coll., 1980; Sasek et coll., 1990). Quatre-vingt cinq pourcent des fibres du raphé contiennent de la 5-HT chez le chat et le rat (Bowker et coll., 1982; Chiba et Masuko, 1989) alors que 55% de ces neurones contiennent de la SP chez le rat (Bowker et coll., 1983). Par la suite, Sasek et coll. (1990) ont démontré que la plupart de ces fibres immunoréactives à

---

<sup>9</sup> A cet égard le *principe de Dale* (1935) a été mal cité. En réalité, ce principe qui référerait aux fibres sensorielles de type C, n'excluait pas la multiplicité des médiateurs, mais suggérait tout simplement que le même médiateur devait être libéré à la fois des terminaisons sensitives centrales et des extrémités dendritiques périphériques.



la SP étaient aussi immunoréactives à l'hormone de relâche thyroïdienne (TRH) et à l'enzyme de synthèse de la 5-HT. Toutefois, chez l'homme et le cobaye, on observe moins de 30% de colocalisation 5-HT/SP (Chiba et coll., 1989; Halliday et coll., 1988). De plus, on observe une interaction fonctionnelle croisée entre ces deux neuromédiateurs, d'une part, la sérotonine potentialise la relâche de la SP induite par l'administration de  $K^+$  dans la corne ventrale de la moelle épinière chez le rat (Iverfeldt et coll., 1986), et d'autre part, la SP stimule une relâche de 5-HT lorsque administrée dans la moelle épinière chez le rat (Mitchell et coll., 1981; Tsai et coll., 1984). La signification fonctionnelle de cette coexistence demeure toutefois mal comprise.

On observe presque invariablement une co-existence SP/NKA dans les ganglions sensoriels de la racine dorsale et dans le nerf du trijumeaux chez les mammifères (Cameron et coll., 1988; Hua et coll., 1985; Helke et Niederer, 1990). Cette co-localisation est consistante avec l'expression prédominante des ARNm de types  $\beta$ - et  $\gamma$ -PPT-A dans le SNC du rat qui codent pour la SP et la NKA (Krause et coll., 1987).

Dans la corne dorsale de la moelle épinière, l'immunoréactivité à la SP est associée aux grandes vésicules et est colocalisée avec le glutamate dans les terminaisons synaptiques des afférences sensibles (Battaglia et Rustioni, 1988; DeBiasi et Rustioni, 1988; Merighi et coll., 1991). Cette co-localisation glutamate/SP suggère un synergisme possible entre les potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) lents induits par la SP (Nowak et MacDonald, 1982; DeKoninck et Henry, 1991) et les PPSE rapides produits par le glutamate (Jessell et coll., 1986; Yoshimura et Jessell, 1989; voir chapitre 1, section 5i (d)). Ces neurones sensoriels contiennent également le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP) et la galanine (Maggi, 1995).

Plusieurs études démontrent une co-localisation entre la SP et d'autres neuromédiateurs ou enzymes de synthèse d'amines bioactifs, tant au niveau central que périphérique. A titre d'exemple, citons l'acétylcholine (Furness et coll., 1984; Vincent et coll., 1983), le GABA (Kosaka et coll., 1988; Murakami et coll., 1989a; Penny et coll., 1986; Pourcho et Goebel, 1988), le phényléthanolamine-N-méthyltransférase (Lorenz et coll., 1985), la somatostatine (Murakami et coll., 1989b), la bombésine (Cameron et coll.,



1988), les enképhalines (Tashiro et coll., 1989), la dynorphine (Anderson et Reiner, 1990), le facteur de relâche de la corticotropine (Crawley et coll., 1985) et le CGRP (Lee et coll., 1985a; b; Skofitsch et Jacobowitz, 1985; Stjärne et coll., 1989).

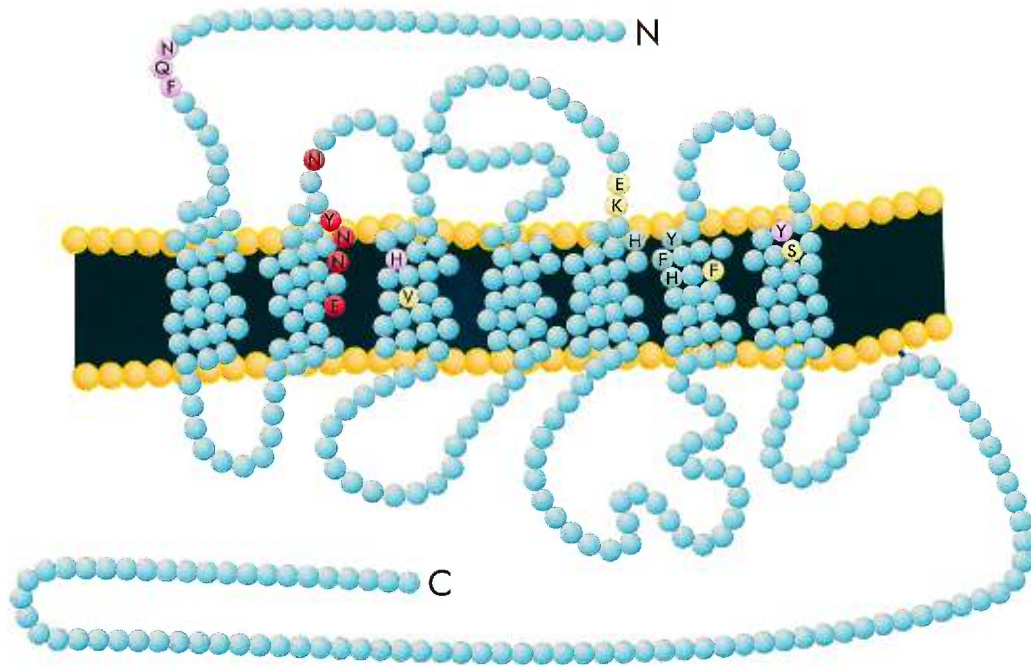
La signification physiologique de la coexistence des neuromédiateurs n'est pas encore résolue. Si l'on envisage deux médiateurs (e.g. SP et 5-HT), l'un transmetteur (5-HT), l'autre modulateur (SP), agissant sur des récepteurs spécifiques respectifs; selon l'hypothèse, la SP pourrait en outre, et surtout, exercer toute une série d'actions modulatrices sur le mécanisme de la 5-HT : 1) contrôles de la synthèse, du stockage ou de la libération de la 5-HT au sein des terminaisons présynaptiques par action intracellulaire; 2) régulation de l'action de la 5-HT sur ses récepteurs en jouant sur l'affinité des récepteurs postsynaptiques à la 5-HT ou même sur le nombre suivant une activation des récepteurs des tachykinines en postsynaptique; 3) action sur des autorécepteurs aux tachykinines présynaptiques, et par là, sur les mécanismes de libération de la 5-HT.

#### 4. Pharmacologie des tachykinines

Les trois récepteurs des tachykinines ont été identifiés par clonage moléculaire et par séquençage biochimique (Nakanishi et coll., 1991). Possédant une structure primaire d'environ 400-450 acides aminés, ces protéines appartiennent à la superfamille des récepteurs à la rhodopsine comprenant sept domaines hydrophobes transmembranaires. La figure 4A représente un diagramme serpentin du récepteur NK-1 humain. Les trois récepteurs des tachykinines interagissent avec des protéines hétérotrimériques liant la guanine (protéine G) pour agir sur un système effecteur spécifique. D'une façon générale, la SP, la NKA (et les formes allongées de la NKA) et la NKB sont les agonistes endogènes préférentiels des récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3 respectivement. Toutefois, ces tachykinines sont peu sélectives et chacune d'elle, à forte concentration, peut activer chacun des trois récepteurs (Regoli et coll., 1987a; b).

Des modifications précises sur certains résidus de la portion C-terminale des tachykinines endogènes procurent une sélectivité supérieure de ces analogues

A



B

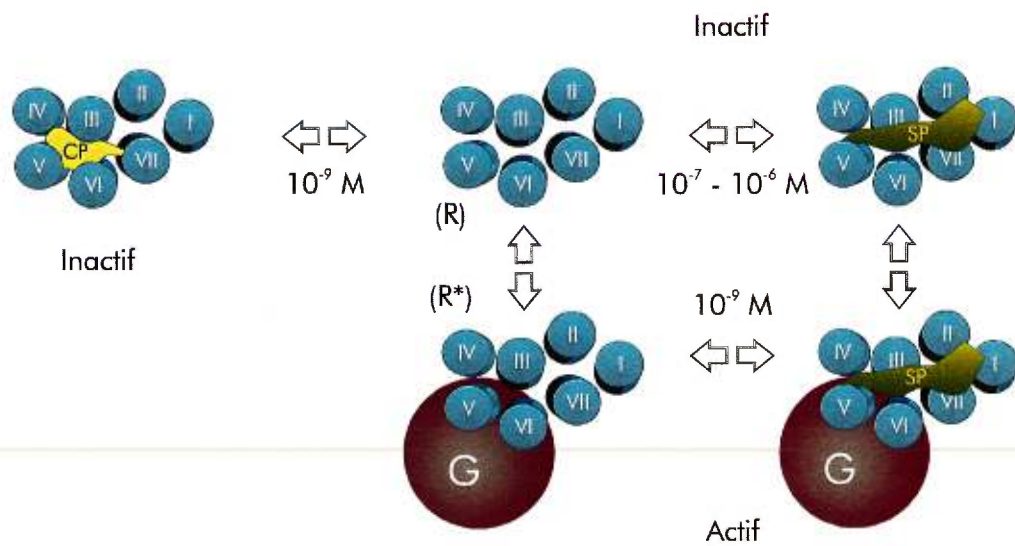


Figure 4 Représentation schématique du récepteur NK-1 humain  
Tiré de Gether et coll. (1995)

*Figure 4.* A. Représentation “serpentin” du récepteur NK-1 humain où l’emphase a été mise sur les résidus importants dans l’interaction entre les différents ligands et le récepteur NK-1. Les acides aminés potentiellement impliqués dans la liaison de l’antagoniste non peptidique (±)-CP-96,345 sur ce récepteur se retrouvent principalement dans le haut des segments transmembranaires (TM) V et VI (résidus verts) alors que d’autres résidus dans les segments TM III, V, VI et VII (résidus jaunes) semblent favoriser une stabilisation accrue de l’antagoniste (±)-CP-96,345 sur ce site de liaison sans toutefois que ces derniers résidus n’interagissent directement avec l’antagoniste. Pour leur part, les agonistes du récepteur NK-1 semblent interagir avec des résidus dans la portion extracellulaire amino-terminale et dans le haut des segments TM III et VII (résidus rose). Les acides aminés représentés en rouge sur le segment TM II semblent favoriser la liaison des ligands peptidiques au profit des ligands non peptidiques.

B. Structure hautement dynamique entre les conformations actives ( $R^*$ ) et inactives ( $R$ ) du récepteur NK-1 tel que proposé par l’équipe de Lefkowitz (Samama et coll., 1993). Dans ce modèle, le récepteur couplé à la protéine G (forme active) est beaucoup plus susceptible de se coupler avec la substance P (SP) (affinité de  $10^{-9}$  M) que la forme inactive découplée (affinité de  $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  M). La SP se lie à la surface du récepteur et le stabilise sous sa conformation active ( $R^*$ ), alors que l’antagoniste non peptidique (±)-CP-96,345 stabilise la forme inactive du récepteur NK-1. Cette interaction entre l’antagoniste non peptidique (±)-CP-96,345 et le récepteur NK-1 distord le site de liaison de l’agoniste et amène l’équilibre dynamique du récepteur NK-1 vers une conformation inactive stable. Ce mode d’action du (±)-CP-96,345 est conforme avec l’antagonisme compétitif observé dans des études de liaison.

peptidiques pour chacun des récepteurs des tachykinines (Regoli et coll. 1988). Les agonistes et antagonistes sélectifs, qui découleront de cette approche, deviendront rapidement essentiels dans les études physiologiques et pharmacologiques des tachykinines. L'avènement plus récent d'antagonistes sélectifs de nature non peptidique, et identifiés par des méthodes de criblage empirique, a permis de : 1) mieux caractériser les récepteurs des tachykinines, et 2) de proposer l'existence de sous-types inter-espèces pour les trois récepteurs des tachykinines.

De plus, l'expression de ces récepteurs dans des cellules réceptrices classiques (COS, CHO, etc.) a permis de mieux caractériser les voies des seconds messagers suivant l'activation de ces récepteurs. Ces voies, communes pour les trois récepteurs des tachykinines, affectent la voie de dégradation du phosphatidyl inositol qui entraîne une augmentation du calcium intracellulaire. La stimulation des trois récepteurs aux tachykinines peut aussi dans certaines circonstances activer la voie de l'adénylate cyclase.

#### i) Récepteurs des tachykinines

##### a) Classification

L'existence de plusieurs récepteurs aux tachykinines a été suggérée vers la fin des années 70 par plusieurs groupes (Erspamer et coll., 1977; 1980; Frederickson et coll., 1978; Teichberg et coll., 1981; Couture et Regoli, 1982). Sur la base de l'affinité relative d'une série de tachykinines, l'équipe d'Iversen propose l'existence de deux récepteurs aux tachykinines : le récepteur SP-P (NK-1) sélectif pour la SP et la physalaemine et le récepteur SP-E (NK-2) démontrant une affinité préférentielle pour la kassinine et l'élédoisine (Iversen et coll., 1982; Iversen, 1985; Lee et coll., 1982). Couture et Regoli (1982) ont mis en évidence l'existence de trois ordres de puissance pour les différentes tachykinines dans six essais biologiques suggérant alors trois sous-types de récepteurs selon le premier critère de Schild (1973). Plus tard, un troisième récepteur, le récepteur SP-N (NK-3), a été démontré dans l'iléon de cobaye (Läuffer et coll., 1985b) et dans le cortex cérébral du rat (Beaujouan et coll., 1984; Buck et coll., 1984; Cascieri et Liang, 1984; Läuffer et coll., 1985b; Lee et coll., 1986). Celui-ci représente le site de liaison préféré de la NKB (Torrens et coll., 1984). La nomenclature utilisée actuellement pour

identifier ces récepteurs est NK-1, NK-2 et NK-3 tel que proposée et acceptée au symposium sur les tachykinines tenu à Montréal en 1986 (Henry, 1987).

L'équipe de Segawa (Nakata et coll., 1978) a été la première à sonder le SNC du rat et du lapin pour y déterminer les sites de liaison de la SP suggérant un modèle à deux sites. Avec l'utilisation du même ligand ( $^3\text{H}$ -SP), Hanley et coll. (1980), démontrent que ces sites de liaison se distribuent d'une façon parallèle à l'immunoréactivité à la SP dans le cerveau du rat où des concentrations importantes sont retrouvées dans l'hypothalamus et négligeables dans le cervelet et cortex cérébral. Ces études ont été reproduites par plusieurs autres équipes, qui ont démontré une liaison spécifique et réversible des radioligands [ $^3\text{H}$ ]SP, [ $^{125}\text{I}$ ]BH-SP et [ $^{125}\text{I}$ ]BH-eledoisine (Lee et coll., 1982; Cascieri et Liang, 1984; Viger et coll., 1983; Torrens et coll., 1984), permettant la démonstration de deux sites de liaisons distincts dans le SNC du rat (Buck et coll., 1984; Cascieri et Liang, 1984; Cascieri et coll., 1985; Torrens et coll., 1985; Lee et coll., 1986; 1987). Des études en autoradiographie ont confirmé cette dualité réceptorielle dans le SNC du rat (Quirion et coll., 1983; Manthy et coll., 1984b; Quirion, 1985). Il est maintenant clair que ces deux sites de liaisons représentent les récepteurs NK-1 et NK-3. L'utilisation de radioligands plus sélectifs pour les récepteurs NK-1 (Petitet et coll., 1988; 1991; Lew et coll., 1990), NK-2 (Badgery-Parker et coll., 1993; Dam et coll., 1990) et NK-3 (Laüfer et coll., 1986a) a confirmé la distribution vaste et distincte des trois récepteurs des tachykinines à travers l'organisme.

Une recherche systématique de préparations monoréceptorielles <sup>(10)</sup> a été entreprise, dans le but de mieux caractériser chacun des trois récepteurs. Trois tissus ont été identifiés comme étant d'excellentes préparations monoréceptorielles pour les récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3. Il s'agit de l'artère carotide de chien (ACC) ou les veines cave et jugulaire de lapin (VCL et VJL), l'artère pulmonaire de lapin (APL) et la veine porte de rat (VPR), respectivement (Regoli et coll., 1984a; Nantel et coll. 1990; 1991; D'Orléans-Juste et coll., 1986; Mastrangelo et coll., 1987). La VCL est 21 et 27 fois

---

<sup>10</sup> Une préparation monoréceptorielle produit une réponse biologique à un agoniste issu de l'activation d'un seul récepteur, laquelle sera complètement abolie en prétraitant la préparation avec un antagoniste sélectif pour ce récepteur (Regoli et coll., 1994a).

plus sensible à la SP qu'à la NKA et la NKB, respectivement, l'APL est 125 et 6 fois plus sensible à la NKA qu'à la SP et la NKB, respectivement, alors que la VPR est 71 et 17 fois plus sensible à la NKB qu'à la SP et la NKA, respectivement (Regoli et coll., 1994c). Toutefois, c'est avec l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes sélectifs pour chacun des trois récepteurs que l'on pourra vraiment apprécier l'identité monoréceptorielle de ces préparations (voir chapitre 1, sections 4ii (a et b)).

#### b) Biologie moléculaire

Le clonage des ADNc codant pour chacun des récepteurs des tachykinines, combiné à leur expression fonctionnelle dans des systèmes cellulaires hétérologues confirment l'existence de ces trois entités réceptorielles. Après avoir cloné et séquencé le récepteur NK-2 du boeuf (Masu et coll., 1987), l'équipe de Nakanishi a "pêché" les récepteurs NK-1 (Yokota et coll., 1989; figure 4) et NK-3 (Shigemoto et coll., 1990) par une méthode d'hybridation croisée avec l'ADNc du récepteur NK-2 connu. La séquence primaire déduite de ces protéines a révélé la présence de sept domaines à hélice- $\alpha$  hydrophobes, similaires aux domaines transmembranaires de la bactériorhodopsine et des récepteurs  $\beta$ -adrénergique et muscariniques. Dans le premier article consacré au clonage des trois récepteurs des tachykinines chez le rat, Nakanishi (1991) fait ressortir quatre éléments structurels saisissants : 1) un résidu acide est retrouvé au niveau du deuxième segment transmembranaire (TM-II) de presque <sup>(11)</sup> tous les récepteurs couplés aux protéines G. A ce niveau (position 78), les récepteurs NK-2 et NK-3 possèdent un acide aspartique alors que le récepteur NK-1 dispose d'un acide glutamique, 2) une présence conservée de plusieurs résidus histidines dans les segments TM-V et TM-VI de ces récepteurs semble être une caractéristique unique aux récepteurs des tachykinines, 3) contrairement au récepteur NK-2, la troisième boucle intracellulaire des récepteurs NK-1 et NK-3 est hautement conservée. Selon Nakanishi, cette région impliquée dans la transduction du signal

---

<sup>11</sup> Une exception est le récepteur de l'hormone de relâche gonadotrope (Tsutumi et coll., 1992). Cet acide aminé a été impliqué dans la régulation de l'état de haute affinité du récepteur par le sodium (Quintana et coll., 1993).

pourrait lier des protéines G distinctes. 4) Plusieurs résidus sérines et thréonines se retrouvant dans la troisième boucle intracellulaire et dans la portion C-terminale, pourraient représenter des sites de phosphorylation. L'importance relative de ces sites potentiels de phosphorylation sur le récepteur NK-1 par rapport au récepteur NK-2 est étroitement corrélé avec des études de désensibilisation des récepteurs aux tachykinines exprimés dans des cellules embryonnaires de grenouille (*Xenopus oocyte*), où la SP se désensibilise plus rapidement que la NKA (Harada et coll., 1987; Shigemoto et coll., 1990). Plusieurs autres hypothèses sur la régulation fine de ces récepteurs, grâce à des techniques de mutagenèse dirigée (Nakanishi et coll., 1993), sont décrites d'une façon détaillée dans la revue de Regoli et coll. (1994a).

De plus, l'avènement de ces clones a permis d'effectuer des études de liaison sur des cellules réceptrices classiques (COS) transfectées avec chaque récepteur et ainsi rendant possible l'application du premier critère de Schild (1973) qui est basé sur l'ordre de puissance des agonistes (Shigemoto et coll., 1990). A ce jour, la séquence primaire des trois récepteurs aux tachykinines a été déduite par clonage dans plusieurs espèces dont l'humain (Gerard et coll., 1990; 1991; Graham et coll., 1991; Buell et coll., 1992; Huang et coll., 1992; Takahashi et coll., 1992).

## ii) Outils pharmacologiques des tachykinines

De façon à caractériser davantage les tachykinines et leurs récepteurs, le développement d'outils permettant la dissection de chaque récepteur est devenu essentiel. Ainsi, le physiologiste, qui ne travaille jamais sur une préparation purement monoréceptorielle dépend, en quelque sorte, des pharmacologues et des chimistes qui développeront de tels outils indispensables. Cette section revise la découverte de ces outils et leurs rôles importants dans la caractérisation des tachykinines.



a) Agonistes sélectifs

Une série d'études sur les fragments des tachykinines démontrent que la séquence C-terminale Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> commune aux tachykinines est essentielle mais insuffisante pour activer les récepteurs NK-1, NK-2 ou NK-3 (Bernardi et coll., 1965; 1968; Bergmann et coll., 1974; Bury et Mashford; 1976; Couture et Regoli, 1982; Regoli et coll., 1987a). Toutefois en ajoutant un ou deux résidus en position amino-terminale à ces fragments de cinq acides aminés, on retrouve des composés très actifs, et qui peuvent même dans certains cas (SP(6-11), PHY(6-11), élédoisine(5-11)) retrouver une certaine sélectivité (Bernardi et coll., 1965; 1968; Couture et Regoli, 1982). Ces études suggèrent que la portion N-terminale des tachykinines est responsable de leurs préférences pour un récepteur plutôt qu'un autre (Cascieri et coll., 1992a, b). Plusieurs bons agonistes ont été développés pour les trois récepteurs à partir de ce principe (Tableau 2).

Un des premiers agonistes sélectifs pour le récepteur NK-1, a été la forme méthylester de la SP (Watson et coll., 1983). Toutefois, le métabolisme rapide de cet agoniste limite son action et il sera remplacé par une série d'agonistes plus stables et sélectifs, tels le septide, le [Sar<sup>9</sup>]SP sulphone, le [Pro<sup>9</sup>]SP sulphone, le GR 73,632 et le [Pro<sup>9</sup>]SP (Laüfer et coll., 1986b; Lavielle et coll., 1986; Dion et coll., 1987; Drapeau et coll., 1987; Petit et coll., 1988; Regoli et coll., 1988; Rovero et coll., 1989a; b; Elliot et coll., 1991; Deal et coll., 1992) (voir tableau 2). Notons, par exemple, que le [Sar<sup>9</sup>]SP sulphone, qui représente l'agoniste sélectif le plus utilisé pour caractériser le récepteur NK-1, est près de huit fois plus puissant pour réduire la pression sanguine que la SP chez le rat (Couture et coll., 1989).

L'activité accrue du fragment NKA(4-10), par rapport à la NKA, sur les préparations monoréceptorielles NK-2 *in vitro* constituait la base du développement d'agonistes sélectifs pour ce récepteur (Drapeau et coll., 1987; Dion et coll., 1987). Même si ce fragment possède une activité significative sur le récepteur NK-3, le remplacement de la methionine en position 10 par un groupement Nle ([Nle<sup>10</sup>]NKA(4-10)) abolissait cette activité sur le récepteur NK-3 tout en conservant 50% de l'effet sur



le récepteur NK-2. Des niveaux de plus grande sélectivité ont été atteints avec le [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10) qui présente une activité de 100 et 500 fois supérieure sur le récepteur NK-2 versus les récepteurs NK-1 et NK-3, respectivement (Rovero et coll., 1989a, b). Ce dernier prototype d'agoniste NK-2 demeure le plus utilisé.

L'occupation du site NK-3 est favorisée en substituant la phenylalanine en position 7 de la NKB par un groupement  $\alpha$ -methyl-phenylalanine (Drapeau et coll., 1987; Dion et coll., 1987). Cette observation a permis de créer les plus sélectifs et puissants agonistes NK-3 connus, soit le [MePhe<sup>7</sup>]NKB et le senktide (tableau 2).

Ces agonistes sélectifs pour les trois récepteurs des tachykinines ont permis d'apprécier d'avantage l'intégrité des préparations monoréceptorielles, pour chacun des récepteurs (voir chapitre 1, section 4i (a)). La VCL est 5000 et 1000 fois plus sensible au [Sar<sup>9</sup>]SP sulphone qu'au [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10) et qu'au [MePhe<sup>7</sup>]NKB, respectivement, l'APL<sup>(12)</sup> est 2500 fois plus sensible à la [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10) qu'au [MePhe<sup>7</sup>]NKB, alors que la VPR<sup>(12)</sup> est 150 fois plus sensible au [MePhe<sup>7</sup>]NKB qu'au [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10) (Regoli et coll., 1994c).

Tous les agonistes ayant vu le jour jusqu'à présent sont de nature peptidique et, par conséquent, sont soumis à l'action des enzymes de dégradation. Toutefois, ces fragments tronqués possèdent, pour la plupart, des résidus non-naturels, ce qui leur confère une résistance accrue contre le métabolisme enzymatique. Quoiqu'il en soit, il demeure préférable d'utiliser des produits non-métabolisables, de façon à maximiser l'activité aux récepteurs. Dans cette perspective, à l'instar des antagonistes non peptidiques qui ont pratiquement révolu l'usage d'antagonistes peptidiques, des composés non peptidiques pourraient représenter une prochaine génération d'agonistes des tachykinines.

---

<sup>12</sup> Le [Sar<sup>9</sup>]SP sulphone est inactif sur l'APL et sur la VPR (Regoli et coll., 1994c)

Tableau 2. Caractéristiques des trois récepteurs des tachykinines

	NK-1	NK-2	NK-3
<b>Agonistes naturels</b>	SP	NKA	NKB
<b>Ordre de puissance des agonistes endogènes<sup>a</sup></b>	SP > NPγ > NKA = NPK > NKB	NPK = NPγ > NKA > NKB >> SP	NKB > NKA >> SP
<b>Préparations pharmacologiques</b>	artère carotide de chien veines jugulaire et cave de lapin bronches de souris uretère et iléon <sup>b</sup> de cobaye septide <sup>c</sup>	artère pulmonaire de lapin vessie, bronches et colon humain vas deferens de cobaye colon de rat	veine porte de rat Iléon de cobaye
<b>Agonistes sélectifs</b>	[Sar <sup>9</sup> ]SP sulphone <sup>c</sup> [Pro <sup>9</sup> ]SP et [Pro <sup>9</sup> ]SP sulphone <sup>d</sup> GR 73,632 <sup>e</sup> SP méthyl ester <sup>f</sup>	[βAla <sup>8</sup> ]NKA(4-10) <sup>g</sup> [Nle <sup>10</sup> ]NKA(4-10) <sup>c</sup> [Lys <sup>5</sup> ,MeLeu <sup>9</sup> ,Nle <sup>10</sup> ]NKA(4-10) <sup>h</sup> GR 64,349 <sup>e</sup>	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB <sup>c</sup> Senkide <sup>i</sup> [Pro <sup>7</sup> ]NKB <sup>d</sup>

Tableau 2. Caractéristiques des trois récepteurs des tachykinines

	NK-1	NK-2	NK-3
Antagonistes peptidiques	Spantide I <sup>j</sup> et II <sup>k</sup> L-668,169 <sup>l</sup> GR-71,251 <sup>m</sup> ; GR 82,334 <sup>n</sup> FR-113,680 <sup>o</sup> FK-224 <sup>p</sup> ; FK-888 <sup>q</sup> S-16,474 <sup>r</sup>	R-396 <sup>s</sup> MEN-10,207 <sup>t</sup> ; MEN-10,376 <sup>u</sup> ; MEN-10,573 <sup>v</sup> ; MEN-10,612 <sup>v</sup> ; MEN-10,627 <sup>v</sup> ; L-659,877 <sup>w</sup> GR-94,800 <sup>x</sup> ; GR-100,679 <sup>y</sup> GR-115,211 <sup>z</sup>	R-486 <sup>cc</sup> R-487 <sup>cc</sup> R-820 <sup>dd</sup> GR-138,676 <sup>ee</sup>
Antagonistes non peptidiques	CP-96,345 <sup>ff</sup> ; CP-99,994 <sup>gg</sup> RP-67,580 <sup>hh</sup> ; WIN-51,708 <sup>ii</sup> SR-140,333 <sup>jj</sup> ; $\beta$ -D-glucose <sup>kk</sup> RPR-100,893 <sup>ll</sup> ; CGP-47,899 <sup>mm</sup> Quinoxaline <sup>nn</sup>	MDL-28,564 <sup>aa</sup> ; MDL-29,913 <sup>bb</sup> SR-48,968 <sup>oo</sup> GR-159,897 <sup>pp</sup>	SR-142,801 <sup>qq</sup>

Tableau 2. Caractéristiques des trois récepteurs des tachykinines

	NK-1	NK-2	NK-3
Seconds messagers <sup>rr</sup>	IP <sub>3</sub> cAMP	IP <sub>3</sub> cAMP	IP <sub>3</sub> cAMP

a : Helke et al., 1990 et Maggi, 1994; b : L'iléon de cobaye est traité avec de l'atropine ( $10^{-6}$ M) pour éliminer l'effet de la libération d'ACh par le récepteur NK-3; c : Drapeau et coll., 1987; d : Lavielle et coll., 1988; e : Ireland et coll., 1991; f : Watson et coll., 1983; g : Rovero et coll., 1989a; h : Chassaing et coll., 1991; i : Wörmser et coll., 1986; j : Folkers et coll., 1984; k : Folkers et coll., 1990; l : McNight et coll., 1988; m : Ward et coll., 1990; n : Birch et coll., 1992; o : Morimoto et coll., 1992a; p : Morimoto et coll., 1992b; q : Fujii et coll., 1992; r : Kucharczyk et coll., 1993; s : Dion et coll., 1990; t : Rovero et coll., 1990; u : Maggi et coll., 1991a; v : Maggi, 1994; w : Williams et coll., 1988; x : Hagan, 1992; McElroy et coll., 1992; y : Hagan et coll., 1992; z : Birch et coll., 1993; aa : Harberson et coll., 1990; bb : VanGiersbergen et coll., 1991a; cc : Drapeau et coll., 1990; dd : Regoli et coll., 1994b; ee : Stable et coll., 1993; ff : Snider et coll., 1991; gg : Desai et coll., 1992; hh : Garret et coll., 1991; ii : Venepalli et coll., 1992; jj : Emonds-Alt et coll., 1993b; kk : Hirschmann et coll., 1992; ll : Fardin et coll., 1994; mm : Schilling et coll., 1993; nn : Appell et coll., 1991; oo : Emonds-Alt et coll., 1992; pp : Beresford et coll., 1995; qq : Emonds-Alt et coll., 1995; rr : Ces études sur les seconds messagers ont été effectuées sur des cellules CHO (Nakajima et coll., 1992).

b) Antagonistes sélectifs

- Génération peptidique

Ce sont les efforts de Folkers et coll. (Folkers et coll., 1981; 1982; Rosell et Folkers, 1982) au début des années 1980 qui ont permis le développement des premiers antagonistes des tachykinines. Pour y arriver, ils ont remplacé certains acides aminés de la SP, par des équivalents d'orientation dextrogyre (D-amine) ou par l'incorporation de résidus synthétiques. Après avoir réalisé que l'acide aminé D-tryptophane (D-Trp) représentait le meilleur substituant pour arriver à cette fin, ils ont synthétisé le premier antagoniste des tachykinines. Avec un  $pA_2$  de 5,43 sur l'iléon de cobaye (Björkroth et coll., 1982), le [D-Pro<sup>2</sup>,D-Trp<sup>7,9</sup>]SP (Folkers et coll., 1981) était capable de bloquer plusieurs effets biologiques de la SP (Engberg et coll., 1981; Leander et coll., 1981; Piercey et coll., 1982). Toutefois, de fortes doses de ce composé provoquaient une paralysie chez la souris et le rat (Piercey et coll., 1981; Rodriguez et coll., 1983; Post et Paulsson, 1985; Couture et coll., 1987). Par ailleurs, ce composé pouvait aussi dépléter les mastocytes et entraîner une libération d'histamine, ce qui constituait des effets secondaires indésirables (Häkanson et coll., 1982; Devillier et coll., 1985). En vue de contrer à ces effets secondaires de la [D-Pro<sup>2</sup>,D-Trp<sup>7,9</sup>]SP, Folkers et coll. (1984) ont préparé une série d'analogues contenant une double substitutions aux extrémités du peptide, avec les résidus D-Arg en position N-terminale et Leu ou Nle en position C-terminale, donnant ainsi naissance au spantide I : [D-Arg<sup>1</sup>,D-Trp<sup>7,9</sup>,Leu<sup>11</sup>]SP. Ce composé très actif pour antagoniser le récepteur NK-1 ( $pA_2$ <sup>(13)</sup> de 7.1; *tenia coli* du cobaye), comportait toujours les mêmes désavantages que son prédécesseur (Devillier et coll., 1989). La neurotoxicité observée lors de son administration intrathécale était attribuée à une ischémie locale (Freedman et coll., 1988). Par conséquent, un nouvel antagoniste, le spantide II, plus puissant ( $pA_2$  de 8.1; *tenia coli* du cobaye) et sans effet secondaire a été développé (Folkers et coll., 1990).

---

<sup>13</sup>  $pA_2$  : affinité apparente d'un antagoniste;  $-\log$  [antagoniste] qui réduit l'effet d'une dose double d'un agoniste à celui d'une dose simple (Schild, 1947).

Toujours en suivant le principe de base que l'insertion d'un résidu D-Trp dans la séquence de la SP favorise l'élaboration d'un antagoniste du récepteur NK-1, d'autres équipes ont développé des antagonistes à partir de fragments plus courts de la SP (i.e.: SP(6-11) ou SP(4-11)) (Regoli et coll., 1984b; Hansen et Morgan 1984; McNight et coll., 1988). Même si dépourvus d'effets secondaires (Devillier et coll., 1989), ces antagonistes, tout comme le spantide I, n'étaient pas suffisamment sélectifs pour le récepteur NK-1. Ces premières formes tronquées et modifiées de la SP ont favorisé le développement d'une nouvelle catégorie d'antagonistes, les peptidoides<sup>(14)</sup> ou peptidomimétiques (le FR-113,680; Morimoto et coll., 1992a, le FK-224; Morimoto et coll., 1992b, le FK-888; Fujii et coll., 1992 et le S-16,474; Kucharczyk et coll., 1993) possédant une affinité et une sélectivité plus grande pour le récepteur NK-1. Cette tendance réductive s'est poursuivie avec le développement d'un dérivé simple du Trp, soit le N-Acyl-L-Trp-benzylester, possédant des substituants CF<sub>3</sub> sur l'anneau benzyl et démontrant une puissance et une sélectivité accrues pour le récepteur NK-1 (humain) (MacLeod et coll., 1993). La taille moléculaire des antagonistes non peptidiques, qui seront discutés dans la prochaine section, s'apparente beaucoup avec celle de l'antagoniste N-Acyl-L-Trp-benzylester. Selon Regoli et coll. (1994a), un concept peut être tiré de cette saga des antagonistes possédant le résidu Trp : dans la pharmacologie des peptides, le récepteur peut être bloqué par une molécule aussi petite qu'un acide aminé. Regoli a d'ailleurs synthétisé deux antagonistes peptidoides sélectifs pour le récepteur NK-1 et comportant des résidus D-Trp, soit un tripeptide (R-544) et un dipeptide (R-545) qui ont été conçus à partir d'un octapeptide (R-204) sélectif, aussi, pour le récepteur NK-1 (Regoli et coll., 1985).

Des antagonistes sélectifs pour les récepteurs NK-2 et NK-3 ont aussi été développés en modifiant les résidus, à partir de formes tronquées C-terminale des peptides naturels. Ainsi, Menarini, Glaxo et Regoli ont développé plusieurs antagonistes pour le récepteur NK-2, soit les composés MEN-10,207, MEN-10,376, GR-

---

<sup>14</sup> Regoli attribue, à cette famille de dipeptides et de tripeptides, le titre de peptidoides, qui représente, selon lui, la seconde génération d'antagonistes aux tachykinines entre les générations peptidique et non peptidique (Regoli et coll., 1994a).

94,800 et R-396 (Maggi et coll., 1990b; Jukic et coll., 1991; Hagan, 1992). Une autre approche de cyclisation des peptides et l'utilisation de la fonction  $\psi(\text{CH}_2\text{NH})$  a permis d'ajouter à cette liste les antagonistes L-659,877, GR-94,800, MEN-10,573, MEN-10,612 et MEN-10,627 (Maggi, 1994). Beaucoup moins d'antagonistes peptidiques sont disponibles pour le récepteur NK-3. Seuls les équipes de Regoli et Hagan sont arrivées à synthétiser de tels agents, soit les composés R-486, R-487 et le GR-138,676 (Drapeau et al., 1990; Stables et coll., 1993). Par ailleurs, un seul antagoniste peptidoïde a été développé pour ce récepteur soit le 3-indolylcarbonyl-Hyp-Phe-N(Me)-Bzl (R-820; Regoli et coll., 1994b)

#### - Génération non peptidique

Le premier antagoniste non peptidique sélectif pour le récepteur NK-1, a été identifié par criblage empirique d'un grand nombre de molécules par des études de liaison sur des préparations monoréceptorielles NK-1 (Snider et coll., 1991). Toutefois, ce composé, le CP-96,345 présente aussi une action non spécifique importante sur certains canaux ioniques (Schmidt et coll., 1992; Ceaser et coll., 1993; Guard et coll., 1993; Constantine et coll., 1994). Avec la même stratégie, d'autres antagonistes non peptidiques du récepteur NK-1 ont vu le jour (voir figure 5) : le RP-67,580 (Garret et coll., 1991); les quinoxalines (Appell et coll., 1991); le WIN-51,708 (Venepalli et coll., 1992); le  $\beta$ -D-glucose (Hirschmann et coll., 1992); le CGP-47,899 (Schilling et coll., 1993) et le RPR-100,893 (Fardin et coll., 1994). L'avantage majeur de cette classe d'antagonistes est leur stabilité métabolique même lors d'administration *per os*. De plus, grâce à leur nature généralement hydrophobe, ces antagonistes traversent la barrière hématoencéphalique dans la plupart des cas. Une approche identique de criblage stochastique permet à Sanofi d'identifier les premiers antagonistes non peptidiques des récepteurs NK-2 et NK-3, soit le SR-48,968 (Emonds-Alt et coll., 1992) et le SR-142,801 (Emonds-Alt et coll., 1995).

Quelques unes de ces molécules ont été soumises à une optimisation moléculaire et ainsi, à partir du CP-96,345, McLean et coll. (1993a; b; c), ont généré un autre antagoniste sélectif pour le récepteur NK-1 (CP-99,994) sans effet secondaire sur les

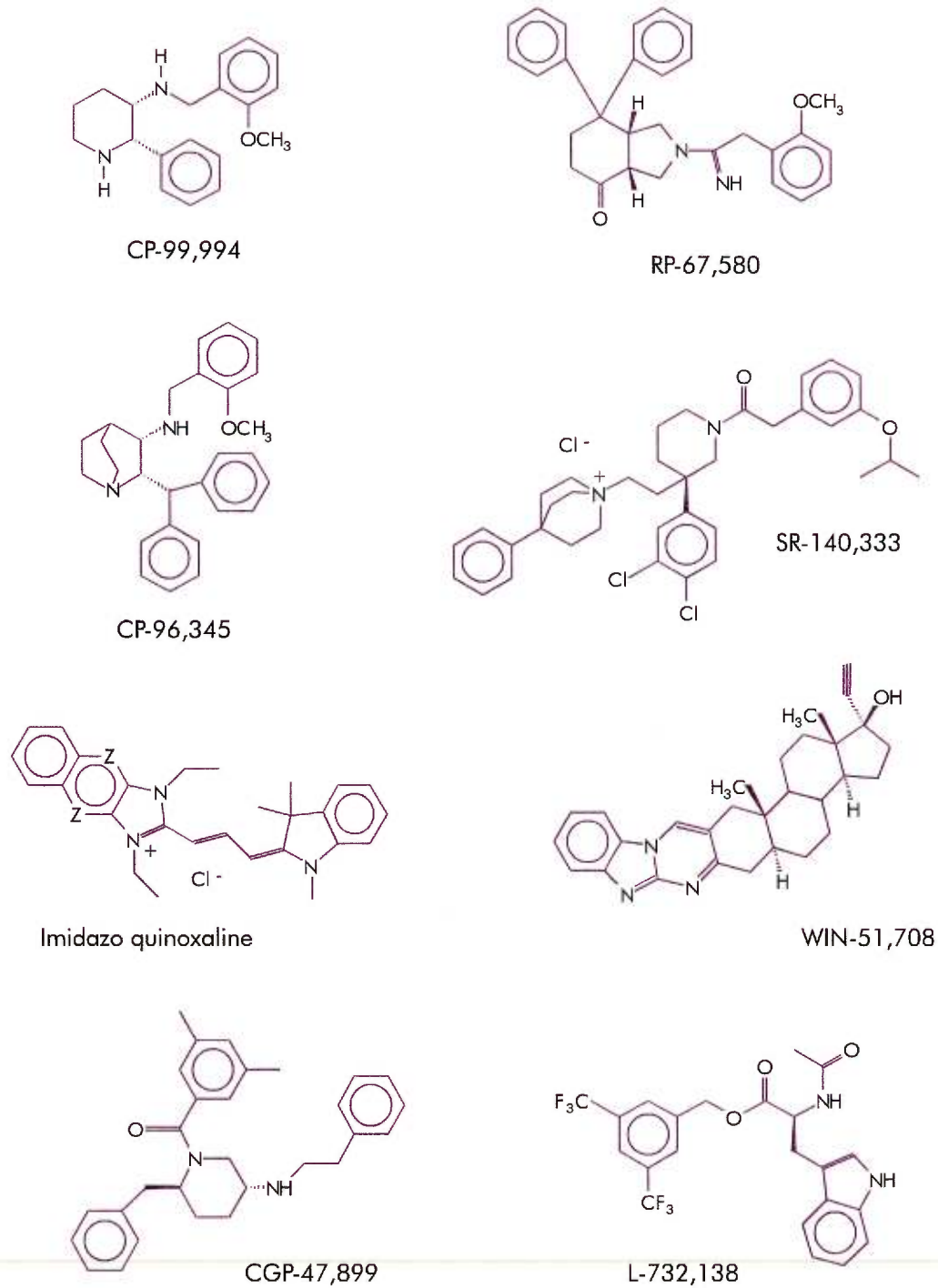


Figure 5. Structures chimiques des antagonistes non peptidiques du récepteur NK-1 des tachykinines



canaux ioniques. Par analogie, à partir du SR-48,968, Emonds-Alt et coll. (1993a; b) ont généré un antagoniste sélectif pour le récepteur NK-1, le SR-140,333.

- Etudes de relation structure-activité des antagonistes non peptidiques sur les récepteurs NK-1 et NK-2

L'étude sur la relation structure-activité des antagonistes non peptidiques a permis de distinguer les épitopes importants du récepteur NK-1 liant les antagonistes et ceux liant la SP (Figure 4A). Plusieurs équipes ont démontré un site de liaison distinct de l'antagoniste non peptidique CP-96,345 par rapport à celui de la SP sur le récepteur NK-1 (Gether et coll., 1993a). En effet, des résidus dans les régions TM-V et TM-VI ont été identifiés comme étant importants dans la liaison de l'antagoniste avec ce récepteur mais non essentiels dans la liaison de la SP (résidus identifiés en jaune sur la figure 4B). Ce domaine de liaison pour le CP-96,345 est aussi important pour les autres antagonistes non peptidiques, SR-140,333, FK-888 et RP-67,580, suggérant un mode d'action commun pour cette classe d'antagonistes possédant des structures très différentes (Gether et coll., 1994). En revanche la SP semble interagir avec plusieurs résidus dans la portion extracellulaire N-terminale et dans le haut des segments TM-III et TM-VII (représentés en rose à la figure 4A) (Gether et coll., 1995), alors que d'autres résidus localisés dans la région TM-II (représentés en rouge sur la figure 4A) seraient des sites de compétition entre l'agoniste et l'antagoniste CP-96,345. Par ailleurs, la création des chimères NK-1/NK-2 a permis de décrire les sites essentiels dans la liaison du SR-48,968 avec le récepteur NK-2 (Gether et coll., 1993b). Comme pour les antagonistes non peptidiques du récepteur NK-1, mais à l'opposé des sites de liaison pour les ligands peptidiques, le SR-48,968 inhibe le récepteur NK-2 en interagissant sur des épitopes qui sont distribués spatialement autour du segment TM-VI. Il est intéressant de mentionner que des résultats similaires ont été obtenus avec des antagonistes non peptidiques de AII sur le récepteur AT-1 (Schambye et coll., 1994; Ji et coll., 1994). En résumé, à l'encontre des antagonistes non peptidiques qui semblent se lier sur les régions transmembranaires du récepteur, l'agoniste naturel semble plutôt interagir avec des épitopes extracellulaires. Curieusement, malgré cette dualité spatiale d'interaction, des études pharmacologiques démontrent une cinétique de compétition

entre agonistes et antagonistes, et ceci peut être généralisé pour les récepteurs NK-1, NK-2 et AT-1.

La figure 4B représente l'interaction hautement dynamique entre le récepteur libre, inactif (R), et le complexe récepteur-protéine G, actif (R\*) en présence ou en absence d'antagoniste, tel que proposé par l'équipe de Lefkowitz (Samama et coll., 1993). A l'équilibre, l'état actif du récepteur NK-1 (le récepteur lié à la protéine G), possède une forte affinité pour la SP ( $10^{-9}$  M) alors que l'état inactif du récepteur (dissocié de la protéine G) démontre une très faible affinité pour la SP ( $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  M) et une grande affinité pour l'antagoniste non peptidique ( $10^{-9}$  M) (Gether et coll., 1995). La liaison de l'antagoniste avec le récepteur libre (R) modifie la conformation du récepteur, et ainsi, rend improbable le couplage du récepteur avec la protéine G, ce qui bloque le récepteur à un niveau de basse affinité pour la SP (Figure 4B). Par conséquent, même si l'agoniste et l'antagoniste n'occupent pas le même site de liaison sur le récepteur, ce mécanisme de coopération négative SP/CP-96,345 serait responsable du phénomène de compétition observée. Donc, il ne s'agit pas d'une compétition pour un site de liaison mais plutôt pour un état d'affinité.

Quoiqu'il en soit, l'avènement de ces nouveaux outils métaboliquement stables, sélectifs et puissants a permis une relance inespérée dans la recherche sur les tachykinines. Ils représentent le fruit de criblages aléatoires à grande échelle et dans certains cas, à une optimisation moléculaire de ces composés originalement identifiés par criblage empirique. L'application d'un modelage moléculaire aux tachykinines et aux antagonistes non peptidiques, combinée à une approche de mutagenèse dirigée sur le récepteur, pourrait contribuer à mieux comprendre l'architecture du site actif du récepteur et pourrait mener à la construction rationnelle d'antagonistes (Elling et coll., 1994; Hanessian et Ronan, 1994; Regoli et coll., 1994a).

c) Sous-types de récepteurs des tachykinines

Plusieurs évidences suggèrent l'existence d'une hétérogénéité des récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3 des tachykinines chez les mammifères (Mussap et Burcher, 1993; Maggi, 1994). En effet, les ordres de puissances de plusieurs tachykinines et analogues sur des préparations monoréceptorielles tendent à suggérer l'existence de sous-types inter-espèces pour les récepteurs NK-1 (Lew et coll., 1990), NK-2 (Maggi et coll., 1990b; 1991a; Buck et coll., 1991; Patacchini et coll., 1991; Takeda et Krause, 1991; Van Giersbergen et coll., 1991a; b) et NK-3 (Petitet et coll., 1993; NGuyen et coll., 1994). Les premières études démontrant des affinités différentes des antagonistes peptidiques pour les récepteurs NK-1 et NK-2 pouvaient s'expliquer par leur sensibilité différentielle aux protéases. En effet, même si ces antagonistes possèdent des résidus non-naturels qui leur offrent une certaine protection contre la dégradation enzymatique, l'estimation de leur affinité dans différentes préparations seront soumises à ce biais lié à la dégradation différentielle des ligands peptidiques (Devillier et coll., 1988; Ireland et coll., 1988). Pour y remédier, l'utilisation d'inhibiteurs de la dégradation a permis une évaluation plus juste de l'affinité des ligands. Toutefois, ce sera l'avènement d'antagonistes non peptidiques qui permettra de confirmer hors de tous doutes l'existence de sous-types inter-espèces pour les trois types de récepteurs.

Un problème majeur dans la détermination de sous-types de récepteurs est d'établir l'importance de l'hétérogénéité *intra- versus* inter-espèce. Bien sûr, ces deux formes d'hétérogénéités ne sont pas mutuellement exclusives et peuvent coexister. Le séquençage peptidique des récepteurs homologues de différentes espèces a permis d'identifier les acides aminés des régions transmembranaires qui semblent particulièrement impliqués dans l'hétérogénéité pharmacologique observée entre les espèces. Toutefois, aucune évidence moléculaire supporte l'existence de sous-types intra-espèces. L'existence d'une seule copie pour chacun des récepteurs à l'intérieur d'une espèce n'exclut pas, a priori, la possibilité d'une hétérogénéité intra-espèce.

1. Une hétérogénéité pourrait être expliquée par l'existence de plusieurs formes alléliques des gènes codants pour les récepteurs aux tachykinines (Graham et coll., 1991).

2. Lors de la transcription de ces gènes en ARNm, l'épissage alternatif pourrait entraîner une variété d'isoformes codant pour des sous-types intra-espèces des récepteurs (Tsuchida et coll., 1990; Fong et al., 1992a). En effet, contrairement à la majorité des récepteurs couplés à la protéine G, qui ne possèdent aucun intron, donc un seul exon, les trois récepteurs aux tachykinines possèdent tous 5 exons et sont donc potentiellement sujets à l'épissage alternatif.
3. Des modifications posttranscriptionnelles variables pour ces récepteurs ou le microenvironnement propre à chaque cellule pourrait aussi être à la base d'une hétérogénéité intra-espèce reliée aux récepteurs des tachykinines (Appell et coll., 1992). Parmi les différentes modifications posttranscriptionnelles, c'est la glycosylation qui retient l'attention. En effet, un prétraitement à la concanavaleine A réduit substantiellement l'affinité de la SP pour le récepteur NK-1 du cortex cérébral de rat (Takamatsu et coll., 1991).

#### - Récepteur NK-1

Le récepteur NK-1 a été cloné à partir du cerveau et des glandes salivaires de rat (Yokota et coll., 1989; Hershey et Krause, 1990), de l'utérus de cobaye (Gorbulev et coll., 1992), d'une lignée de lymphoblastes humains (Takeda et coll., 1991; Gerard et coll., 1991), de poumons humains (Hopkins et coll., 1991; Gerard et coll., 1991) et du génome de la souris (Sundelin et coll., 1992). Des études pharmacologiques ont rapidement révélé une hétérogénéité inter-espèce qui a permis une distinction pharmacologique entre les récepteurs NK-1 de rat et de la souris avec ceux de l'humain et du cobaye. En effet, l'antagoniste non peptidique CP-96,345 est 100 fois plus puissant à bloquer le récepteur NK-1 humain et de cobaye que celui du rat ou de la souris (Gitter et coll., 1991), tandis que l'antagoniste RP-67,580 est plus actif chez le rat et la souris que chez l'humain ou le cobaye (Garret et coll., 1991; 1992). L'acide aminé en position 97 (deuxième boucle extracellulaire), soit Glu chez l'homme et le cobaye et Val chez le rat ou la souris, semble impliqué dans l'hétérogénéité pharmacologique du récepteur NK-1 (Gerard et coll., 1991; Fong et coll., 1992b). Par ailleurs, plusieurs études focalisant sur les résidus des segments transmembranaires ont permis de déceler six acides aminés variables impliqués dans l'hétérogénéité inter-espèce du récepteur NK-1 (tableau 3).

Cette hétérogénéité pharmacologique se limite aux antagonistes car, aucune différence de ce type n'a été rapportée concernant l'affinité des agonistes pour ce récepteur.

**Tableau 3. Composition en acides aminés dans les positions variables des segments transmembranaires (TM1 - TM7) du récepteur NK-1 chez différentes espèces.**

Segment Transmembranaire	Position du résidu	Rat	Souris	Humain	Cobaye
TM1	54	Ile	Ile	Met	Met
TM2	80	Cys	Cys	Ser	Ser
TM3	116	Leu	Leu	Val	Val
TM4	152	Phe	Phe	Cys	Cys
TM6	266	Val	Ile	Ile	Ile
TM7	290	Ser	Ser	Ile	Ile

(Tiré de Maggi, 1994)

L'introduction des antagonistes CP-96,345 et RP-67,580 a donc permis la classification du récepteur NK-1 en deux grandes catégories, soit un récepteur NK-1 plus sensible au CP-96,345 (humain, boeuf, cobaye et lapin) et inversement un récepteur NK-1 plus sensible au RP-67,580 (rat, souris et poulet)(Beresford et coll., 1991; Gitter et coll., 1991; McLean et coll., 1991; Snider et coll., 1991; Fardin et coll., 1992a).

D'autre part, les affinités différentielles de l'agoniste sélectif [Sar<sup>9</sup>]SP sulphone pour les récepteurs NK-1 centraux et périphériques du rat suggèrent une hétérogénéité intra-espèce pour ce récepteur (Lew et coll., 1990). Toutefois, la séquence peptidique du récepteur cérébral du rongeur est identique à celle du récepteur isolé à partir de la

glande salivaire du rat (Hershey et Krause, 1990), suggérant une reconnaissance différentielle des tachykinines radioiodées par un autre mécanisme (e.g. degrés variables de N-glycosylation du récepteur à ces deux sites <sup>(15)</sup> (Shigemoto et coll., 1990; Liu et Quirion, 1991)). La même variation d'affinité centrale *versus* périphérique pour un agoniste NK-1 (SP méthylester) a été observée chez le cobaye (Fardin et Garret, 1991). Toutefois, Tousignant et coll. (1991) ont démontré que ces deux récepteurs sont pharmacologiquement identiques et que les variations observées pourraient être reliées à la dégradation différentielle des peptides dans ces tissus (Lew et coll., 1990; Fardin et Garret, 1991; Clerc et coll., 1992). De plus, Fardin et coll. (1992a) ont démontré que l'antagoniste RP-67,580 possède des affinités similaires pour le cerveau ( $K_i = 3.3$  nM) et la glande submaxillaire ( $K_i = 2.9$  nM) de rat. D'une façon générale, ces résultats pourraient être indicatifs d'une hétérogénéité du récepteur NK-1 central *versus* périphérique, toutefois aucune évidence incontestable n'a été avancée.

Un nouveau site de liaison particulièrement sensible au septide (agoniste sélectif du récepteur NK-1) a été démontré dans certains tissus dont l'iléon et les bronches de cobaye et la vessie de rat. En effet, des études utilisant les agonistes sélectifs du récepteur NK-1, SP, [Pro<sup>9</sup>]SP, [Sar<sup>9</sup>]SP sulphone, septide et SP-méthylester sont à la base de nouvelles évidences suggérant l'existence de sous-types intra-espèce du récepteur NK-1 (Sakurada et coll., 1991; Chassaing et coll., 1992; Petit et coll., 1992a). Tous ces agonistes contractent d'une façon plus ou moins équipotente l'iléon de cobaye et curieusement, des études de liaison sur cette préparation ont démontré une absence d'affinité pour les agonistes septide et SP-méthylester ( $IC_{50} = 250-260$  nM) et une forte affinité des agonistes [Sar<sup>9</sup>]SP ou SP ( $IC_{50} = 1.1-1.2$  nM) lorsque mis en compétition avec le radioligands [<sup>3</sup>H]-[Pro<sup>9</sup>]SP ou [<sup>3</sup>H]-SP (Petit et coll., 1992b). De plus, les antagonistes sélectifs du récepteur NK-1, GR-71251 et [D-Pro<sup>9</sup>,Pro<sup>10</sup>,Trp<sup>11</sup>]SP, se sont avérés plus actifs à inhiber les réponses contractiles du septide que celles du [Pro<sup>9</sup>]SP sur une préparation d'iléon de cobaye (Chassaing et coll., 1992; Petit et coll., 1992b). Une dichotomie similaire a été observée avec le septide au niveau de la moelle épinière

---

<sup>15</sup> Toutefois, Kage et coll. (1991) ont rapporté des affinités similaires de la SP pour le récepteur NK-1 glycosylé et non glycosylé.

de la souris (Sakurada et coll., 1991), des bronches du cobaye (Maggi et coll., 1991b; Fardin et coll., 1992b) et de la vessie de rat (Meini et coll., 1993). En résumé ces comportements inusités du septide sur ces préparations ne peuvent pas être clairement conciliés avec la pharmacologie "classique" du récepteur NK-1. Toutefois, plusieurs interrogations concernant les nouveaux récepteurs NK-1 sensibles au septide demeurent en suspend:

- 1- Quel est l'ordre de puissance des tachykinines endogènes pour ce récepteur? En effet, des études de liaison par Meini et coll. (1995) suggèrent que la NKB pourrait être un meilleur ligand que la SP pour ce récepteur. Or ce récepteur ne correspondrait plus à la définition première du récepteur NK-1 où l'ordre de puissance des agonistes naturels est  $SP > NKA > NKB$ . Cette observation devient cruciale dans la nomenclature que nous devons adopter pour ce récepteur.
- 2- Est-ce que l'on retrouve ce récepteur sensible au septide chez l'humain? Les seules évidences à ce sujet proviennent d'une étude de Lee et coll. (1992) qui ont démontré que même si le septide est 300 fois moins puissant que la SP à déplacer le radioligand  $^{125}I$ -SP du récepteur NK-1 de cellules astrocytaires humaines (U 373), il n'est que 42 fois moins puissant que la SP à induire une accumulation de phosphoinositols dans ces mêmes cellules.
- 3- Quelle est la base moléculaire de cette pharmacologie distincte des récepteurs sensibles au septide? Sagit-il d'un gène différent ou d'une maturation différente d'un des gènes déjà connus pour les récepteurs aux tachykinines?

Gether et coll. (1993c) proposent une autre possibilité pouvant expliquer cette dichotomie pharmacologique du récepteur NK-1 sans faire intervenir un nouveau récepteur. En effet, agonistes et antagonistes n'agissant pas au même site sur le récepteur NK-1 (voir section précédente), ils proposent que le septide pourrait agir sur un site extracellulaire différent du site à la SP et aux antagonistes, qui serait plus facilement déplaçable par les antagonistes CP-96,345, GR-82,334 et RP-67,580. Cette interprétation réconcilie le fait que ces antagonistes NK-1 bloquent mieux le septide que la SP. Cette hypothèse propose donc deux sites différents pour les agonistes, distincts

de celui de l'antagoniste sur le récepteur NK-1. Toutefois, aucune étude systématique de mutation des épitopes divergents n'a encore été effectuée.

#### - Récepteur NK-2

Le récepteur NK-2 a été cloné à partir de l'estomac de boeuf (Masu et coll., 1987), de l'estomac de rat (Sasai et Nakanishi, 1989), de la trachée humaine (Gerard et coll., 1990), du jéjunum humain (Kris et coll., 1991) et du génome de la souris (Sundelin et coll., 1992). Lorsque exprimés sur des systèmes cellulaires appropriés (e.g. oocytes), tous ces récepteurs possèdent le critère de base définissant le récepteur NK-2 soit l'ordre de puissance des tachykinines endogènes  $NKA > NKB > SP$ .

Par ailleurs, des sous-types inter-espèces pour le récepteur NK-2 ont été clairement démontrés. La forme "classique" du récepteur NK-2 (NK-2B) retrouvée chez le hamster, le rat et la souris est sensible à l'antagoniste R-396 et la forme "non-classique" du récepteur NK-2 (NK-2A) retrouvée chez l'homme, le bovin, le lapin et le cobaye est sensible à l'antagoniste MEN 10,376 (tableau 4). Ils ont été caractérisés grâce à des études de liaison mettant en relief l'ordre de puissance de plusieurs antagonistes sélectifs pour le récepteur NK-2 sur des préparations monoréceptorielles de toutes ces espèces (Buck et coll., 1990; Burcher et Mussap; 1991; Van Giesbergen; 1991a; b; Maggi et coll., 1990b; 1991a; Patacchini et coll., 1991; Emonds-Alt et coll., 1992). Par ailleurs, l'antagoniste MDL 28,564, sélectif pour le récepteur NK-2B, se comporte comme un agoniste partiel sur le récepteur NK-2A (Buck et coll., 1990; Harbeson et coll., 1990; Patacchini et coll., 1991).

Le tableau 5 souligne les acides aminés de positions variables des segments transmembranaires sur le récepteur NK-2 de l'humain, du rat, du boeuf et de la souris. Malheureusement, les récepteurs NK-2 du lapin et du hamster, qui présentent les différences pharmacologiques les plus contrastantes, ne sont toujours pas clonés. L'homologie inter-espèces des portions TM du récepteur NK-2 (162 résidus) s'élève à 90.7% chez les animaux où ce récepteur a été cloné (Maggi, 1994). Ce qui laisse une variabilité de 15 résidus représentés au tableau 5. La différence la plus marquante se situe entre le rat et le boeuf où 14 de ces 15 résidus variables sont différents, alors que le



rat et la souris sont les plus similaires avec seulement 4 divergences sur une possibilité de 15. Tel que décrit au tableau 4, l'humain et le boeuf possèdent le sous-type NK-2A alors que le rat détient le sous-type NK-2B. Les sept résidus représentés en gras au tableau 5 sont communs à l'humain et au boeuf et différents du rat, et pourraient représenter la base structurale de l'hétérogénéité entre les sous-types du récepteur NK-2. A priori, on ne peut pas juger de l'importance relative de ces résidus dans l'hétérogénéité des récepteurs NK-2 seulement sur la comparaison des acides aminés variables d'une espèce à l'autre. Par conséquent, des études de mutagenèse dirigée demeurent essentielles avant de tirer des conclusions sur leur importance relative. Il est clair que la détermination des séquences pour les récepteurs NK-2 du lapin et du hamster fournira de précieux indices quant à la relation structure-activité.

**Tableau 4. Critères pharmacologiques de distinction entre les récepteurs NK-2A et NK-2B**

Critères de classification du récepteur NK-2A	Critères de classification du récepteur NK-2B
1) MEN 10,376 > L659,877 > R 396	1) L659,877 > R 396 > MEN 10,376
2) MDL 28,564 est un agoniste	2) MDL 28,564 est un antagoniste
Lapin	Hamster
artère pulmonaire	trachée
vas deferens	estomac
bronches	colon
	vessie
Cobaye	Rat
bronches	colon
bassin urinaire	vessie
vésicule biliaire	vas deferens
	iléon et colon
	estomac
Humain	
iléon (muscle circulaire)	
colon (muscle circulaire)	
Boeuf	
vessie	
estomac	

(Tiré de Maggi, 1994)

**Tableau 5. Composition en acides aminés dans les positions variables des segments transmembranaires (TM1 - TM7) du récepteur NK-2 chez différentes espèces.**

Segment Transmembranaire	Position du résidu	Humain	Rat	Boeuf	Souris
TM1	37	Ala	Ala	Thr	Ala
	38	Thr	Thr	Ala	Thr
	49	Thr	Thr	Met	Thr
	53	Ile	Thr	Thr	Thr
TM2	73	Val	Ile	Val	Ile
	88	Ala	Thr	Ala	Thr
TM4	151	Val	Ile	Val	Val
	164	Ser	Ser	Phe	Ser
TM5	200	Val	Val	Ile	Val
	202	Ile	Phe	Ile	Phe
	203	Ala	Val	Ala	Val
	211	Ala	Leu	Val	Val
	215	Val	Gly	Val	Ala
TM6	251	Thr	Ala	Thr	Ala
	257	Leu	Leu	Val	Val

(Tiré de Maggi, 1994)

### - Récepteur NK-3

Finale­ment, l'existence de sous-types pour le récepteur NK-3 a aussi été suggérée récemment (Petitet et coll., 1993) grâce à une étude démontrant l'interférence entre l'antagoniste SR 48,968 et la liaison spécifique du radioligand [<sup>3</sup>H]senktide sur ce récepteur chez le cobaye mais pas chez le rat. Depuis, ces études ont été confirmées et validées par le biais d'essais biologiques dans le laboratoire de Regoli (Nguyen et coll., 1994; Regoli et coll., 1994b). L'antagoniste R-820 est inactif sur une préparation monoréceptorielle NK-3 du cobaye alors qu'il présente un pA<sub>2</sub> de 7.60 sur la veine porte de rat (Regoli et coll., 1994a). D'autre part, l'antagoniste non peptidique SR-142,801 possède une activité pharmacologique sur le récepteur NK-3 qui dépend largement de l'espèce. En effet, il est efficace chez l'homme, la gerbille et le cobaye alors qu'il possède une affinité très faible pour le récepteur NK-3 du rat (Emonds-Alt et coll., 1995). Toutes ces évidences s'accordent pour démontrer l'existence de sous-types inter-espèces pour le récepteur NK-3.

#### iii) Seconds messagers des tachykinines

##### a) Phospholipase C et calcium intracellulaire

La SP contracte les cellules musculaires lisses ou produit une sécrétion cellulaire attribuable en grande partie à une élévation des taux intracellulaires de calcium (Ca<sup>2+</sup>) (Womack et coll., 1988; Merritt et Rink, 1987; Matthews et coll., 1989; Matthijs et coll., 1990). Les réserves intracellulaires et extracellulaires de Ca<sup>2+</sup> semblent être responsables de cette augmentation de la disponibilité calcique dans la cellule stimulée (Merritt et Rink, 1987; Matthews et coll., 1989; Matthijs et coll., 1990). D'une façon générale, les stimuli extracellulaires peuvent augmenter les taux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaires de plusieurs façons. Le système de mobilisation calcique le plus répandu chez les mammifères est celui des inositols polyphosphates (Mitchell, 1975). En effet le système de signalisation inositol polyphosphates/Ca<sup>2+</sup> est associé à l'activation de plusieurs types de récepteurs (facteurs de croissance, hormones et neurotransmetteurs). L'activation d'un tel récepteur couplé à une protéine G stimulera l'activation de la

phospholipase C membranaire qui est à l'origine de la dégradation du phosphatidylinositol [4,5]-bisphosphate (figure 6). Cette voie de signalisation intracellulaire cause d'une part, la formation d'inositols [1,4,5]-trisphosphate ( $IP_3$ ) qui entraîne une relâche de  $Ca^{2+}$  des réserves intracellulaires (Matthews et coll., 1989) et d'autre part, la formation de diacylglycerol (DAG) qui active entre autre la protéine kinase C (PKC), impliquée dans l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant favorisant ainsi une hausse des taux intracellulaires du calcium fonctionnel (figure 6).

Des évidences suggèrent que les récepteurs NK-1 (Hanley et coll., 1980; Watson et Downes, 1983; Holzer et Lippe, 1985), NK-2 (Watson, 1984; Bristow et coll., 1987) et NK-3 (Guard et coll., 1988) des tachykinines sont couplés à l'hydrolyse des phospholipides inositols (tableau 2; figure 6). Même si ce mécanisme de seconds messagers est partagé par les trois récepteurs aux tachykinines, le récepteur NK-1 est de loin le mieux caractérisé à cet égard. Par conséquent, la plupart des résultats exposés dans cette section traite de ce récepteur.

#### b) Tachyphylaxie du récepteur NK-1

Suivant l'application de concentrations maximales de SP sur des cellules AR4-2J<sup>(16)</sup>, on observe une augmentation substantielle et rapide d' $IP_3$  intracellulaire qui persiste pendant une période transitoire d'environ 1-2 min (Sugiya et coll., 1987; Bird et coll., 1991). Donc, à l'instar de plusieurs autres récepteurs, le récepteur NK-1 subit une désensibilisation. Même si cette désensibilisation survient rapidement, elle persiste pour une période de 1 à 2 heures, puis la SP retrouve sa pleine activité sur ces cellules pancréatiques (Sugiya et coll., 1987). Curieusement, sous l'application continue de SP sur des cellules de la glande parotide de rat, un niveau substantiel résiduel stable d' $IP_3$  et de  $Ca^{2+}$  intracellulaire supérieur à la ligne de base est maintenu pendant de longues

---

<sup>16</sup> Contrairement aux cellules pancréatiques acinaires normales, les cellules AR4-2J qui sont dérivées d'un pancréatome de rat expriment de grandes quantités de récepteurs NK-1. Pour cette raison, elles sont utilisées pour caractériser les mécanismes de seconds messagers suivant l'activation du récepteur NK-1 (Womack et coll., 1985).

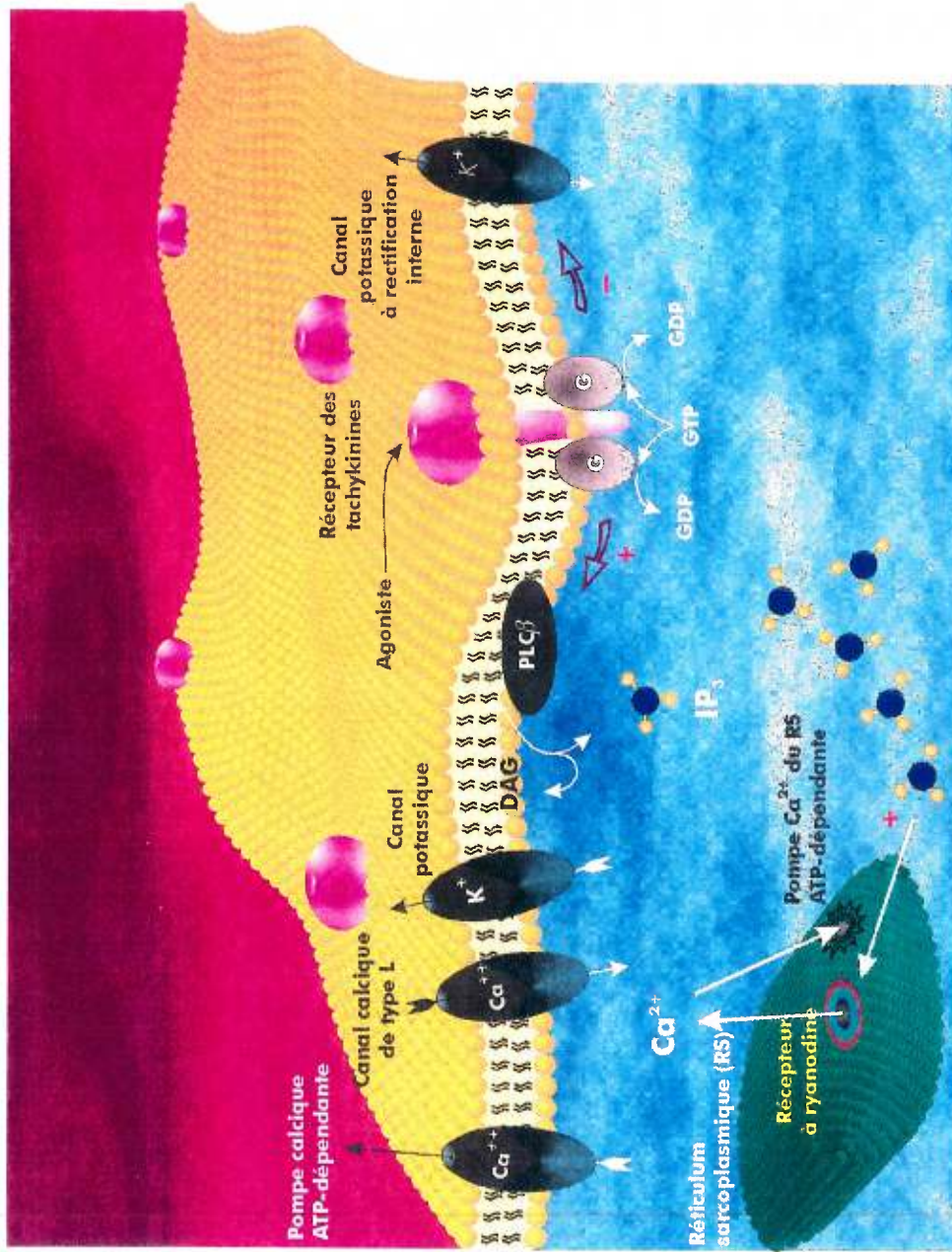


Figure 6. Effets des tachykinines sur l'excitabilité cellulaire.

*Figure 6.* Suivant l'activation des récepteurs aux tachykinines, des protéines G (possiblement  $G_q$  ou  $G_{11}$ , voir texte) stimulent une isoforme  $\beta$  de la phospholipase C (PLC $\beta$ ) pour engendrer une synthèse d'inositols [1,4,5]-trisphosphate (IP $_3$ ) et du diacylglycérol (DAG) à partir de phosphatidylinositol membranaire. Ces protéines G peuvent aussi inhiber d'autres effecteurs tel le canal potassique à rectification interne et le canal potassique à courant-M dans les neurones. Ces mécanismes favorisent une excitation cellulaire d'une part, en augmentant les niveaux calciques intracellulaires (par les réserves intracellulaires et extracellulaires) et d'autre part, en diminuant les niveaux potassiques intracellulaires (en augmentant la conductance au potassium). Par conséquent, l'activation des récepteurs aux tachykinines sur la cellule musculaire lisse entrainera une augmentation des taux de calcium intracellulaire générant une contraction. D'autre part, l'activation des récepteurs aux tachykinines sur le neurone entrainera une augmentation de la conductance potassique favorisant l'excitation neuronale. Par ailleurs, l'excitation du récepteur NK-1 sur les cellules endothéliales entrainera une hausse du calcium intracellulaire et ainsi stimulera la forme constitutive de la synthase d'oxide nitreux calcium dépendant.

périodes après la réponse transitoire initiale. Ce type de réponse contraste avec le retour rapide à la ligne de base suivant l'application de SP sur les cellules AR4-2J. Pour expliquer cette dualité de réponses à la SP, Putney (1994) propose une seconde population de récepteur NK-1 présente sur les cellules de la glande parotidienne qui n'est pas susceptible à la désensibilisation. Toutefois, il n'y a pas d'évidences pour cette hétérogénéité de récepteur NK-1 sur la glande parotidienne de rat. Quoiqu'il en soit, la désensibilisation à la SP est homologue. En effet, il y a absence de désensibilisation croisée du récepteur NK-1 lorsqu'un autre récepteur couplé à la PLC est activé et inversement, la désensibilisation du récepteur NK-1 n'est pas partagée par les autres récepteurs couplés à la PLC suivant l'administration de fortes doses de SP (Sugiya et coll., 1987). De plus, lors de la désensibilisation du récepteur NK-1, on observe simultanément une chute des sites de liaison à la SP membranaire ce qui suggère l'implication de mécanismes de séquestration et de "downregulation" dans la désensibilisation des récepteurs NK-1. Par ailleurs, la vitesse de dégradation de ces inositols polyphosphates, suivant l'activation du récepteur NK-1, est proportionnelle à la densité de liaison avec la [<sup>3</sup>H]SP dans le SNC du rat (Mantyh et coll., 1984a).

Selon Putney (1994), la désensibilisation homologue du récepteur NK-1 semble plutôt opérer par un mécanisme similaire à celui retrouvé pour le récepteur  $\beta$ -adrénergique couplé à l'adénylate cyclase (Benovic et coll., 1988). En effet, la désensibilisation de ce récepteur passe aussi par des mécanismes de séquestration et de "downregulation" qui résulteraient d'une phosphorylation du récepteur par une kinase spécifique ( $\beta$ -adrenergic receptor kinase; Strasser et coll., 1986).

### c) Effets des tachykinines sur les canaux ioniques

Depuis le début des années 70, on sait que l'application des tachykinines sur des motoneurones spinaux entraîne une excitation neuronale (Konishi et Otsuka, 1971; Otsuka et coll., 1972). Depuis, cet effet exciteur des tachykinines a été reproduit dans une multitude de types neuronaux (e.g. Konishi et Otsuka, 1974; Krnjevic et Morris, 1974; Henry et coll., 1975; Henry, 1976). Ces auteurs ont insisté sur la lenteur de



l'excitation neuronale comparativement à celle observée avec le glutamate. Cette lenteur origine du fait que les tachykinines activent leur récepteur puis une cascade d'évènements impliquant plusieurs molécules de transduction avant d'atteindre l'effecteur. Les médiateurs qui ont le plus retenu l'attention sont la protéine G, l' $IP_3$  ainsi que le métabolisme de l'acide arachidonique. Les effecteurs principaux dans les effets excitateurs des tachykinines sont : 1) l'inhibition des canaux potassiques à rectification interne; 2) l'inhibition des canaux potassiques à courant-M; 3) l'activation de canaux dépolarisants non-sélectifs ; et 4) la fermeture des canaux calciques voltage-dépendant de type N (Nakajima et Nakajima, 1994).

- inhibition des canaux potassiques à rectification interne

A l'inverse de la somatostatine (Inoue et coll., 1988) et de la Met-enképhaline (North et coll., 1987), la SP supprime le courant potassique à rectification interne via l'activation d'une protéine G insensible aux toxines de pertussis et du choléra (Nakajima et coll., 1988) qui pourrait bien être les isoformes  $G_q$  ou  $G_{11}$ . En effet, les sous-unités  $\alpha$  des protéines  $G_q$  et  $G_{11}$  activent putativement la PLC (principalement l'isoforme  $PLC\beta_1$ ) (Gutowski et coll., 1991; Smrcka et coll., 1991; Taylor et coll., 1991; Lee et coll., 1992; Wu et coll., 1992). Le récepteur NK-1, ainsi couplé aux protéines  $G_q$  ou  $G_{11}$ , permettrait à la SP d'activer la PLC et de fermer des canaux potassiques par l'activation de la même protéine G (figure 6). Récemment, Velimirovic et coll. (1991) ont tenté de décrire l'interaction entre les effets dépolarisants et hyperpolarisants de la SP et de la somatostatine sur des neurones du locus coeruleus. D'une façon intéressante, l'application de SP a complètement bloqué le courant rectificateur potassique entrant induit par la somatostatine. La SP ainsi appliquée a même ramené le courant potassique à un niveau inférieur à celui observé avant l'application de somatostatine. Ces études suggèrent que les deux neuropeptides agissent sur le même canal potassique, mais à l'opposé l'un de l'autre.

- inhibition des canaux potassiques à courant-M

Le courant-M est un courant potassique temps- et voltage-dépendant qui a été caractérisé pour la première fois par sa sensibilité aux agonistes muscariniques (Brown et Adams, 1980; Adams et coll., 1982). Ce canal ionique dont la conductance unitaire est très faible, de l'ordre du pS, n'est activé qu'à des potentiels membranaires supérieurs à -60mV. (Neher et coll., 1988; Owen et coll., 1990). A l'instar des agonistes muscariniques et de l'hormone de relâche de l'hormone lutéinisante (LHRH), les tachykinines (SP, NKA, élédoisine, kassinine et physalaemine) inhibent ce courant-M potassique (Nowak et McDonald, 1982; Jones, 1985) et ainsi, augmentent le nombre de décharges lors du passage d'un courant dépolarisant. En effet, l'inhibition du canal potassique à courant-M, en soit, n'est pas suffisant pour induire la dépolarisation neuronale (Jan et Jan, 1982). Cet effet inhibiteur de la SP sur les canaux potassiques à courant-M a aussi été rapporté sur des cellules musculaires lisses (Sims et coll., 1986). Comme les canaux potassiques à rectification interne, ces canaux potassiques à courant-M sont sensibles au GTP $\gamma$ S (analogue non-hydrolysable du GTP), et deviennent irréversiblement inhibés par l'application subséquente de SP, LHRH ou de muscarine (Lopez et Adams, 1989), suggérant l'implication des protéines G dans le processus d'inhibition du canal potassique. Par ailleurs, tout comme pour la muscarine et le LHRH (Pfaffinger, 1988; Lopez et Adams, 1989), les effets de la SP sont insensibles à la toxine de pertussis (Tokimasa et coll., 1992) suggérant l'interaction du récepteur NK-1 avec une protéine G insensible à cette toxine, donc possédant des caractéristiques identiques à la protéine G qui stimule la PLC ou qui inhibe le canal potassique à rectification interne (voir sections précédentes). Higashida et Brown proposent alors que les seconds messagers issus de l'activation de la PLC pourraient être responsables du blocage des canaux potassiques à courant-M. En effet, les esters de phorbol et analogues du DAG inhibent le courant-M sur des cellules hybrides neuroblastome-gliome (Higashida et Brown, 1986; Brown et Higashida, 1988), suggérant un rôle pour la PKC.

- activation de canaux dépolarisants non-sélectifs

Deux caractéristiques favorisant la dépolarisation ont été observées suivant l'application de SP dans différents tissus, soit une baisse de la conductance membranaire aux canaux potassiques (voir sections précédentes) et une augmentation de la conductance membranaire à des canaux ioniques non-sélectifs (Otsuka et Konishi, 1977; Nicoll, 1978). Les premiers à avoir analysé cette dualité de mécanismes ioniques de dépolarisation membranaire suivant l'application de SP sur des neurones ganglionnaires mésentériques du cobaye, ont interprété ces variations de courants ioniques comme étant une hausse de la perméabilité sodique combinée à une baisse de la perméabilité potassique (Dun et Minota, 1981). Plus tard, on a rapporté une inhibition des courants-M potassiques combinés à une augmentation de conductance cationique  $\text{Ca}^{2+}$ -sensible et voltage indépendant suivant l'application de SP sur des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Murase et coll., 1986; 1989) et sur des neurones sympathiques ganglionnaires (Konishi et coll., 1992). D'autres combinaisons de modulations ioniques ont été rapportées concernant le mécanisme de dépolarisation de la SP. Sur des neurones sympathiques, la SP, la NKA et la NKB semblent ouvrir des canaux cationiques non-sélectifs et fermer des canaux potassiques à rectification interne sur des neurones du locus coeruleus (Koyano et coll., 1991; 1993; Shen et North, 1992). D'une façon générale, la suppression d'une conductance potassique et l'activation d'un courant non-sélectif, initié par les tachykinines, pourraient être à l'origine de la dépolarisation lente des tachykinines. Dépendant des préparations, ces deux composantes peuvent avoir une contribution variable, où, une peut dominer l'autre dans certaines cellules alors que dans d'autres cas, les deux mécanismes pourraient contribuer substantiellement. La voie de transduction reliant l'activation du récepteur NK-1 à l'ouverture des canaux ioniques non sélectifs est inconnue. Toutefois certaines évidences semblent suggérer l'absence de participation des protéines G (Koyano et coll., 1991; 1993) alors que d'autres ont démontré une dépendance calcique dans ces effets des tachykinines (Konishi et coll., 1992).

- inhibition des canaux calciques de type N

La SP supprime des courants calciques voltage-dépendants de type N sur des neurones sympathiques de la grenouille et du rat (Bley et Tsien, 1990; Elmslie, 1992; Shapiro et Hille, 1993) et sur des neurones cholinergiques en culture provenant du noyau basalis (Grigg et coll., 1991). Comme pour l'activation de la PLC ou l'inhibition des courants potassiques (voir sections précédentes), l'inhibition du canal calcique de type N induit par l'application de SP est insensible à la toxine de pertussis et au GDP $\beta$ S (analogue stable du GDP) (Shapiro et Hille., 1993). Par conséquent, cette inhibition du canal calcique pourrait bien passer par la même protéine G que les autres types de modulation ioniques de la SP <sup>(17)</sup>, soit la G<sub>q</sub> ou la G<sub>11</sub> (voir sections précédentes). De plus, deux équipes suggèrent que la protéine G qui couple le récepteur NK-1 pourrait agir directement sur le canal calcique de type N (Bley et Tsien, 1990; Shapiro et Hille, 1993).

- signification fonctionnelle de cette modulation ionique

Le canal potassique à rectification interne retrouvé dans le SNC et en périphérie est un des effecteurs de la SP. Alors que dans les cellules auriculaires du coeur, ces canaux, ne subissent qu'une modulation inhibitrice (hyperpolarisation), au niveau central, ce canal peut être régulé dans les deux sens, soit vers l'ouverture par des neurotransmetteurs inhibiteurs ou vers la fermeture du canal par des neuromédiateurs excitateurs comme la SP. Contrairement aux mécanismes de transduction de la SP et des autres transmetteurs qui inhibent ce canal, les signaux qui ouvrent ce canal sont sensibles à la toxine de pertussis. Tel qu'illustré à la figure 7, ce canal potassique à rectification interne est activé à des valeurs de potentiels inférieurs à -60 mV, donc à des potentiels inférieurs au potentiel d'action dans les zones où l'on observe des PPSE et PPSI lents. Le niveau d'ouverture de ces canaux est donc crucial dans la détermination

---

<sup>17</sup> Sauf pour l'ouverture des canaux non-sélectifs (section précédente) qui ne semblent pas passer par l'activation d'une protéine G.

de l'état d'excitabilité du neurone. Ces canaux sont donc impliqués dans la génération de PPSE lent des tachykinines.

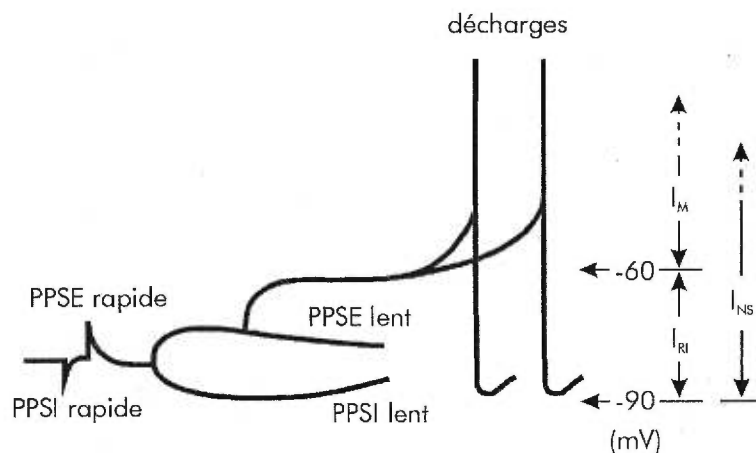


Figure 7. Schéma résumant l'échelle d'action des courants potassiques à rectification interne ( $I_{RI}$ ) et à courant-M ( $I_M$ ) ainsi que des canaux non-sélectifs ( $I_{NS}$ ) en relation avec les potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) et inhibiteurs (PPSI) rapides et lents (tiré de Nakajima et Nakajima, 1994).

Pour sa part, le canal potassique à courant-M est actif à des potentiels supérieurs à -60 mV (figure 7). Donc, l'effet des tachykinines sur ce courant potassique est très déterminant dans la génération d'un potentiel d'action étant donné son échelle d'action près du seuil d'excitabilité neuronale. Par contre, ce courant ne participe pas dans la génération des PPSE ou PPSI lents des tachykinines comme le témoigne la figure 7.

A première vue, l'inhibition des canaux calciques de type N (mécanisme hyperpolarisant) combiné à l'inhibition des canaux potassiques (mécanisme dépolarisant) semble illogique d'un point de vue fonctionnel. Pour expliquer ce paradoxe, Shapiro et Hille (1993) suggèrent que l'inhibition des canaux calciques de type N serait plutôt un mécanisme de rétroaction négatif présynaptique sur la relâche

de SP. En effet, l'inhibition de ces canaux calciques suivant l'application de SP a lieu dans des neurones ganglionnaires sympathiques contenant de la SP (Shapiro et Hille, 1993). Ce mécanisme est déjà bien caractérisé dans la transmission noradrénergique où le récepteur  $\alpha_2$ -adrénergique en présynaptique supprime la relâche ultérieure de norépinéphrine (Lipscombe et coll., 1989). Bley et Tsien (1990) proposent une autre signification fonctionnelle à cette inhibition des canaux calciques. Selon eux, cette inhibition d'entrée de calcium à l'intérieur du neurone réduirait l'activation des canaux potassiques  $Ca^{2+}$ -dépendant et ainsi favoriserait une excitation soutenue sans adaptation. De plus, il est bien documenté qu'une augmentation soutenue des taux intracellulaires de calcium peut être dommageable pour le neurone. Ceci est particulièrement vrai pour les effets cytotoxiques du glutamate qui à forte dose peut induire des excitations prolongées. Ainsi, en bloquant les canaux calciques de type N, la SP protège le neurone des effets cytotoxiques du calcium lors d'excitations prolongées.

D'autre part, la relation entre ces modulations ioniques et l'activation de la PLC au niveau du neurone demeure inconnue. Selon Nakajima et Nakajima (1994), la production d'inositol polyphosphate pourrait avoir un rôle dans la signalisation à long terme : i.e. potentiation à long terme, régulation génique, croissance, plasticité, etc. Par ailleurs, Hille (1992) insiste sur l'avantage de la signalisation excitatrice couplée aux protéines G qui permet l'apparition d'un potentiel synaptique lent qui peut durer quelques minutes sans aucun remodelage de la machinerie cellulaire du neurone.

#### d) Autres seconds messagers des tachykinines

D'autres mécanismes de seconds messagers ont été proposés dont la guanine monophosphate cyclique (GMPc; Sjödin et coll., 1980; Schini et coll., 1990) et l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc; Akasu et Tokimasa, 1989) dans l'action de la SP.

## 5. Fonctions des tachykinines

A l'instar d'autres peptides bioactifs, les tachykinines sont impliquées dans une foule de fonctions biologiques dont la régulation de la pression artérielle, la contraction musculaire lisse (viscères), l'extravasation plasmatique (capillaires), la sécrétion cellulaire (glandes salivaires, mastocytes, pancréas, intestin, etc.), la relâche de neurotransmetteurs (e.g. acétylcholine des terminaisons parasympathiques et noradrénaline des terminaisons sympathiques) et dans la modulation de l'activité neuronale visant à contrôler l'équilibre hydrosodé.

La section qui suit reprend ces rôles des tachykinines dans un contexte général en essayant de mettre l'accent sur les éléments de régulation cardiovasculaire et de l'activité comportementale par le SNC. Afin de saisir l'implication centrale des tachykinines, il est approprié d'inclure une description sommaire de la localisation centrale des tachykinines et de leurs récepteurs en fonction des rôles qui leur ont été attribués dans des études fonctionnelles (figure 8; tableau 6).

Les tachykinines sont aussi libérées en périphérie suite à une stimulation antidromique des afférences sensitives primaires et ainsi participent dans le processus de l'inflammation neurogénique à travers plusieurs mécanismes. Cette action périphérique des tachykinines sera aussi discutée brièvement ce qui permettra au lecteur de mieux saisir le rôle global de cette famille de peptides.

### i) Système nerveux central

Une grande quantité d'immunoréactivité à la SP est retrouvée dans plusieurs groupes de corps cellulaires neuronaux ainsi que dans un vaste réseau de fibres nerveuses du SNC (Jancsó et coll., 1977; Cuello et Kanazawa, 1978; Ljungqdahl et coll., 1978a; b; Cuello et coll., 1982; Sakanaka et coll., 1982). La figure 8 décrit schématiquement l'organisation centrale des neurones contenant la SP et leurs projections. L'innervation du SNC immunoréactive à la NKA, est plus ou moins parallèle à celle de la SP (tableau 6) (Arai et coll., 1987; Kanazawa et coll., 1984; Ogawa



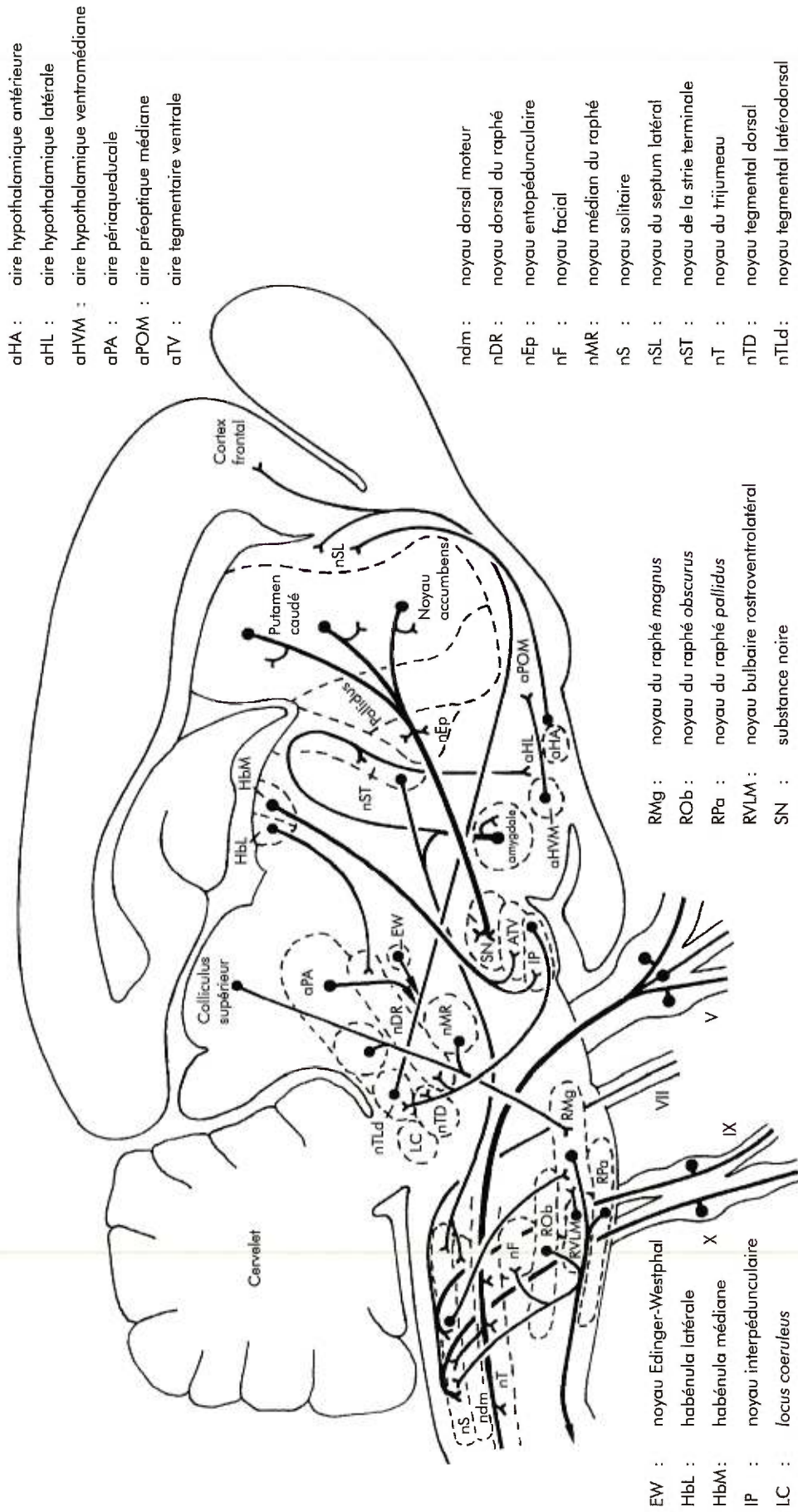


Figure 8. Groupes cellulaires et projections contenant de la substance P dans le système nerveux central du rat (modifié de Otsuka et Yoshika, 1993).



et coll., 1985; Tateishi et coll., 1989; Shults et coll., 1985), alors que celles de la NKB et du NPK possèdent une distribution distincte (Arai et Emson, 1986). Tel que démontré au tableau 6, les récepteurs NK-1 et NK-3 des tachykinines possèdent aussi une distribution vaste et distincte dans le SNC du rat (Beaujouan et coll., 1986; Buck et coll., 1986; Saffroy et coll., 1994; Nakada et coll., 1994). En revanche, la présence du récepteur NK-2 dans le SNC chez le rat demeure très controversée (Mantyh et coll., 1989; Dam et coll., 1990; Tsuchida et coll., 1990) et pourrait, tout au plus, représenter une très petite proportion des récepteurs des tachykinines à ce niveau.

Tableau 6. Distribution des tachykinines et de leurs récepteurs dans le système nerveux central du rat

Régions	Tachykinines, pmol/g			Récepteurs		
	SP	NKA	NKB	NK-1	NK-2	NK-3
Cortex cérébral	7.0	4.0	2.9	—	—	++++
Striatum	312.2	26.2	1.2	++++	—	—
Globus pallidus	114.7	68.9	8.3			
Substance noire	1154.2	115.0	2.8	—	—	—
Aire tegmentaire ventrale	115.4	68.9	17.2	—	—	+
Noyau accumbens	122.9	70.4		+++	—	—
Hippocampe	4.1	3.0	1.1	++	—	+
Hypothalamus latéral	201.4	171.3	31.4	+	—	—
Habenula	406.0	240.2		++	—	+
Noyau interpedunculaire	474.6	168.3		++	—	++
Cervelet	4.7	1.6	1.6	++	—	—
Noyau solitaire	459.0	389.2	21.7	+++	—	++++
Noyaux du raphé	275.0	83.0		+	—	—
Medulla oblongata	226.4	71.1	7.2	++	—	—

**Tableau 6. Distribution des tachykinines et de leurs récepteurs dans le système nerveux central du rat**

Régions	Tachykinines, pmol/g			Récepteurs		
	SP	NKA	NKB	NK-1	NK-2	NK-3
Moelle épinière						
Corne dorsale	503.7	65.9	9.1	++	—	++++
Noyau intermédiolatéral	121.6	126.0	31.6	++++	—	—
Corne ventrale	117.4	16.1	2.0	++	—	—

Tiré de Otsuka et Yoshioka, 1993

a) Régulation des fonctions cardiovasculaires

Deux particularités importantes sont associées à la régulation nerveuse de la circulation. D'une part, les effets engendrés par l'activité nerveuse se manifestent très rapidement et d'autre part, le système nerveux peut exercer un contrôle intégré de la fonction circulatoire dans plusieurs territoires simultanément. Par exemple, le maintien d'une pression artérielle adéquate peut nécessiter des ajustements nerveux ayant pour effet de modifier le débit sanguin dans plusieurs territoires vasculaires pour s'opposer aux mécanismes locaux de contrôle de la circulation. Les mécanismes d'homéostasies cardiovasculaires centraux sont très complexes et encore très mal connus. Les centres vasomoteurs "pacemaker" du bulbe rachidien (figure 10) auraient un contrôle direct sur les efférences sympathiques, responsables du tonus vasomoteur, et parasympathiques du système nerveux autonome (figure 12). Les afférences primaires ainsi que plusieurs noyaux du cerveau peuvent influencer l'activité intrinsèque du centre vasomoteur et ainsi réguler la balance sympathique / parasympathique de l'organisme en fonction de l'environnement.

Les tachykinines participent dans les processus de l'homéostasie cardiovasculaire, pratiquement dans tous les noyaux ayant une vocation visant à contenir l'intégrité cardiovasculaire. Le SNC peut être divisé en trois grandes régions anatomiques distinctes toutes aussi importantes les unes que les autres dans l'intégration cardiovasculaire. Il s'agit des régions de l'encéphale (structures limbiques, aire tegmentale ventrale), bulbaire et pontique (centre vasomoteur, noyau caudoventrolatéral, noyau solitaire, noyau ambigu, locus coeruleus, noyaux du raphé) et spinale (colonne intermédiolatérale).

Pour mieux situer les tachykinines dans le contexte du contrôle cardiovasculaire central, cinq figures (figures 9-13) représentent les principales connexions centrales dans le contrôle cardiovasculaire. Les afférences majeures vers le noyau intermédiolatéral de la moelle épinière et vers le "centre vasomoteur" bulbaire sont représentées aux figures 9 et 10, respectivement. La figure 11 indique les voies connues originant du noyau solitaire (site de terminaison des afférences du baroréflexe). Finalement, les figures 12 et 13 résument les voies centrales proposées comme étant à l'origine de l'innervation périphérique cardiovasculaire, et contrôlant la sécrétion neuroendocrinienne de l'hypothalamus, respectivement.

#### - Diencephale

Situé au cœur du système limbique, l'hypothalamus possède des voies de communication avec tous les niveaux de ce système. De plus, l'hypothalamus et les structures associées envoient des signaux efférents vers quatre destinations: 1) à travers le tronc cérébral jusqu'à la formation réticulée du mésencéphale, de la protubérance et du bulbe; 2) vers plusieurs régions du diencephale et du télencéphale; 3) vers l'infundibulum pour contrôler la plupart des fonctions sécrétrices de l'hypophyse antérieure et postérieure; 4) directement vers les neurones préganglionnaires sympathiques de la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière. En résumé, avec moins de 1% de la masse cérébrale, l'hypothalamus est néanmoins la plus importante de toutes les voies motrices efférentes du système limbique en contrôlant la plupart des fonctions végétatives et endocriniennes de l'organisme et plusieurs aspects comportementaux.

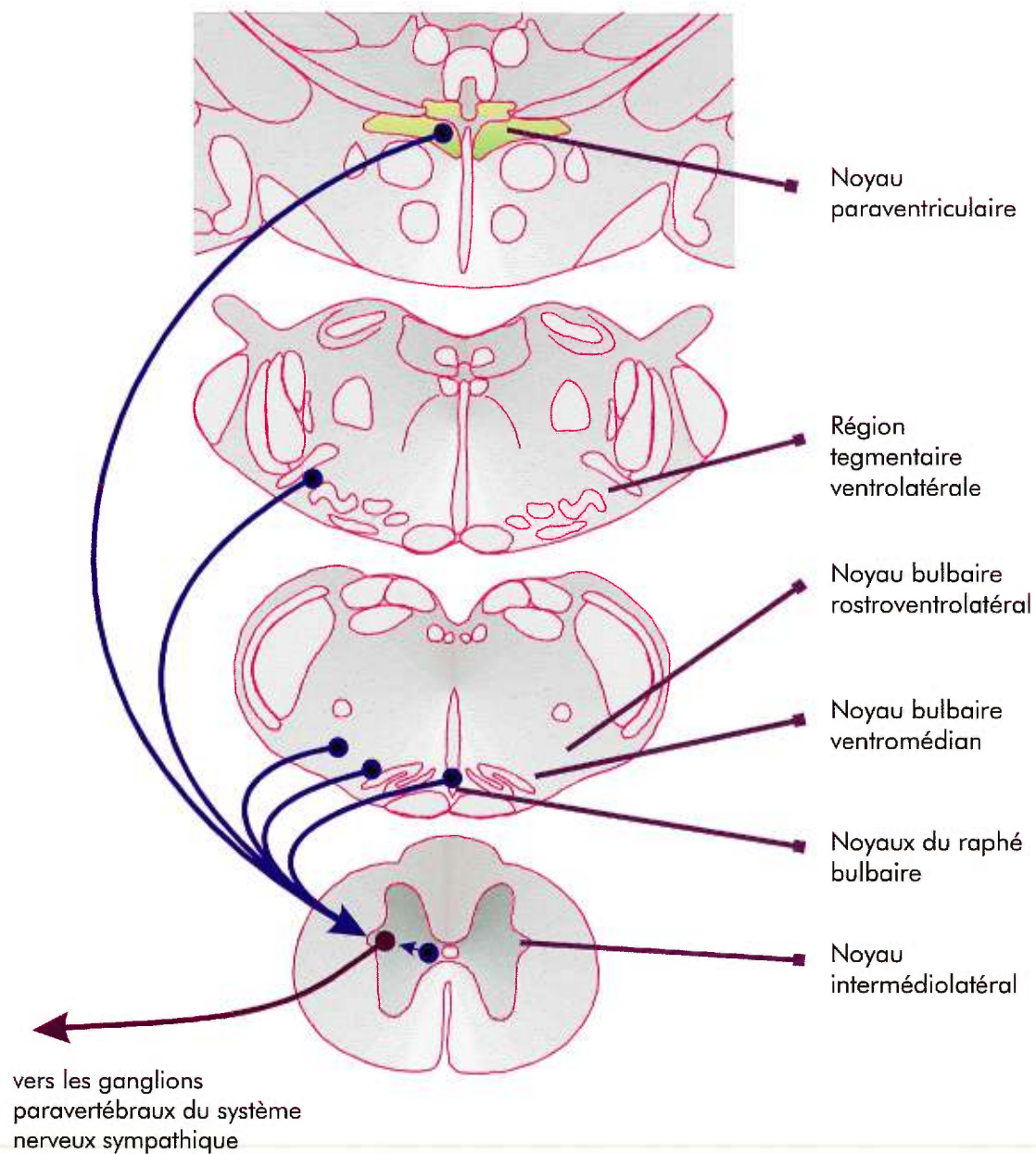


Figure 9. Principales voies descendantes projetant vers les neurones préganglionnaires sympathiques de la colonne intermédiolatérale.

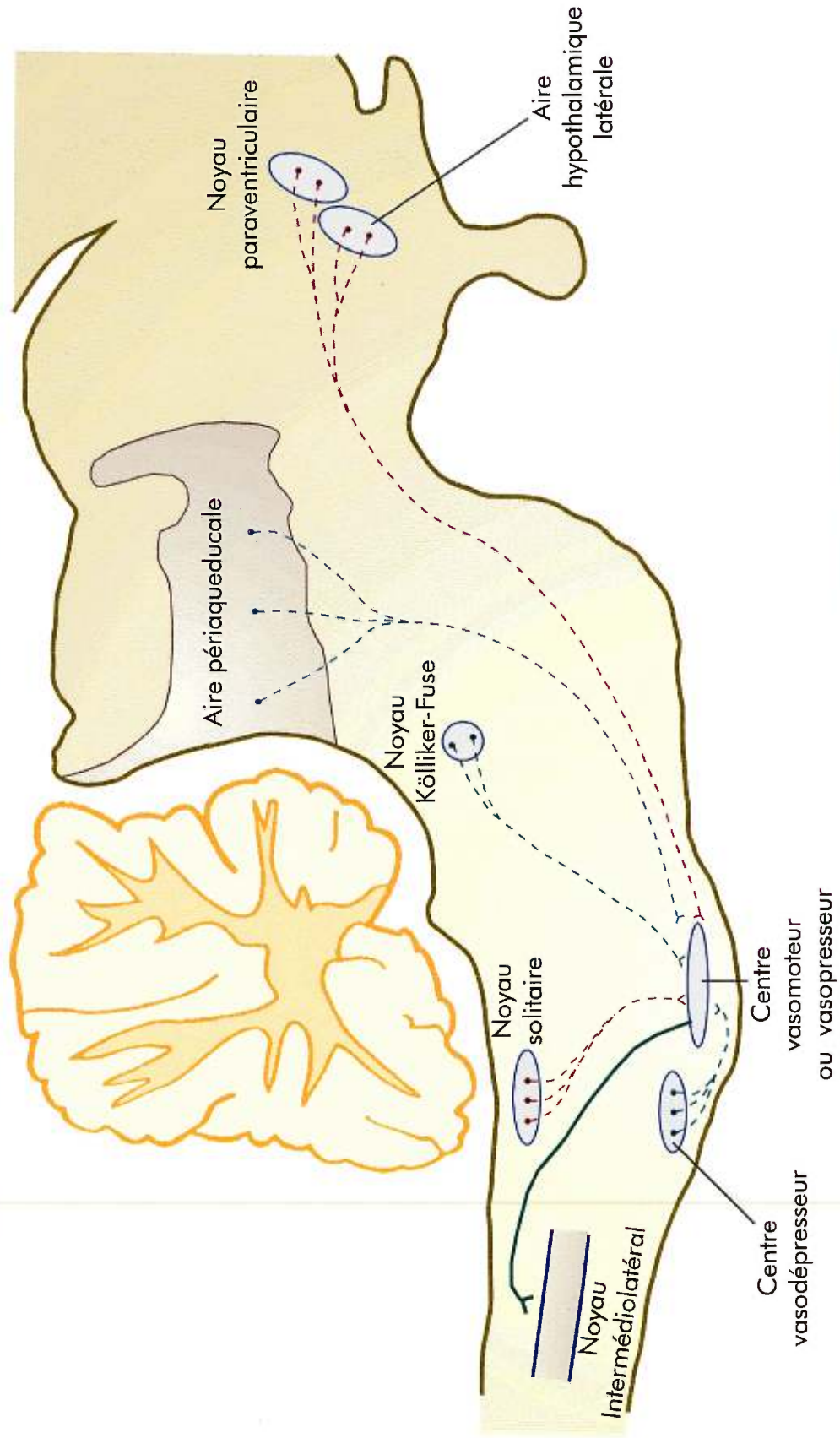


Figure 10. Principales afférences ( - - - - ) et efférences ( — ) du centre vasomoteur bulbaire (noyau bulbaire rostroventrolatéral) chez le rat. Le centre vasodépresseur est le noyau bulbaire caudoventrolatéral.



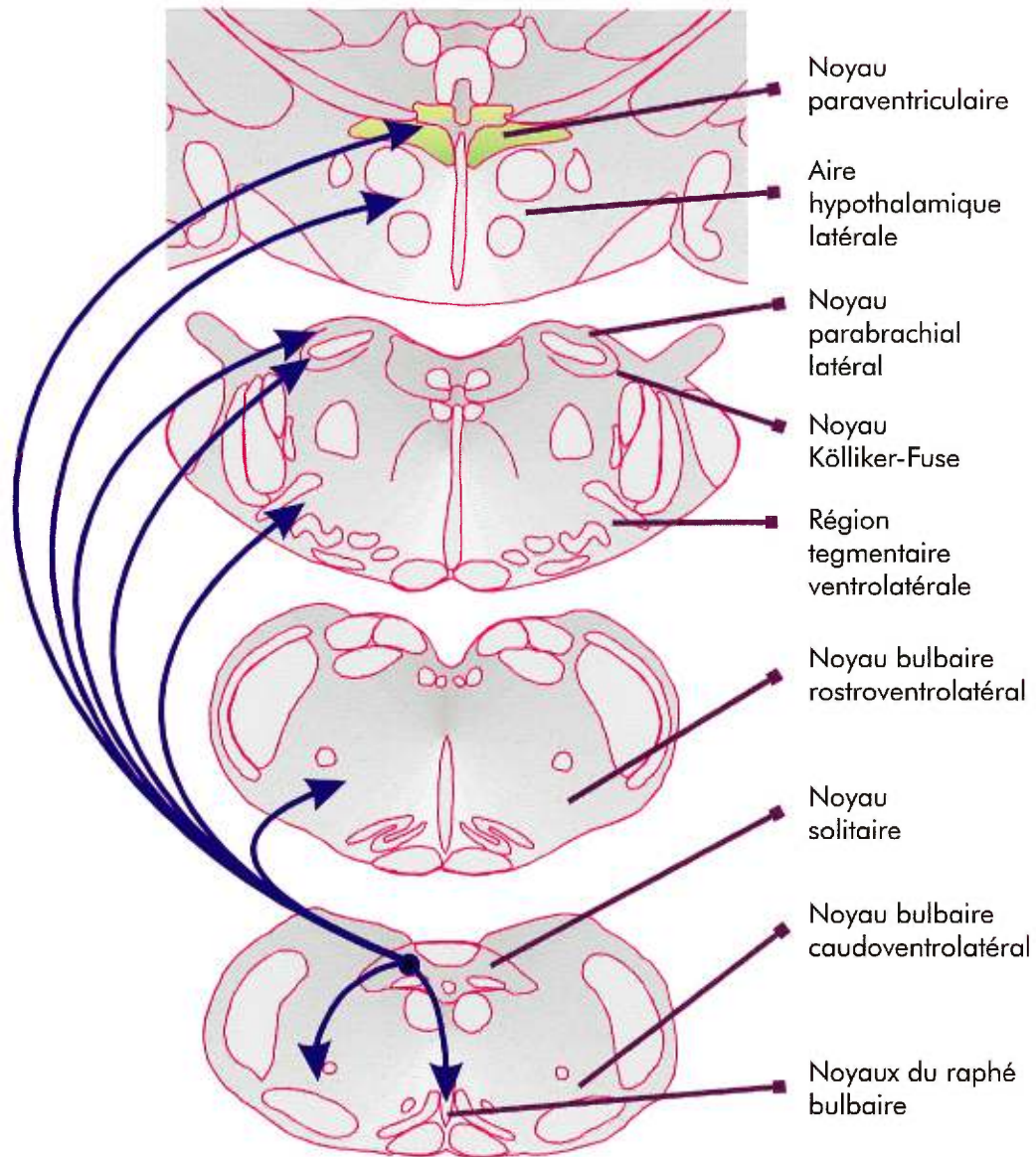


Figure 11. Principales voies efférentes projetant du noyau solitaire vers la moelle épinière, le bulbe, la protubérance et l'hypothalamus ayant des fonctions cardiovasculaires.

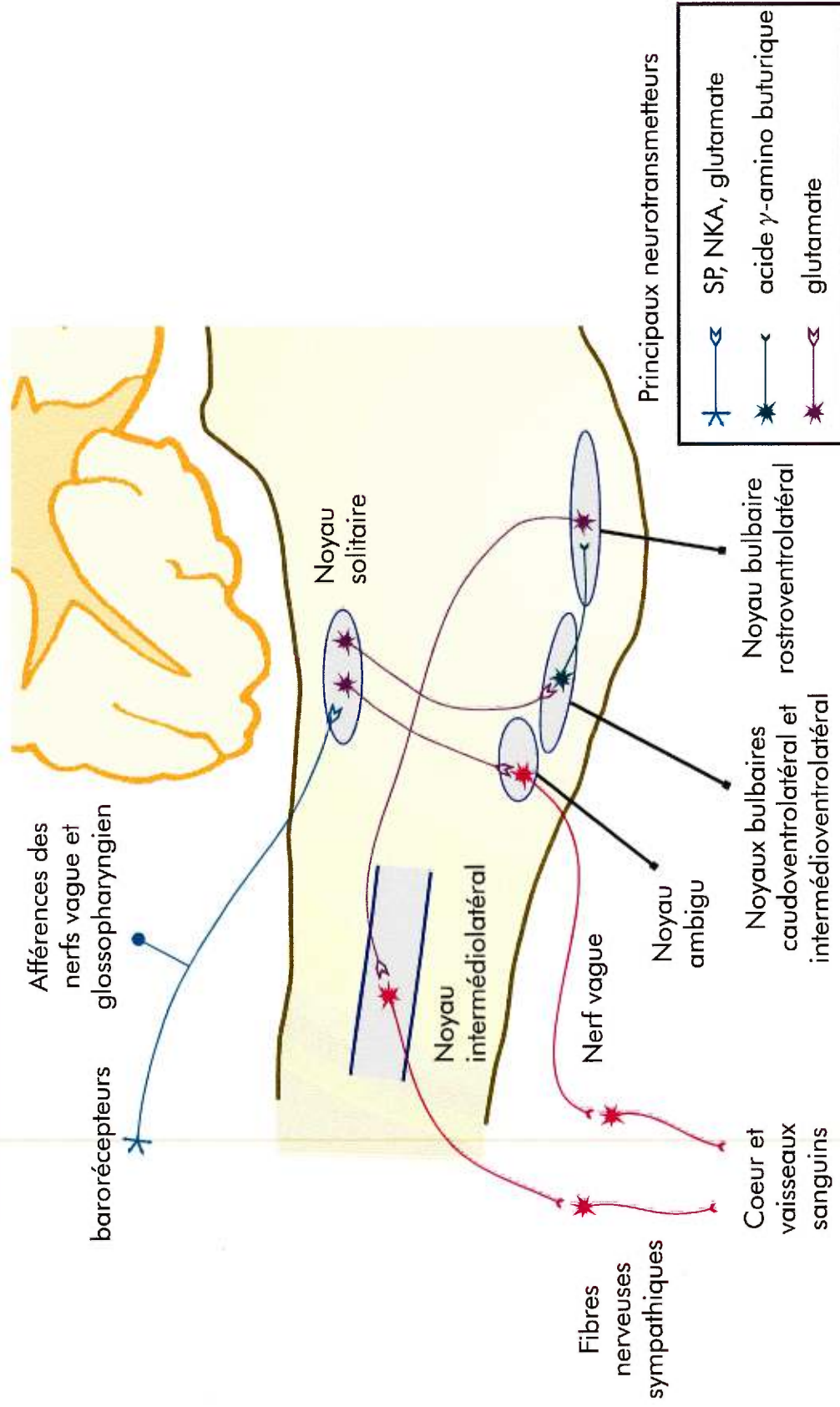


Figure 12. Voies centrales proposées comme étant l'origine de l'innervation cardiovasculaire périphérique

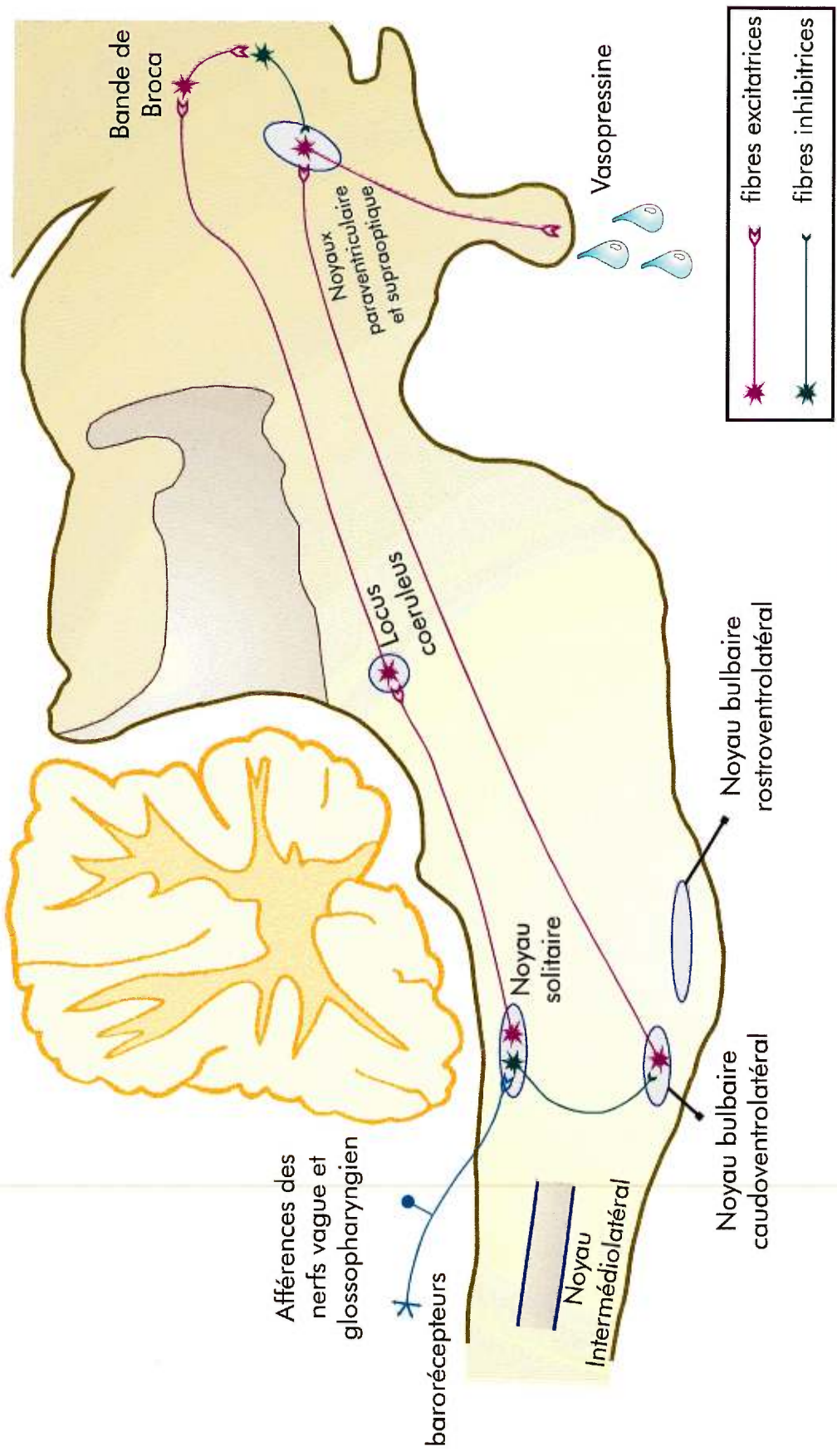


Figure 13. Voies centrales proposées dans le contrôle de la sécrétion neuroendocrinienne de l'hypothalamus.



Originellement, l'hypothalamus a été divisé en deux régions fonctionnelles distinctes, soit la portion rostrale dépressive et la région caudale pressive (Pitts et coll., 1941). Toutefois plusieurs études fonctionnelles et électrophysiologiques ont démontré que l'excitation de tous les corps cellulaires hypothalamiques provoquait des réponses dépressives avec l'exception du noyau paraventriculaire (PVN), des régions latérales et postérieures de l'hypothalamus et des régions autour du fornix (Hilton et Redfern, 1986; Sun et Guyenet, 1987; Gelsema et coll., 1989; Spenser et coll., 1989; 1990; Allen et Cechetto, 1992). Au niveau du PVN, des réponses pressives et dépressives ont été rapportées (Yamashita et coll., 1987; Gelsema et coll., 1989; Kannan et coll., 1989). Par ailleurs, l'application d'un antagoniste du GABA <sup>(18)</sup> dans les noyaux postérieur et latéral de l'hypothalamus chez le rat conscient entraîne une augmentation de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et de l'activité sympathique alors qu'un agoniste du GABA produit les effets contraires (Wible et coll., 1988). A quelques exceptions près, ces réponses cardiovasculaires étaient accompagnées de comportements d'attention et d'éveil. De plus, l'administration de muscimol (un agoniste sélectif GABA-A) bloque les augmentations de pression artérielle et de fréquence cardiaque généralement accompagnant un stress chez le rat conscient (Lisa et coll., 1989). Ces observations suggèrent qu'il existe des neurones sympathoexcitatrices dans l'hypothalamus et que, l'excitation de ces neurones (e.g. par désinhibition GABAergique) est nécessaire dans les réponses tachycardiaques et pressives induites par le stress. Il semble donc raisonnable de conclure que ces effets sympathoexcitateurs induits par des stimulations de menace chez le rat relèvent d'une activation de ces neurones hypothalamiques. En support avec cette hypothèse, les noyaux paraventriculaire et latéral de l'hypothalamus, riches en tachykinines, représentent un site majeur d'afférences projetant vers les neurones préganglioniques sympathiques (Strack et coll., 1989; Hosoya et coll., 1991), ainsi que vers d'autres noyaux autonomes incluant la substance grise périaqueducatale (PAG), le noyau parabrachialis, le noyau bulbaire rostroventrolatérale (RVLM), le noyau dorsal vagal et le noyau ambigu (Luiten et coll., 1985; Dampney et coll., 1987).

---

<sup>18</sup> Le GABA est reconnu pour ses actions inhibitrices dans le SNC.

L'injection i.c.v. de SP chez le rat conscient provoque un ajustement hémodynamique complexe, typique de la réaction de défense, entraînant des hausses de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque, de l'activité sympathique efférente, une vasoconstriction viscérale et une vasodilatation des membres inférieurs (Unger et coll., 1981; 1985). Cette réponse cardiovasculaire est accompagnée de comportements d'attention et de vigilance incluant la locomotion, la démangeaison, le mordillement de la peau et le toilettage (Unger et coll., 1988). Les portions antérieures et ventromédiales de l'hypothalamus pourraient bien être le site d'action de la SP, car une microinjection de SP dans ces régions induit le même type de réponses que celles obtenues lors d'injections i.c.v. (Itoi et coll., 1991). A l'instar de la SP, lorsque administrées par la même voie, la NKA et le NP $\gamma$  (chez l'animal anesthésié) ont des effets tachycardiaques et presseurs (Nagashima et coll., 1989; Takano et coll., 1990; Hagio et coll., 1991). Curieusement, le senktide (agoniste sélectif du récepteur NK-3) induit un effet presseur mais provoque aussi une réponse biphasique sur la fréquence cardiaque, soit une faible bradycardie suivie d'une tachycardie latente chez l'animal éveillé. De tous ces effets presseurs des tachykinines, seule la réponse pressive au senktide était sensible à un traitement périphérique avec un antagoniste V-1 de la vasopressine. De plus, contrairement à la SP et à la NKA, lorsque administré i.c.v., le senktide, provoquait une élévation des taux circulants de vasopressine suggérant que l'activation du récepteur NK-3 induit une élévation de la pression artérielle principalement via la relâche de vasopressine de l'hypothalamus. Une composante sympathique a aussi été mise en évidence avec le pentolinium qui diminue d'environ 50% la réponse pressive du senktide chez l'animal anaesthésié à l'uréthane (Polidori et coll., 1989; Takano et coll., 1990). D'autre part, les effets cardiovasculaires de la SP, de la NKA et du NP $\gamma$  semblent secondaires à une activité sympathique accrue car le pentolinium abolit ces réponses (Unger et coll., 1981; 1985; 1988; Takano et coll., 1990; Hagio et coll., 1991). A partir de ces résultats, Takano et coll. (1990) ont proposé le double mécanisme de régulation cardiovasculaire des tachykinines illustré à la figure 14.

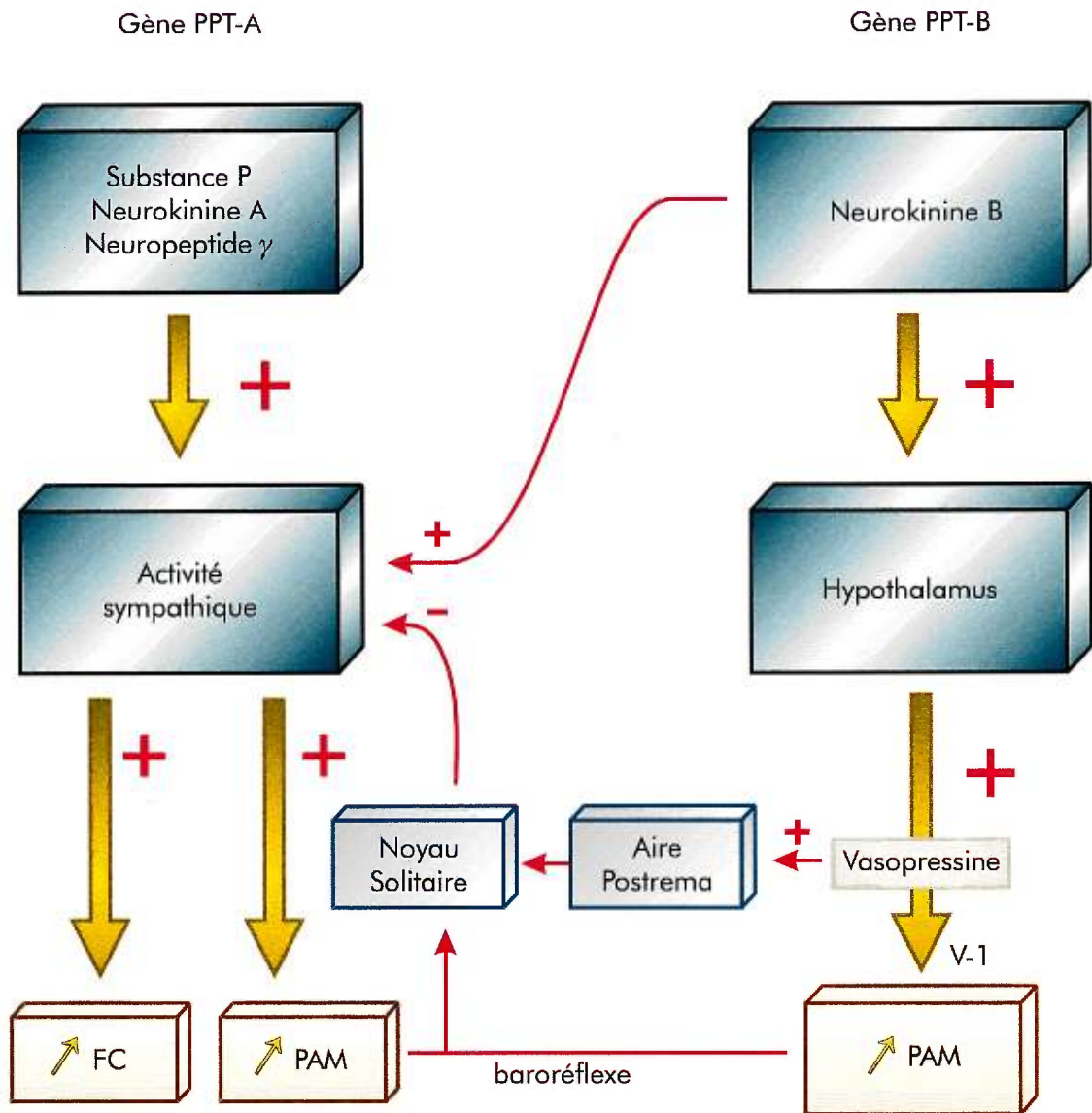


Figure 14. Modèle proposé montrant les deux types de réponses cardiovasculaires observées suite à l'administration intracérébroventriculaire de tachykinines. (Modifié de Takano et coll., 1990)

**Figure 14.** Mode d'action des tachykinines dans le contrôle cardiovasculaire supraspinal tel que proposé par l'équipe de Takano en 1990. Les tachykinines issues du gène préprotachykinine A (PPT-A), soit la substance P, la neurokinine A et le neuropeptide  $\gamma$ , activent principalement sinon exclusivement le système nerveux sympathique pour entraîner des augmentations de fréquence cardiaque (FC) et de pression artérielle moyenne (PAM). Il est intéressant de noter que le baroréflexe n'arrive pas à diminuer la fréquence cardiaque en réponse à la hausse de pression artérielle, indiquant soit une activation importante des cellules chromaffines de la glande surrénale et/ou une inhibition centrale du baroréflexe. Par ailleurs, la neurokinine B (NKB), issue de l'expression du gène PPT-B, augmente la PAM et la FC principalement via une relâche de vasopressine neurohypophysaire mais aussi par une activation sympathique. La vasopressine relâchée en circulation augmente la PAM par une activation des récepteurs vasopressine-1 (V-1) par constriction artériolaire. Encore ici, le baroréflexe n'antagonise pas l'effet presseur de la NKB centrale chez le rat anesthésié.

- Cerveau postérieur

Le noyau solitaire (NTS), considéré comme le premier relais des réflexes cardiovasculaires et respiratoires, est un des noyaux contenant la plus importante quantité de SP et de sites de liaison à la SP dans le bulbe rachidien (Helke et coll., 1984; Nagashima et coll., 1989). Les afférences primaires immunoréactives à la SP, projetant vers le NTS (Helke et coll., 1980; Kawano et Chiba, 1984) originent principalement des nerfs trijumeaux (V) (South et Ritter, 1986), glossopharyngien (IX) et vague (X) (Gillis et coll., 1980; Helke et coll., 1980). De plus, chez les mammifères, les corps cellulaires des ganglions du vague et du glossopharyngien possèdent une immunoréactivité dense à la SP (Helke et Hill, 1988). Toutefois, seulement une petite portion de la SP du NTS origine de la périphérie, car une dénervation chronique des nerfs IX et X par un traitement néonatal à la capsaïcine <sup>(19)</sup> ne réduit que partiellement les taux de SP dans le NTS (Helke et coll., 1981, Helke et Eskay, 1985). L'immunoréactivité à la SP résiduelle est issue principalement de projections des noyaux du raphé et du noyau bulbaire rostroventrolatéral (Thor et Helke, 1987). Des études fonctionnelles ont démontré une relâche accrue de SP dans le NTS suite à une hypoxie ou stimulation électrique des nerfs dépresseurs aortiques chez le lapin (Lindfors et coll., 1986a; Morilak et coll., 1988; Srinivasan et coll., 1990). L'application intra-NTS de SP excite les neurones du NTS (Morin-Surun et coll., 1984) et produit des effets hypotenseurs tout en ralentissant la fréquence cardiaque (Hall et coll., 1989; Nagashima et coll., 1989). Lorsque administrée par la même voie, la NKA induit des effets cardiovasculaires similaires mais plus faibles que ceux de la SP (Nagashima et coll., 1989). Inversement, un anticorps de la SP réduit le baroréflexe, suggérant que la SP et la NKA représentent des neuromédiateurs co-libérés avec le glutamate (Morilak et coll., 1988) dans les afférences des baro- et chemorécepteurs du NTS.

---

La portion centrale de la région caudale de la protubérance et du bulbe contient de nombreux noyaux très petits nommés noyaux du raphé. Plusieurs neurones de ces noyaux sécrètent de la sérotonine et projettent leurs axones vers des régions étendues

---

<sup>19</sup> La capsaïcine est une neurotoxine sélective pour les fibres sensorielles de type C contenant de la SP.

du diencéphale et de la moelle épinière en plus du NTS décrit précédemment. Les neurones du raphé qui présentent une immunoréactivité modérée à la SP, projettent en grande partie vers la moelle épinière où ils feront synapses avec les neurones de la colonne intermédiolatérale (IML; voir section suivante). Dans ces projections, on retrouve une co-localisation importante SP / 5-HT / TRH (voir chapitre 1, section 3 (v)).

Le locus coeruleus, constitué de neurones noradrénergiques, est localisé dans une petite région située de chaque côté du tronc cérébral à la jonction du pont et du mésencéphale et est impliqué dans la locomotion, l'état d'éveil, d'attention et de vigilance. Les projections du locus coeruleus sont dispersées dans le diencéphale et le mésencéphale, ainsi que vers le cervelet et les régions caudales du tronc cérébral. Une innervation immunoréactive à la SP possède des synapses axodendritiques avec des neurones noradrénergiques du locus coeruleus (Pickel et coll., 1979). Ces fibres immunoréactives à la SP proviennent en partie d'une population de neurones catécholaminergiques du bulbe ventral (Kawano et Masuko, 1984). De plus, les récepteurs des tachykinines, possiblement le récepteur NK-1 (Cheeseman et coll., 1983), tapissent densément les neurones du locus coeruleus (Quirion et coll., 1983). L'application locale de SP excite les neurones du locus coeruleus *in vivo* (Guyenet et Aghajanian, 1977) et *in vitro* (Cheeseman et coll., 1983). Les tachykinines pourraient donc être impliquées dans la transmission des informations douloureuses ascendantes vers le centre de l'émotion et ainsi gérer un état d'attention, de vigilance et d'éveil approprié pour l'animal tout en ajustant les paramètres cardiovasculaires en conséquence.

#### - Moelle épinière

Alors que les cornes dorsales et ventrales de la moelle épinière représentent respectivement le siège des afférences somato-sensitives et l'origine des motoneurones innervant les muscles squelettiques, le noyau IML de la moelle épinière thoracolumbaire représente le principal relais du système nerveux autonome contenant les corps cellulaires des neurones préganglionnaires sympathiques. On a démontré une forte immunoréactivité à la SP dans les terminaisons axonales qui font synapses sur les neurones préganglionnaires sympathiques dans le noyau IML chez plusieurs espèces

(DeLanerolle et Lamotte, 1982; Oldfield et coll., 1985; Takano et Loewy, 1985). Tel qu'indiqué précédemment, ces fibres SP-ergiques originent principalement des noyaux bulbaires postérieurs dont les noyaux du raphé (Helke et coll., 1982; Charlton et Helke, 1987). La SP y est colocalisée avec le TRH et la 5-HT (Sasek et coll., 1990). De plus, des fibres contenant de la SP originent d'interneurones intraspinales (Davis et coll., 1984). La contribution des afférences de type C est probablement faible ou inexistante car un traitement à la capsaïcine n'affecte pas le contenu de SP intra-IML (Takano et coll., 1988). L'application de SP sur les neurones de l'IML exercent un effet excitateur en augmentant la rythmicité des décharges (Gilbey et coll., 1983). Par ailleurs, les effets excitateurs des tachykinines ont aussi été étudiés via l'administration intrathécale (i.t.) dans la région thoracique T<sub>8</sub>-T<sub>10</sub> de la moelle épinière. Lorsque administrée par cette voie, la SP provoquait des augmentations de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Hasséssian et Couture, 1989; Hasséssian et coll., 1990). La NKA et la NKB administrées i.t. entraînaient aussi des tachycardies mais avec moins d'efficacité que la SP. Plusieurs évidences pharmacologiques suggèrent que le récepteur NK-1 serait principalement impliqué dans ces effets cardiovasculaires (Hasséssian et coll., 1988). Alors que les deux réponses cardiovasculaires étaient bloquées par l'hexaméthonium (un bloqueur ganglionnaire) (Yashpal et coll., 1987), l'effet hypertenseur de la SP était bloqué par un antagoniste  $\alpha$ -adrénergique (phentolamine) en périphérie et la tachycardie était sensible au propranolol (bloqueur  $\beta$ -adrénergique) (Hasséssian et Couture, 1989). Par ailleurs, l'injection i.t. de SP augmente les taux circulants d'épinéphrine et de norépinéphrine chez le rat conscient (Hasséssian et coll., 1990). Finalement, l'effet hypertenseur relié à l'administration i.t. de SP est probablement le résultat de l'activation des fibres sympathiques car la sympathectomie chimique à la 6-hydroxydopamine abolit la réponse pressive alors que la surrénalectomie n'a pas affecté cette réponse (Hasséssian et Couture, 1989; Hasséssian et coll., 1990).



## b) Contrôle de l'équilibre hydrosodé

La présence importante des tachykinines dans les aires du système nerveux autonome central suggère un rôle dans la régulation des fluides et de la balance électrolytique. Cinq éléments de régulation de l'équilibre hydrosodé seront discutés dans cette section soit la dipsogénie (soif), la natrioxémie (appétit sodée), la diurèse, la natriurèse et la régulation de la saveur du chlorure de sodium en fonction de la tonicité saline de l'animal.

L'effet antidipsogène des tachykinines (SP, kassinine, eledoisine) chez le rat est connu depuis la fin des années 70 (DeCaro et coll., 1977; Fitzsimons et Evered, 1978). L'appétit sodé peut être induit par une natriurèse pharmacologique couplée au retrait des sels dans la diète (Wolf, 1982), par une dialyse, une transpiration, une diarrhée, un vomissement ou une hémorragie qui retire le sodium extracellulaire (Stricker, 1981), ou encore par un besoin accru de sel tel que pendant la gestation (Pike et Yao, 1971). D'autre part, l'ingestion sodée peut aussi se produire en absence d'un besoin réel, ce qui constitue un mécanisme non-homéostasique qui pourrait résulter d'une évaluation hédonique de la saveur salée (Denton, 1982). Les études de Massi et coll. ont grandement contribué à définir le rôle des tachykinines dans les mécanismes de régulation de ces deux types d'appétit sodé (Massi et coll., 1988a; b; 1990; 1991; 1992; Massi et Epstein, 1989; Ciccocioppo et coll., 1994). En effet, cette équipe a démontré que l'administration i.c.v. des tachykinines, inhibe l'appétit sodé induit par le besoin. Deux régions centrales ont été identifiées comme étant responsables de ces effets antinatriorexiques des tachykinines, il s'agit du noyau de la strie terminale et à moindre degré, le noyau amygdalien médial (Massi et coll., 1990; Pompei et coll., 1991). De plus, la riche innervation tachykininergique démontrée dans ces régions contrôlant la prise de sel (Woodhams et coll., 1983; Mantyh et coll., 1984b) couplée aux résultats de Pompei et coll. (1993) qui ont démontré une chute des taux d'ARNm de la PPT-A dans le noyau de la strie terminale suite à une adrénalectomie, tendent à suggérer que les tachykinines sont impliquées dans le contrôle de l'appétit sodé. Ces effets antinatriorexiques des tachykinines semblent résulter principalement de l'activation du récepteur NK-3 (Läufer et coll., 1986a; Massi et coll., 1988b). En effet, le senktide



(agoniste NK-3), représente le meilleur bloqueur de l'appétit sodé chez le rat déficient en sodium (Massi et coll., 1988b; 1991; 1992). Toutefois, le récepteur NK-1 ne peut pas être exclu car l'agoniste sélectif du récepteur NK-1, [Sar<sup>9</sup>]SP sulphone, induit des effets similaires à ceux induits par le senktide (dose seuil de environ 5 pmol / animal pour les deux agonistes) tandis que l'agoniste sélectif du récepteur NK-2, GR 64,349, induit des effets antinatriorexiques significatifs seulement à la dose de 550 pmol (Ciccocioppo et coll., 1994). Cette étude suggère donc que les récepteurs NK-1 et NK-3 seraient impliqués dans cette réponse alors que l'effet induit par le GR 64,349 est probablement lié à l'activation des récepteurs NK-1 et/ou NK-3.

c) Centres du comportement et de la locomotion

Trente à quarante pourcent des neurones qui projettent vers le striatum sont immunoréactifs à la SP en plus de contenir le GABA (Penney et coll., 1986) et la dynorphine (Anderson et Reiner, 1990). Des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré une libération de tachykinines en présence de fortes concentrations de K<sup>+</sup> dans le striatum (Lindfors et coll., 1985; 1989a). La microinjection locale de SP augmente la fréquence d'activation des neurones striés (Le Gal La Salle et Ben-Ari, 1977) et provoque une relâche de dopamine (Petit et Glowinski, 1986), de [Met<sup>5</sup>]enképhaline (DelRio et coll., 1983) et d'acétylcholine (Arenas et coll., 1991) dans le striatum. Contrairement au récepteur NK-1, les récepteurs NK-2 et NK-3 sont presque inexistantes dans cette région du cerveau (Saffroy et coll., 1988). De plus, des études utilisant des sondes d'hybridation avec l'ARNm du récepteur NK-1 ont démontré la synthèse de ce récepteur dans des neurones cholinergiques du striatum (Gerfen, 1991). La SP est aussi fortement localisée dans le globus pallidus (Beach et McGeer, 1984) où on lui a attribué un rôle dans la régulation du tonus musculaire basal. En effet, la microinjection de SP à ce niveau réduit le tonus musculaire chez une souche de rats génétiquement spasmatique (Tursky et coll., 1990).

De toutes les régions du SNC, la substance noire contient les plus fortes concentrations de SP (Brownstein et coll., 1976; Cooper et coll., 1981; Douglas et coll.,

1982). Des études en microscopie électronique ont démontré une connexion directe entre les terminaisons immunoréactives à la SP et les cellules dopaminergiques nigrales (Kawai et coll., 1987). Cette innervation SP-ergique, colocalisée avec le GABA et la dynorphine, prendrait origine dans le striatum ipsilatéral (Brownstein et coll., 1977; Jessell et coll., 1978; Kanazawa et coll., 1980). L'application électrophorétique de SP sur des neurones de la substance noire provoque une excitation neuronale de longue durée (Walker et coll., 1976). Plusieurs études comportementales et biochimiques tendent à suggérer que la SP active la voie dopaminergique nigrostriée. En effet, une infusion de SP dans la substance noire provoque des augmentations marquées de comportements stéréotypés tel que le redressement, le reniflement et le toilettage (Kelley et Iversen, 1978). Ceux-ci sont inhibés par un prétraitement à la 6-hydroxydopamine infusée dans le noyau caudé (Kelley et Iversen, 1979). L'administration intranigrale de SP augmente à la fois la libération de dopamine et les niveaux d'acide homovanillique dans le striatum ipsilatéral (Reid et coll., 1988). Inversement, l'injection intranigrale de GABA ou de dynorphine abaisse la relâche de dopamine ipsilatérale suggérant que la SP est le neuromédiateur excitateur alors que le GABA et la dynorphine sont inhibiteurs sur la régulation des neurones dopaminergiques striatonigrés (Reid et coll., 1988). L'interaction entre les systèmes tachykininergique et dopaminergique s'effectue d'une façon bidirectionnelle. En effet, plusieurs évidences suggèrent un contrôle de rétroaction négative des neurones dopaminergiques sur les neurones contenant la SP dans cette double voie striatonigrée-nigrostriée. D'une part, les terminaisons axonales dopaminergique font synapses directement sur les neurones contenant de la SP du striatum (Kubota et coll., 1986) et d'autre part, un traitement à la métamphétamine (agoniste indirect dopaminergique) ou à un bloqueur de la recapture de la dopamine entraîne une augmentation des taux de SP dans la substance noire (Ritter et coll., 1984; 1985). De plus, un traitement avec un antagoniste sélectif pour le récepteur D-2 de la dopamine (haloperidol et sulpiride) ou une destruction des fibres dopaminergiques avec la 6-OHDA provoque une chute des taux de la SP nigrale (Cruz et Beckstead, 1988; 1989). Inversement, un blocage chronique du récepteur D-1 de la dopamine induit une élévation de la SP dans la substance noire (Cruz et Beckstead, 1988). A l'instar de la SP, la NKA, qui est aussi abondante dans cette région du SNC (Lindfors et coll., 1986b),

provoque une excitation des neurones dopaminergiques nigrés mais, en plus, active d'autres neurones non-dopaminergiques (Innis et coll., 1985). Baruch et coll. (1988) suggèrent que la SP et la NKA agissent via des mécanismes différents dans la régulation des neurones de la substance noire. Curieusement, on ne retrouve presque pas de sites de liaison pour la NKA alors qu'il y a absence totale de sites de liaison pour la SP dans la substance noire (Mantyh et coll., 1984b; Quirion et Dam, 1985; Quirion et coll., 1983; tableau 6). La discordance entre les études de liaison et les études fonctionnelles demande toujours à être résolue.

A l'image des terminaisons SP-ergiques qui font synapses sur des neurones dopaminergiques dans la substance noire, des terminaisons nerveuses immunoréactives à la SP et qui originent principalement du noyau médial habénulaire font synapses sur des neurones dopaminergiques dans l'aire du tegmentum ventral (VTA) (Cuello et coll., 1978; Tamiya et coll., 1990). Lorsque administrée dans le VTA, la SP stimule la locomotion et le comportement de redressement (Pinnock et coll., 1983). Cette réponse comportementale est prévenue en prétraitant avec un antagoniste dopaminergique localement ou en détruisant les fibres ascendantes dopaminergiques A10 avec la 6-hydroxydopamine (Kelley et coll., 1979). Le "footshock stress", qui active le métabolisme dopaminergique des voies mesocorticales et mesolimbiques chez le rat (Thierry et coll., 1976; Herman et coll., 1982), est aussi associé à une diminution importante des taux de SP dans le VTA (Lisoprawski et coll., 1981), suggérant une hausse de la libération de SP dans ce noyau. De plus, la hausse du métabolisme de la dopamine dans le cortex préfrontal associé au stress du "footshock" est abolie en prétraitant avec un anticorps monoclonal pour la SP dans le VTA (Bannon et coll., 1983). Ces résultats supportent l'idée que la SP a un rôle sur le contrôle des neurones dopaminergiques mésocorticales en réponse au stress "foot shock". La NKA est aussi retrouvée en grande quantité dans le VTA en parallèle avec une représentation des sites de liaison correspondant à la NKA (curieusement il y a absence de sites de liaison pour la SP dans cette région, malgré que la SP y soit abondante) (Kalivas et coll., 1985). De plus, cette équipe suggère un rôle important pour la NKA dans le VTA car lorsque administrée localement, elle est 10 fois plus puissante que la SP pour induire une réponse comportementale (Kalivas et coll., 1985).

Les voies mésolimbiques semblent aussi jouer un rôle dans l'activation locomotrice (Randrup et Munkvad, 1966). Par conséquent, la quantité modérée de tachykinines retrouvée dans le noyau accumbens (Ljundhal et coll., 1978a), qui origine principalement de neurones du noyau gris périaqueductal et du noyau solitaire chez le rat (Li et coll., 1990a, b), pourrait moduler la relâche de dopamine via un mécanisme présynaptique. En effet, des études en microscopie électronique avec marquage immunohistochimique ont démontré qu'une proportion aussi grande que 20% des terminaisons immunoréactives aux tachykinines, établissaient des connections axoaxonales avec des terminaisons dopaminergiques contenant de la tyrosine hydroxylase (Pickel et coll., 1988). De plus, des injections de SP intra-accumbens augmentaient les métabolites de la dopamine dans le noyau suggérant une relâche de dopamine (Kalivas et Miller, 1984). D'autre part, la NKA administrée à ce niveau augmente (VanDenBoss et coll., 1990), alors que des anticorps à la SP diminuent (Elliott et coll., 1986) les effets locomoteurs induits par les amphétamines, ce qui reflète probablement des modifications de relâche de dopamine dans ce noyau (Sharp et coll., 1987). Inversement, la dopamine semble avoir des effets rétroactifs négatifs sur la relâche des tachykinines (Lindfors et coll., 1989b). Suite à l'administration périphérique de nicotine chez le rat (0,8 mg / kg sous cutanée), Naftchi et coll. (1988) ont observé une baisse dramatique (70%) des taux d'immunoréactivité à la SP dans les noyaux du putamen caudal et accumbens et dans le tubercule olfactif, pour en déduire que les comportements induits par la nicotine (locomotion et rotation) pourraient être dus à une relâche de SP dans ces régions affectant ainsi la transmission dopaminergique (Naftchi et coll., 1988).

#### d) Nociception

Cette section revise les grandes lignes de la transmission nociceptive par les tachykinines et permettra de mieux saisir le lien entre la régulation cardiovasculaire et comportementale au niveau supraspinal et la transmission nociceptive des tachykinines au niveau spinal.

La participation de la SP dans les mécanismes liés à la transmission douloureuse a été proposée pour la première fois par Lembeck (1953). La nociception dépend de la transmission d'un potentiel d'action généré à partir des terminaisons périphériques des afférences sensorielles primaires de types C et A $\delta$  vers la moelle épinière (figure 15). Dans certaines circonstances, les fibres A $\beta$  peuvent aussi être recrutées (Hill, 1986; Cervero et Laird, 1991; Handwerker et Kopal, 1993). La plupart (80%) des afférences de type C contenant de la SP font partie des nocicepteurs polymodaux chez le rat (Nagy et coll., 1981; Lynn et Hunt, 1984). La SP, présente en forte concentration dans les couches I et II de la moelle épinière (Takahashi et Otsuka, 1974; 1975; Nilsson et coll., 1974; Hökfelt et coll., 1975a, b), possède toutes les caractéristiques du neuromédiateur des afférences sensorielles primaires de type C :

- 1- Il y a relâche de SP dans la corne dorsale de la moelle épinière lors d'une stimulation nociceptive périphérique, par application de capsaïcine (qui active spécifiquement les afférences de type C; Gamse et coll., 1979; Thériault et coll., 1979) ou de potassium (Akagi et coll., 1980), par stimulation électrique des racines dorsales (Otsuka et Konishi, 1976a) ou par stimulation douloureuse causée par une application de chaleur sur la peau (Duggan et coll., 1987).
- 2- L'application exogène de SP sur la moelle épinière induit des effets nociceptifs similaires à ceux observés suivant la stimulation des afférences primaires de type C (Henry, 1976; Otsuka et Konishi, 1976b; Urban et Randic, 1985; Dougherty et Willis, 1991).
- 3- Les trois récepteurs aux tachykinines sont présents dans les couches superficielles de la moelle épinière (Shults et coll., 1984; Yashpal et coll., 1990; Beresford et coll., 1992).
- 4- Un prétraitement de la moelle épinière avec un antagoniste sélectif pour le récepteur NK-1 bloque les réponses réflexes produites par une stimulation nociceptive (Yanagisawa et coll., 1982; Radhakrishnan et Henry, 1991; Dougherty et coll., 1993; Laird et coll., 1993; Desai et coll., 1992).

De plus, une rhizotomie dorsale unilatérale cause une chute dramatique du contenu en SP dans la moelle épinière ipsilatérale (Hökfelt et coll., 1975a; Jessell et coll., 1979), supportant la présence de SP dans les terminaisons des afférences sensorielles primaires. Effectivement, des études en microscopie électronique ont démontré la présence de terminaisons contenant de la SP, lesquelles forment des connections axodendritiques sur les couches superficielles de la corne dorsale (Chan-Palay et Palay, 1977; Barber et coll., 1979; Riberio-Da-Sylva et coll., 1989).

La NKA exerce une action excitatrice similaire à la SP sur les neurones de la moelle épinière (Matsuto et coll., 1984; Weihe, 1990; Duggan et Weihe, 1991; Otsuka et Yoshioka, 1993). Par ailleurs, la NKA est dégradée plus lentement que la SP, ce qui pourrait expliquer une action à distance, car on la détecte loin du site de libération (Duggan et coll., 1990), suggérant un mode d'action différent pour ce peptide dans la transmission nociceptive. Les réponses hyperalgésiques de courte et longue durée obtenues chez le rat suivant l'application locale de SP et de NKA sont secondaires à l'activation des récepteurs NK-1 et NK-2, respectivement (Picard et coll., 1993). Par ailleurs, des études sur la relâche de la SP et de la NKA ont démontré que la plupart des stimuli douloureux entraînent une relâche de NKA dans la corne dorsale alors que la relâche de SP exige des niveaux de stimulation plus intense et plus prolongée (Duggan et Weihe, 1991). Alors que l'application iontophorétique de SP sur la corne dorsale du chat excite exclusivement les neurones qui répondent aux stimuli nociceptifs, la NKA excite les neurones qui sont activées par les stimuli douloureux et non-douloureux (Salter et Henry, 1991). Au contraire, la NKB, la somatostatine et la galanine sont inhibitrices sur les neurones spinaux (Suzue et coll., 1981; Yanagisawa et coll., 1986). Même s'il y a des récepteurs NK-3 sur les laminae I et II de la corne dorsale, il est important de noter que la NKB est absente des afférences sensorielles primaires (Hill, 1994).

D'autres peptides tels le CGRP (Wiesenfeld-Hallin et coll., 1984), la galanine (Skofitsch et Jacobowitz, 1985), la somatostatine (Hökfelt et coll., 1976), la NKA (Kanazawa et coll., 1984) ainsi que des acides aminés excitateurs (Potashener et Tran, 1984) ont aussi été retrouvés dans les terminaisons de ces afférences primaires dans la

corne dorsale de la moelle épinière. En effet, pas moins de 10 neuropeptides coexistent dans ces neurones selon plusieurs combinaisons (Cameron et coll., 1988; Dalsgaard, 1988; Duggan et Weihe, 1991; voir tableau 7). La SP coexiste avec le CGRP, la galanine et le glutamate dans les vésicules de sécrétion de la corne dorsale (Tuchscherer et Seybold, 1989; DeBiasi et Rustioni, 1988). Il est possible que cette colocalisation permette aux neuromédiateurs d'interagir autant dans des mécanismes pré- que post-synaptiques dans la corne dorsale de la moelle épinière. En effet, les tachykinines et le CGRP sont reconnus pour augmenter la relâche de glutamate des afférences primaires par un mécanisme  $Ca^{2+}$  dépendant *in vitro* (Kawagoe et coll., 1986; Kangrga et coll., 1990; Kangrga et Randic, 1990; Smullin et coll., 1990). De plus, certaines interactions inhibant partiellement la dégradation de la SP, comme il a été démontré avec de fortes concentrations de CGRP et d'autres peptides dans les terminaisons des afférences primaires (LeGreves et coll., 1985; Oku et coll., 1987), pourraient avoir une importance dans la codification du message nociceptif.

**Tableau 7. Peptides retrouvés dans les afférences sensorielles primaires des mammifères.**

Facteur natriurétique auriculaire	Neuropeptide Y
Angiotensine II	Oxytocine
Bombesine	Dynorphine
Cholecystokinine	Enképhalines
Peptide relié au gène de la calcitonine	$\beta$ -Endorphine
Endothéline	Somatostatine
Galanine	SP, NKA, NPK
Facteur de relâche de l'hormone de croissance	Peptide intestinal vasoactif
Vasopressine	

(Tiré de Hill, 1994)

L'application pulsatile de SP sur des cellules spinales en culture induit des dépolarisations lentes de quelques dixièmes de secondes (Nowak et MacDonald, 1982). Plusieurs évidences suggèrent que la SP provoque des PPSE lents sur des neurones de second ordre dans la moelle épinière et pourrait ainsi contribuer à la transmission avec délai de la douleur (Otsuka et Yanagisawa, 1987). Toutefois, la présence d'autres neuromédiateurs excitateurs à action rapide dans ces mêmes terminaisons (Jessell et coll., 1986; Duggan et Weihe, 1991), suggère une dualité d'action des neuromédiateurs libérés lors d'un influx nociceptif. Par conséquent, il semble possible que la SP et le glutamate produisent respectivement des excitations lentes et rapides, des neurones de second ordre qui projettent vers les centres supérieurs d'intégration nociceptive. Même si les antagonistes des récepteurs NK-1 (Xu et coll., 1992b; Laird et coll., 1993) et NK-2 (Xu et coll., 1991) bloquent le réflexe de flexion, les meilleurs bloqueurs de ce réflexe sont les antagonistes du récepteur au NMDA tel que le MK-801, qui réduit le niveau du



réflexe de base, le "windup" et la facilitation du réflexe de flexion (Xu et coll., 1992a). Toutefois lorsque le MK-801 et le CP-96,345 sont coadministrés à des doses inférieures au seuil provoquant le blocage de leur récepteur, ils bloquent très efficacement le "windup" et la facilitation du réflexe (Xu et al., 1992a). Par conséquent, l'interaction entre les effets de la SP et du glutamate sur les récepteurs NK-1 et NMDA, semble important dans la transmission nociceptive (Hill, 1994). Plus récemment, Radhakrishnan et Henry (1993) ont réussi à bloquer l'activation des neurones nociceptifs de la corne dorsale induite par la SP, le NMDA ou par l'application d'un stimulus nociceptif suite à l'application iontophorétique de L-NAME, un bloqueur de la NO-synthase. Ceci suggère que l'oxide nitreux représente une voie commune finale dans la transmission du message nociceptif.

La SP stimule d'une part les neurones de la corne dorsale, mais d'autre part, semble aussi activer une relâche d'opiacés par des interneurones, lesquels inhibent (hyperpolarisent) par une action post-synaptique les neurones secondaires et bloquent la relâche de SP par une action pré-synaptique sur les récepteurs  $\mu$  et  $\delta$  (Jessell et Iversen, 1977). Toutefois, l'importance relative des mécanismes pré- et post-synaptiques des opiacés demande à être clarifiée. Quoiqu'il en soit, les opiacés présentent des effets antinociceptifs en bloquant le passage des influx nociceptifs dans la corne dorsale. Notre laboratoire a montré que l'activation sélective des récepteurs NK-3 dans la moelle épinière de rat provoque une réponse hypoalgésique sensible au naloxone (Laneuville et coll., 1988).

Les comportements qui ont été arbitrairement associés à la nociception chez le rat sont les comportements de démangeaison et de mordillement. En effet, ces comportements caractéristiques suivant l'administration centrale de SP (Vaught, 1988) représentent selon Hill (1994), tout simplement une augmentation de l'activité motrice sans prédisposition douloureuse.

e) Implication des tachykinines dans les processus de la mémoire

Le noyau basal de Meynert ainsi que les autres noyaux basaux du mésencéphale ont reçu beaucoup d'attention de par leur implication dans la maladie d'Alzheimer (Coyle et coll., 1983). Ces noyaux riches en neurones cholinergiques qui projette vers le cortex cérébral, sont innervés par des neurones immunoréactifs à la SP chez le rat (Bolam et coll., 1986) et l'humain (Beach et coll., 1987). Suite à la découverte que la SP induit un effet excitateur sur ces fibres cholinergiques, plusieurs rôles physiologiques lui ont été attribués (Nakajima et coll., 1985; 1988; Yamaguchi et coll., 1990). De plus, des études comportementales suggèrent que l'administration de SP dans ces régions aurait un rôle dans le processus de mémorisation (Kafetzopoulos et coll., 1986; voir chapitre 1, section 6). En plus de ces régions mésencéphaliques, l'hippocampe est aussi impliqué dans la mémoire par des mécanismes tachykininergiques (Flood et coll., 1990). En effet, lorsque administrés par la voie i.c.v., le NPK et la NKA améliorent la mémoire chez le rat (Flood et coll., 1990). Des injections plus locales de NPK dans l'hippocampe et dans le corps amygdalien se sont avérées aussi efficaces contrairement aux administrations intra-septales ou dans le noyau caudé (Flood et coll., 1990).

f) Télencéphale

Même si les tachykinines sont retrouvées en faible quantité dans le néocortex (Taquet et coll., 1988; Ljungdahl et coll., 1978a; Hayashi et Oshima; 1986), elles semblent avoir des implications importantes dans la fonction corticale. L'application iontophorétique de SP dans les couches V et VI du cortex induit une prolongation de l'excitation des neurones corticales chez le rat (Lamour et coll., 1983; Phillis et Limacher, 1974). De plus, Hendry et coll. (1988) ont démontré une baisse dramatique des niveaux d'immunoréactivité aux tachykinines dans le cortex visuel du singe suite à une privation visuelle ce qui suggère qu'une modification de l'input visuel se traduit par une modification dans la synthèse des tachykinines et peut ainsi entraîner des modifications des fonctions corticales.

### g) Tachykinines dans les fonctions sexuelles

La SP hypothalamique a été impliquée dans le contrôle des comportements sexuels. Plusieurs neurones immunoréactifs à la SP ont été identifiés dans la portion ventromédiale de l'hypothalamus chez les rats femelles (Akesson et Micevych, 1988). Cette portion de l'hypothalamus est postulée comme étant un site critique dans l'action des hormones sexuelles femelles chez le rat (Rubin et Barfield, 1980; 1983). Dans cette portion de l'hypothalamus, environ 35% des neurones immunoréactifs au récepteur de la progesterone sont aussi immunoréactifs à la SP (Nielsen et Blaustein, 1990).

Les concentrations de tachykinines retrouvées en parallèle avec leurs récepteurs dans le corps amygdalien sont beaucoup plus importantes chez le rat que chez l'homme (Cooper et coll., 1981; Mantyh et coll., 1989). L'application microiontophorétique de SP induit une excitation des neurones du corps amygdalien médial chez le rat (Le Gal La Salle et Ben-Ari, 1977). Dans ces régions du cerveau, la présence des tachykinines a été associée avec des fonctions de régulation sexuelle (Valcourt et Sachs, 1979; Neal et coll., 1989) et avec la régulation hydrosodée (DeCaro et coll., 1978; Perfumi et coll., 1988; Massi et coll., 1990).

### ii) Périphérie

La source neuronale des tachykinines en périphérie, territoires somatiques et viscéraux confondus, origine principalement des terminaisons des afférences sensorielles primaires sensibles à la capsaïcine (figure 15). Pratiquement tous les tissus périphériques démontrent une immunoréactivité à la SP car ces fibres sensorielles de type C et A $\delta$ , sensibles à la capsaïcine, se répartissent partout à travers l'organisme (Björklund et coll., 1988). Plusieurs évidences ont démontré que ces neurones envoient, d'une part, des informations au SNC, et d'autre part, libèrent des médiateurs en

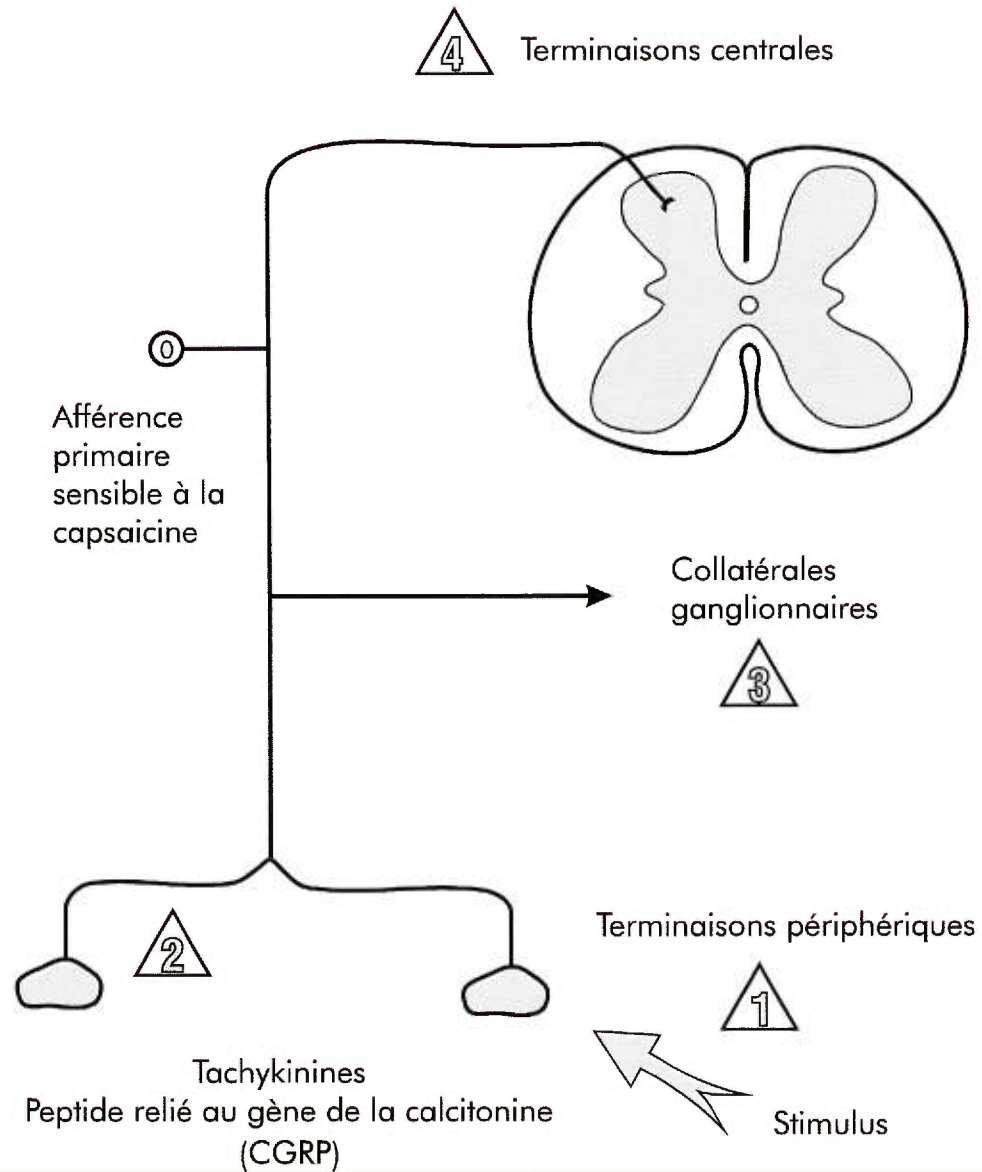


Figure 15. Schéma représentant l'anatomie fonctionnelle des neurones afférents sensoriels sensibles à la capsaïcine

*Figure 15.* Les neuropeptides sensoriels sont synthétisés dans le corps cellulaire et transportés aux terminaisons préféériques (1, 2 et 3) et centrales (4). Des stimuli expérimentaux (mécaniques, chimiques, thermiques) entraîneront une relâche des neurotransmetteurs sensoriels, dont la substance P, la neurokinine A et le peptide relié au gène de la calcitonine, aux sites de stimulation (1) par un mécanisme résistant à la tétrodotoxine (TTX). De plus, des impulsions nerveuses sensibles à la TTX seront relayées vers d'autres branches préféériques (réflexe axonal, site de relâche 2), vers des collatérales ganglionnaires (site de libération 3) et vers les terminaisons centrales des afférences sensorielles primaires sensibles à la capsaïcine (site de libération 4).

périphérie dont les mieux caractérisés sont la SP, la NKA et le CGRP<sup>(20)</sup> (Maggi, 1995). A l'inverse du gène PPT-A, qui est massivement exprimé dans les neurones ganglionnaires de la racine dorsale, le gène PPT-B y est absent. Par conséquent, les taux de NKB en périphérie sont faibles ou indétectables (Hua et coll., 1985; Tanigushi et coll., 1986; Beding-Barenkow et Brodin, 1989; Too et coll., 1989a; b; Tateishi et coll., 1990). Ces transmetteurs peuvent entraîner une multitude d'effets tels que la contraction des muscles lisses, la perméabilité vasculaire et des activités sécrétrices. Ainsi, avec le CGRP, les tachykinines des neurones sensorielles servent un rôle "efferent" (Holzer, 1991; Maggi, 1991) impliqué dans les fonctions immunitaires, inflammatoires, cardiovasculaires, respiratoires et génitourinaires. Il y a aussi de bonnes évidences indiquant que les tachykinines jouent un rôle de transmetteur intrinsèque et extrinsèque dans le système digestif. Des études immunohistochimiques ont identifié la présence des tachykinines dans d'autres types cellulaires, soit dans des cellules endocrines de l'intestin (Bartho et Holzer, 1985), dans les cellules principales parenchymales des corps carotidiens (Cuello et McQueen, 1980), dans les cellules chromaffines des glandes surrénales (Bucsics et coll., 1981), dans les éosinophiles (Aliakbari et coll., 1987), dans les macrophages (Pascual et Bost, 1990), dans les cellules Merkel du derme porcin (Weihe et coll., 1991) et dans les cellules endothéliales vasculaires (Loesch et Burnstock, 1988). Toutefois, aucune étude n'a pu démontrer la synthèse active des tachykinines dans ces éléments non-neuronaux.

#### a) Fonctions "efférentes" des tachykinines

Dès 1876, Stricker a montré que les fibres sensorielles pouvaient produire des effets périphériques. En effet, il a observé qu'une stimulation de la partie distale de la racine dorsale sectionnée, provoquait une augmentation de température de la peau, due à une vasodilatation, dans les territoires innervés. Les stimuli nociceptifs

---

<sup>20</sup> Plus d'une dizaine de neuropeptides ont été identifiés dans ces fibres (Holzer, 1988; Maggi et Meli, 1988) en plus d'acides aminés excitateurs à l'extrémité centrale (Merighi et coll., 1988; Jęftinija et coll., 1991; Urban et Dray, 1992) et de NO aux extrémités périphérique et centrale (Aimi et coll., 1991; Verge et coll., 1992).

engendrent d'une part une réaction locale qui assure la protection (ou facilite la guérison) de l'organe touché et d'autre part des influx nerveux qui transitent dans la corne dorsale de la moelle épinière puis convergent vers les centres supérieurs (faisceau néo-spino-thalamique; voir chapitre 1, section 3(d)). Ces neurones sont capables de libérer plusieurs neuromédiateurs aux terminaisons nerveuses centrales mais également aux terminaisons dendritiques périphériques.

- inflammation

L'inflammation est le résultat d'une insulte thermique, mécanique, bactérienne ou chimique, qui se manifeste par quatre points cardinaux, décrits par Lewis (1927): 1) rougeur au site endommagé, 2) oedème produisant une enflure locale, 3) chaleur et 4) douleur locale. Alors que la rougeur est secondaire à une vasodilatation, l'enflure résulte d'une augmentation de l'extravasation plasmatique des capillaires et la propagation de la rougeur est due à une vasodilatation induite par réflexe axonal. La perception de douleur qui en résulte est causée par la transmission des informations nociceptives via les afférences sensorielles primaires de type C vers la moelle épinière. La démangeaison résulte de la dégranulation des mastocytes et la libération d'histamine. Cette réaction inflammatoire porte le nom "d'inflammation neurogénique" (Jancsó et coll., 1967; 1968; Chahl, 1988). Elle est abolie par un prétraitement avec la capsaïcine, suggérant une implication des fibres polymodales nociceptives de type C (Celander et Folkow, 1953; Kenins, 1981).

Avec le CGRP, la SP est le peptide qui est certainement le plus impliqué dans l'inflammation neurogénique. La SP est relâchée par les terminaisons périphériques des afférences sensitives primaires quand celles-ci sont activées par des stimuli nociceptifs ou par activation antidromique. Une application directe de SP sur des tissus provoque une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire, attire les leucocytes, active la phagocytose par les macrophages, augmente la production et la relâche de médiateurs de l'inflammation (enzymes lysosomales, eicosanoïdes, interleukines (IL-1, IL-6, ...)) et entraîne la dégranulation des mastocytes (provoquant une relâche locale d'histamine). Il est à noter que chez les rongeurs, les mastocytes libèrent de l'histamine et de la 5-HT qui sont vasoactifs. L'utilisation d'antagonistes du

récepteur NK-1 ou d'anticorps contre la SP réduit considérablement l'augmentation du débit sanguin et l'extravasation plasmatique induites par une stimulation électrique des fibres de type C ou par application d'un irritant chimique (Couture et Cuello, 1984; Louis et coll., 1989; Garret et coll., 1991). L'action de la SP endogène est inhibée par les opiacés, la somatostatine, la galanine et le NPY qui inhibent la libération de SP par les terminaisons périphériques des afférences sensibles primaires. La NKA, comme la SP, mais dans une moindre mesure, induit une augmentation de la perméabilité vasculaire sans induire de douleur ou de démangeaison puisqu'elle ne dégranule pas les mastocytes (Wallengren et Hakanson, 1987). Ces évidences démontrent, hors de tous doute, un rôle important pour les tachykinines dans le processus de l'inflammation neurogénique.

- effets cardiovasculaires

La première activité *in vivo* de la SP a été démontrée lors de sa découverte en 1931 par Von Euler et Gaddum qui ont décrit un effet vasodépresseur chez le lapin induit par la préparation P (qui devait aussi contenir d'autres peptides). Cet effet a depuis été reproduit chez plusieurs espèces dont l'homme (Duner et Pernow, 1960), et a été attribué à l'activation du récepteur NK-1 sur l'endothélium artériel (D'Orléans-Juste et coll., 1985) qui relâche une substance vasodilatatrice (Zawadski et coll., 1981) que l'on connaît aujourd'hui comme étant l'oxide nitreux (NO; Palmer et coll., 1987).

De nombreuses fibres immunoréactives à la SP et au CGRP innervent la structure cardiaque (ventricules et oreillettes, valves, grands vaisseaux, coronaires, ganglions cardiaques) chez le cobaye (Reinecke et Weihe, 1980; Wharton et coll., 1981). Ces fibres sont aussi détectées chez l'homme principalement à proximité des artérioles cardiaques (Weihe et coll., 1981). Plus de 90% de cette innervation est sensible au traitement à la capsaïcine mais insensible à la vagotomie (Papka et coll., 1981; Urban et Papka, 1985), confirmant ainsi son origine sensorielle. Ces fibres ont été proposées comme étant impliquées dans la transmission douloureuse de l'ischémie cardiaque (Furness et coll., 1982). La SP a un effet vasodilatateur sur les artères coronaires du chien (Losay et coll., 1977) du lapin et de l'homme (Couture et Regoli, 1982; Crossman et coll., 1988). Par conséquent, la SP pourrait avoir un rôle dans la régulation du débit sanguin coronarien



(Weihe et coll., 1981; Wharton et coll., 1981) qui peut représenter un mécanisme de défense contre l'ischémie cardiaque.

Plusieurs vaisseaux sanguins contiennent aussi de la SP, surtout au niveau de l'adventice (Barja et Mathison, 1982; Liu-Chen et coll., 1986; Furness et coll., 1982). Encore ici, l'origine des fibres immunoréactives à la SP est de nature sensitive (Duckles et Buck, 1982; Furness et coll., 1982; Norregaard et Moskowitz, 1985). Les cellules endothéliales peuvent aussi être une source de SP dans les artères fémorales et mésentériques (Loesch et Burnstock, 1988). De plus, une relâche de SP de l'endothélium a été observée suivant l'augmentation du débit sanguin dans la vasculature des membres inférieures chez le rat (Ralevic et coll., 1990) ou lors d'une hypoxie de l'artère coronaire du rat (Milner et coll., 1989).

Suite à l'activation du récepteur NK-1, la SP induit son effet hypotenseur via une vasorelaxation endothéliale dépendante des grands vaisseaux (Stewart-Lee et Burnstock, 1989). Les inhibiteurs de la synthèse de NO, inhibent cette action vasodilatatrice de la SP (Whittle et coll., 1989), suggérant une action stimulante de la SP sur la NO-synthase endothéliale. Une des fonctions des fibres C sur les vaisseaux sanguins pourrait consister à réguler le débit sanguin local par un mécanisme de réflexe axonal. Les tachykinines SP, NKA et NKB possèdent aussi une activité contractile sur quelques vaisseaux, tel l'artère pulmonaire de lapin (D'Orléans-Juste et coll., 1986), la veine porte de rat (Mastrangelo et coll., 1987) et la veine mésentérique de lapin (Couture et Regoli, 1982) qui serait due vraisemblablement à une action directe sur les récepteurs des cellules musculaires lisses des vaisseaux.

L'application de SP ou de NKA sur les corps carotidiens stimule l'activité chémoréceptorielle, alors que des antagonistes des tachykinines bloquent cette activité des chémorécepteurs induite par hypoxie (Prabhakar et coll., 1984; 1986; 1989). Par conséquent, la SP est suggérée comme médiateur dans la réponse hypoxique tant au niveau des corps carotidiens que du noyau solitaire (Gillis et coll., 1980).

## b) Tractus gastrointestinal

Le tractus gastrointestinal démontre une forte immunoréactivité à la SP chez plusieurs espèces (Barthó et Holzer, 1985; Furness et coll., 1988) qui est parallèle à la distribution de la PPT-A (Sternini et coll., 1989). En plus de la SP, on retrouve une importante représentation de NKA chez le rat et le cobaye alors que la NKB y est presque inexistante (Deacon et coll., 1987; Tateishi et coll., 1990). Les récepteurs NK-1 et NK-2 ont été démontrés sur la musculature lisse gastrointestinale ayant des patrons de distribution distincts (Burcher et coll., 1986; Mantyh et coll., 1988; Maggio et Mantyh, 1989; Mantyh et coll., 1989). Les récepteurs de type NK-3 ont aussi été démontrés sur le plexus myentérique de l'iléon de cobaye (Guard et coll., 1990). Par ailleurs, chez le rat, les ARNm pour les récepteurs NK-1 et NK-2 se retrouvent en abondance dans le tractus gastrointestinal contrairement à l'ARNm du récepteur NK-3 qui est très faiblement représenté (Tsuchida et coll., 1990). La stimulation de ces neurones par champ électrique ou par l'application locale de capsaïcine entraîne une relâche de SP et de NKA, présumément de neurones sensoriels extrinsèques (Baron et coll., 1983; Renzi et coll., 1988; 1991).

Plusieurs évidences suggèrent que la SP produit des PPSE lents des neurones myentériques et sous-muqueux. En effet, l'application de SP sur les neurones myentériques du petit intestin cause une dépolarisation lente d'une durée de 1-2 min (Katayama et North, 1973; Katayama et coll., 1979; Hanani et Burnstock, 1985). La NKB et la NKA stimulent aussi ces neurones mais avec moins de puissance que la SP (Konishi et coll., 1985). Quelques uns des neurones entériques stimulés par les tachykinines pourraient être cholinergiques car les tachykinines entraînent une relâche d'acétylcholine sensible à la tétrodothine dans les neurones myentériques du cobaye (Yau et Youther, 1982; Fosbraey et coll., 1984; Yau et coll., 1986). L'activation du récepteur NK-3 pourrait bien être responsable de cette relâche cholinergique (Guard et Watson, 1987). Les récepteurs NK-1 et NK-2 seraient plutôt impliqués dans la motilité gastrointestinale via la contraction musculaire (Maggi et coll., 1990a; c). En effet, la SP et la NKA contractent pratiquement toutes les portions du tractus gastrointestinal en agissant directement sur la musculature lisse de celle-ci (Barthó et Holzer, 1985; Holzer-

Petsche et coll., 1987; Maggi et coll., 1990c; Shuttleworth et coll., 1991). Plusieurs évidences suggèrent aussi que les tachykinines ont un rôle dans les réflexes sécrétomoteurs. En effet, la SP stimule la sécrétion d'eau et d'électrolytes de la muqueuse intestinale (Walling et coll., 1977; Kachur et coll., 1982; McFadden et coll., 1986). Pour sa part, la NKA stimule aussi la sécrétion, mais probablement en agissant directement sur les neurones de la sous-muqueuse, car cette réponse est sensible à la tétródotoxine (Mathison et Davison, 1989). Ceci est consistant avec la localisation autoradiographique des sites de liaisons pour la SP (sur les cellules épithéliales) et de la NKA (absence sur les cellules épithéliales) (Maggio et Mantyh, 1989).

## CHAPITRE 2

# *H*ETEROGENEITE PHARMACOLOGIQUE DES REPONSES CARDIOVASCULAIRES ET COMPORTEMENTALES SUIVANT L'ADMINISTRATION INTRACEREBROVENTRICULAIRE DE SUBSTANCE P ET DE NEUROKININE A CHEZ LE RAT EVEILLE

---

*"De par sa nature, le vrai chercheur possède la faculté de ressentir l'étonnement."*

Hans Selye, 1958 (newsweek)

## Avant-propos au deuxième chapitre

Tel que décrit au cours du premier chapitre, l'administration i.c.v. ou i.t. de SP chez le rat éveillé augmente d'une façon dose-dépendante la pression artérielle moyenne et la fréquence cardiaque suivant une activation sympathosurrénalienne (Unger et coll., 1985; 1988; Hasséssian et Couture, 1989; Hasséssian et coll., 1990). De plus, alors qu'une augmentation de l'activité sympathique est à l'origine des effets cardiovasculaires induits par l'injection i.c.v. de SP ou de NKA, les effets presseurs à l'administration i.c.v. de NKB semblent plutôt répondre à une augmentation de la libération de vasopressine en circulation chez le rat anesthésié à l'uréthane (Takano et coll., 1990). Toutefois, le rôle putatif des différents récepteurs aux tachykinines dans ces effets centraux de la SP, de la NKA et de la NKB demeure inconnu. Les effets similaires observés suivant l'injection i.c.v. de SP et de NKA laissent présager la possibilité que ces deux tachykinines agissent sur le même récepteur, d'autant plus que la présence du récepteur NK-2 dans le SNC du rat demeure très controversée (Buck et coll., 1986; Bergstrom et coll., 1987; Mantyh et coll., 1989; Dam et coll., 1988; 1990; Quirion et coll., 1991).

Jusqu'à maintenant, l'absence d'antagonistes puissants, sélectifs et résistants à la dégradation enzymatique pour chacun des récepteurs aux tachykinines a fait obstacle à la caractérisation réceptorielle de ces effets centraux des tachykinines. Toutefois, l'avènement récent d'antagonistes puissants et sélectifs pour le récepteur NK-1 ((±)-CP-96,345) et pour les sous-types NK-2A (MEN 10,207; MEN 10,376) et NK-2B (R 396) nous a permis de répondre à cette question fondamentale concernant l'origine pharmacologique des effets centraux de la SP et de la NKA.

### Contribution personnelle à cet article

Cette étude a été initiée en Allemagne (Tschöpe, Culman, Itoi et Unger) et complétée à Montréal lors d'une visite d'environ une semaine du Dr. Tschöpe dans notre laboratoire qui m'a enseigné à injecter des drogues par la voie

(continué sur la page 107a)

intracérébroventriculaire (i.c.v.) et à mesurer les comportements chez le rat éveillé. Le Dr. Tschöpe m'a donc aidé à établir cette technique d'injection à l'Université de Montréal. La méthode d'administration i.c.v. demeure un outil utilisé couramment par l'équipe du Dr. Couture aujourd'hui.

La portion effectuée en Allemagne fut la caractérisation du récepteur NK-1. Notre accès aux antagonistes sélectifs pour les sous-types A et B du récepteur NK-2 par le biais du Dr Regoli à Sherbrooke, nous a permis de mieux caractériser les effets de la SP et de la NKA. D'une façon approximative, nous pouvons quantifier à environ deux tiers la portion du travail effectué à Montréal comparativement à l'apport allemand. Alexandre Prat a contribué pour environ un tiers de la contribution Montréalaise, ce qui me laisse avec environ la moitié du travail de l'article au complet. En gardant ces proportions en tête, j'ai effectué les préparations animales, les mesures des réponses cardiovasculaires et comportementales, les protocoles expérimentaux ainsi que l'analyse et l'interprétation des résultats de cet article. Pour réduire la possibilité de variations inter-laboratoire, nous avons repris la caractérisation du récepteur NK-1 avec l'antagoniste non peptidique pour ce récepteur ((±)-CP-96,345). Après avoir confirmé les résultats du groupe Allemand concernant le récepteur NK-1 sur quelques rats dans notre laboratoire, nous avons décidé de conserver les résultats obtenus en Allemagne pour la publication. Même si plus de la moitié des travaux de cette étude a été effectuée à Montréal, Dr. Tschöpe a conservé la position de premier auteur du fait qu'il a initié ces travaux. Donc même si je suis deuxième auteur, il y a probablement autant de travail de ma part sur cet article que sur les chapitres où je suis premier auteur. D'autre part, j'ai aussi participé activement dans l'interprétation des résultats, dans la rédaction et dans la correction de cet article.

---

*USE OF SELECTIVE ANTAGONISTS TO DISSOCIATE THE CENTRAL  
CARDIOVASCULAR AND BEHAVIOURAL EFFECTS OF TACHYKININS  
ON NK<sub>1</sub> AND NK<sub>2</sub> RECEPTORS IN THE RAT*

---

Carsten Tschöpe<sup>§</sup>, Pierre Picard<sup>¶</sup>, Juraj Culman<sup>§</sup>, Alexandre Prat<sup>¶</sup>, Keiichi Itoi<sup>§</sup>,  
Domenico Regoli<sup>†</sup>, Thomas Unger<sup>§</sup> et Réjean Couture<sup>¶</sup>

§ Département de pharmacologie, Université de Heidelberg, Institut  
Allemand de recherche sur l'hypertension artérielle, Heidelberg,  
Allemagne

¶ Département de physiologie, Faculté de médecine, Université de  
Montréal, Groupe de recherche sur le système nerveux autonome,  
Montréal, Québec, Canada

† Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de  
Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

## Summary

1. The effects of intracerebroventricular (i.c.v.) pretreatment with selective NK<sub>1</sub> ((±)-CP 96,345), NK<sub>2a</sub> (MEN 10,207; MEN 10,376) and NK<sub>2b</sub> (R 396) tachykinin receptor antagonists on the cardiovascular and behavioural responses to i.c.v. substance P (SP) and neurokinin A (NKA) were studied in conscious rats.
2. SP and NKA (25 pmol) induced mean arterial blood pressure and heart rate increases of the same magnitude and duration. The cardiovascular responses to both peptides were accompanied by excessive face washing, sniffing, grooming and wet dog shakes.
3. The cardiovascular responses to SP but not to NKA were attenuated by pretreatment with a NK<sub>1</sub> receptor antagonist, (±)-CP 96,345. Of the behavioural responses, only face washing was significantly inhibited.
4. The cardiovascular and behavioural effects of NKA but not of SP were significantly attenuated by pretreatment with the selective NK<sub>2b</sub> receptor antagonist, R 396.
5. The selective NK<sub>2a</sub> receptor antagonists, MEN 10,207 and MEN 10,376, did not affect the cardiovascular and behavioural responses to either SP or NKA.
6. These results suggest, firstly, that the cardiovascular and behavioural effects of i.c.v. SP are mediated by NK<sub>1</sub> receptors; secondly, that NKA injected i.c.v. does not interact with NK<sub>1</sub> receptors but with another type of tachykinin receptor which may belong to the NK<sub>2b</sub> subclass. These findings provide pharmacological evidence for the existence of functionally active NK<sub>2</sub> receptors in the rat brain.

Keywords: Substance P; neurokinin A; NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors; tachykinin antagonists; blood pressure; heart rate; behaviour; central actions.



## Introduction

Tachykinins belong to a family of peptides characterized by the common carboxyl-terminal amino acid sequence Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>. Three distinct tachykinin receptors termed neurokinin<sub>1</sub> (NK<sub>1</sub>), NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> have been characterized by pharmacological and ligand binding studies. These receptors are widely distributed in mammalian tissues and interact differently with the natural tachykinins; substance P (SP) being the preferential agonist for the NK<sub>1</sub> receptor, neurokinin A (NKA) for the NK<sub>2</sub> receptor and neurokinin B (NKB) for the NK<sub>3</sub> receptor (for review see Quirion & Dam, 1988; Helke et al., 1990; Guard & Watson, 1991). Recently, the structures of the tachykinin receptors have been identified by molecular cloning in combination with electrophysiology (Nakanishi, 1991).

Tachykinins have been implicated in central cardiovascular regulation and in motor behaviour. In conscious rats, SP injected intracerebroventricularly (i.c.v.) or intrathecally (i.t.) increases mean arterial blood pressure and heart rate in a dose-dependent manner, mainly by activating the sympathoadrenal system (Unger et al., 1985; 1988; Hasséssian & Couture, 1989; Hasséssian et al., 1990). Increased sympathetic activity is also responsible for the cardiovascular effects of i.c.v. administered NKA while the pressor effects of i.c.v. NKB is due to the release of vasopressin from the posterior pituitary (Takano et al., 1990).

The role of distinct central tachykinin receptors in mediating the cardiovascular and behavioural effects of tachykinins remains obscure. Until now, it is not clear which type of tachykinin receptor is responsible for the central effects of NKA. NKA and its precursor mRNA have been identified in several brain regions (Nawa et al., 1983; 1984; Minamino et al., 1984; Arai & Emson, 1986). However, the presence of NK<sub>2</sub> receptor binding sites in the rat brain remains controversial (Buck et al., 1986; Bergstrom et al., 1987; Mantyh et al. 1989; Dam et al., 1988; 1990; Quirion et al., 1991).

Lack of potent and selective antagonists for each of the three tachykinin receptors has been one of the main reasons why the central mechanisms of these neuropeptides are so poorly understood. However, recently, considerable progress has been made in the characterization of peripheral NK<sub>2</sub> receptors. Two types of NK<sub>2</sub>

receptors referred to as NK<sub>2a</sub> and NK<sub>2b</sub> in the present study have been characterized in peripheral organs thanks to the use of antagonists; indeed, the compound MEN 10,207 has been shown to be an antagonist of NKA on the endothelium-deprived rabbit isolated pulmonary artery while R 396 blocks the effects of NKA on the hamster isolated trachea (Maggi et al., 1990). MEN 10,376 shares the same profile of affinity and selectivity as MEN 10,207 for the NK<sub>2a</sub> receptor subtype but unlike MEN 10,207, MEN 10,376 is devoid of significant agonist activity (Maggi et al., 1991). These studies provide pharmacological evidence for the existence of NK<sub>2</sub> receptor subtypes (Maggi et al., 1990; 1991).

(±)-CP 96,345 has been shown to act as a competitive NK<sub>1</sub> receptor antagonist in various bioassays. This nonpeptide compound was able to block effectively SP induced salivation in rats, a phenomenon that is mediated by NK<sub>1</sub> receptors, but did not affect the NKA-induced contraction of the rabbit isolated aorta, which represents a NK<sub>2</sub> receptor system. Binding studies have revealed that (±)-CP 96,345 binds to a single population of binding sites (NK<sub>1</sub>) in guinea-pig brain but has no affinity for NK<sub>2</sub> or NK<sub>3</sub> sites (Snider et al., 1991a, b; McLean et al., 1991).

In the present study, the selective antagonists of the NK<sub>2a</sub> (MEN 10,207, MEN 10,376) or NK<sub>2b</sub> (R 396) receptors and the NK<sub>1</sub> receptor antagonist, (±)-CP 96,345 were used to characterize the tachykinin receptors that mediate the central cardiovascular and behavioural effects of SP and NKA in conscious rats.

## Methods

### *Implantation of catheters and measurement of cardiovascular and behavioural parameters*

The experiments were performed partly in Montréal, Canada (NK<sub>2</sub> receptor antagonists studies) and partly in Heidelberg, Germany (NK<sub>1</sub> antagonist studies). Male Wistar rats (Charles River, St. Constant, Québec, Canada and Karl Thomae, Biberach, Riss, Germany) weighing 300 g were used. The animals were allowed free access to food and water and maintained on a 12h light/dark cycle (lights on 06 h 00 min - 18 h 00 min).

Rats were anaesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of 65 mg kg<sup>-1</sup> sodium pentobarbitone (Somnotol; MTC Pharmaceutical, Mississauga, Ont. Canada) and an i.c.v. cannula was implanted by use of a Kopf stereotaxic apparatus and fixed to the skull with dental cement. The coordinates were: 0.6 mm caudal to bregma, 1.3 mm lateral to the midline and 5.0 mm vertical from the skull surface. Five days later, the animals were anaesthetized again and a polyethylene catheter (PP-50) was inserted through the femoral artery into the abdominal aorta for measurement of blood pressure and heart rate. The catheter was filled with physiological saline containing heparin (50 i.u. ml<sup>-1</sup>), passed through a subcutaneous tunnel and emerged at the back of the neck. Following surgery, rats were housed individually in a plastic cage with free access to food and water.

Experiments were conducted in a quiet room 48 h after the intravascular surgery on freely moving rats kept in their resident cage (40 × 23 × 20 cm). The arterial pressure was monitored through the intraarterial catheter with a Statham pressure transducer (P231D) while the heart rate was measured with a cardiac tachometer (model 7P4) and both parameters were displayed on a Grass Polygraph (model 79D) (Montréal) or with a Statham P23Db pressure transducer connected to a Gould Brush 2400 recorder (Heidelberg).

The behavioural activity was recorded over a 30 min period starting immediately with the i.c.v. injections. The frequency of the individual behavioural responses: face washing, hind limb grooming or biting, sniffing, rearing, digging and wet dog shakes, was determined according to the 15 s sampling procedure of Gipsen et al. (1975). A score 1 or 0 was given depending on whether the animals during 15 s period showed the specific type of behaviour or not. Summation of scores for 30 min gave the behavioural scores in each experiment. The maximal theoretical score was 120. However, only the data for face washing, hind limb grooming/biting and wet dog shakes are presented in the results. The complete behavioural data consist of the sum of all types of behavioural manifestations studied, namely face washing, hind limb grooming and biting, wet dog shakes, sniffing, rearing and digging.

### *Experimental protocols*

Experiments started when the animal was in a resting state and basal mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) were stable. On the first day of testing, the animals received randomly a single i.c.v. injection of either 25 pmol SP or NKA in a volume of 1  $\mu$ l of artificial cerebrospinal fluid (CSF; composition in mM: NaCl 128.6, KCl 2.6, MgCl<sub>2</sub> 2.0 and CaCl<sub>2</sub> 1.4; pH adjusted to 7.2). The catheter was then flushed with 4  $\mu$ l of CSF over a period of 20-30 s and the cardiovascular and behavioural responses were measured. The day after, one of the antagonists was given i.c.v. (1  $\mu$ l of peptide solution flushed with 4  $\mu$ l of CSF) 5 min before SP or NKA. Control animals were injected with 5  $\mu$ l of CSF instead of SP or NKA. The intrinsic activity of the tachykinin receptor antagonists was tested in separate experiments. Baseline MAP and HR values were calculated 1 min before the injection of 25 pmol SP or NKA. At the end of each experiment, the position of the i.c.v. cannula was verified histologically after post mortem dissection.

### *Peptides and nonpeptide*

( $\pm$ )-CP 96,345 (the racemic mixture of ( $\pm$ )-cis-3-(2-methoxybenzylamino)-2-benzhydryl-quinuclidine) was obtained as a gift from Dr Jaw-Kang Chang, Peninsula Lab., Heidelberg, Germany and used at a dose of 5 nmol; MEN 10,207 (H-Asp-Tyr-D-Trp-Val-D-Trp-D-Trp-Arg-NH<sub>2</sub>) and MEN 10,376 (H-Asp-Tyr-D-Trp-Val-D-Trp-D-Trp-Lys-NH<sub>2</sub>) were kind gifts from Drs C.A. Maggi and P. Rovero at A. Menarini Pharmaceuticals, Florence, Italy and used at a dose of 650 pmol; R 396 (Ac-Leu-Asp-Gln-Trp-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>) was synthesized in the laboratory of Dr D. Regoli at Sherbrooke University, Sherbrooke, Canada by conventional solid-phase methods and used at a dose of 650 pmol. The dose of ( $\pm$ )-CP 96,345 was chosen on the basis of its potency in displacing the labelled SP in the rat forebrain (Snider et al., 1991a). The optimal doses of the selective NK<sub>2</sub> receptor antagonists were identified in preliminary experiments and those of SP and NKA in an earlier study (Itoi, Tschöpe, Jost, Culman, Lebrun, Stauss, Rettig and Unger, unpublished data). SP and NKA were purchased from Bachem, Bubendorf, Switzerland, and from Hükabel Scientific Ltd, Montréal, Canada.

Stock solutions of MEN 10,207 (mol.wt = 1109.3), MEN 10,376 (mol.wt = 1067.3) and R 396 (mol.wt = 809.9) were made in dimethyl sulphoxide (DMSO; Fisher) and CSF was added to obtain the desired solution (the final solution contained a maximum of 1% of DMSO). (±)-CP 96,345 (conjugated with mandelate; mol.wt. = 412.6), SP and NKA were dissolved directly in CSF. The stock solutions (10 mg ml<sup>-1</sup>) of peptides were divided into 100 µl aliquots and stored at -20°C until used.

#### *Statistical analysis of data*

The results are expressed as means ± s.e.mean. Statistical differences were evaluated with Student's *t* test for paired samples. Time course effects were analysed with a two-way analysis of variance (ANOVA) in conjunction with Bonferroni confidence intervals. Only probability values (*P*) smaller than 0.05 were considered to be statistically significant.

#### **Results**

Both peptides, SP and NKA (25 pmol) injected i.c.v. evoked similar increases in MAP and HR which peaked within 5 min and returned gradually to pre-injection levels within 30 min (Tables 1 and 2). When compared to CSF values, both the pressor and HR responses to 25 pmol SP or NKA were significantly increased (*P*<0.001) at 3 and 5 min post-injection. The cardiovascular responses to these peptides were accompanied by increased behavioural activity such as excessive face washing, hind limb grooming/biting and wet dog shakes (Table 3). These behavioural effects occurred at the same time as the cardiovascular responses and presented a similar time course. A similar i.c.v. injection of CSF (5 µl which contained 1% DMSO) was without appreciable effect on cardiovascular parameters (Tables 1 and 2) or on the behaviour (Table 3).

I.c.v. pretreatment with the selective NK<sub>1</sub> receptor antagonist, (±)-CP 96,345 (5 nmol), significantly (*P*<0.05) attenuated the pressor and HR responses induced by 25 pmol SP at 3 and 5 min post-injection (Tables 1 and 2). (±)-CP 96,345 blocked the face washing but not the other behavioural responses to SP (Table 3). The same treatment

with ( $\pm$ )-CP 96,345 failed, however, to affect the cardiovascular and behavioural responses to 25 pmol NKA (Tables 1-3). The NK<sub>2a</sub> receptor antagonist, MEN 10,376 (650 pmol), had no significant effect on either the cardiovascular or behavioural responses to i.c.v. injection of either SP or NKA (Tables 1-3). The second NK<sub>2a</sub> receptor antagonist, MEN 10,207 (650 pmol), was similarly ineffective against the cardiovascular (data not shown) and behavioural responses (Table 3) induced by SP or NKA.

The selective NK<sub>2b</sub> receptor antagonist R 396 (650 pmol) failed to modify the cardiovascular and behavioural responses to i.c.v. SP (Tables 1-3). However, i.c.v. pretreatment with the selective NK<sub>2b</sub> receptor antagonist R 396 (650 pmol) reduced the pressor response to NKA at 3, 5 and 10 min post-injection as well as the HR response at 3, 5, 10 and 20 min after NKA injection (Tables 1 and 2). The face washing, grooming and complete behaviour measured over a 30 min period after NKA injection were significantly antagonized by R 396. However, the latter antagonist had no significant effect on the NKA-induced wet dog shakes (Table 3).

The blocking effects of ( $\pm$ )-CP 96,345 and R 396 respectively on SP and NKA-induced cardiovascular changes and behavioural responses were completely reversed when the rats were tested again with the agonist alone 24 h later (data not shown). None of the tested antagonists had any apparent toxic actions and they all failed to cause significant changes on baseline blood pressure and heart rate (Tables 1 and 2). When given alone for a period of 30 min, these compounds were also devoid of intrinsic cardiovascular and behavioural activity (data not shown).

During the course of this study, we have also tested the compound MDL 28,564 (H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu $\psi$  (CH<sub>2</sub>NH)Leu-NH<sub>2</sub>), a pseudopeptide selective antagonist for the NK<sub>2b</sub> receptor site (Buck et al., 1990; Patacchini et al., 1991). This antagonist was found to be highly toxic after i.c.v. injection in the conscious rat since at a dose of 650 pmol; 4/8 rats died within 15 min following a drastic fall in both blood pressure and heart rate. Hence MDL 28,564 is not useful for studying the NK<sub>2</sub> receptor in the CNS.

**Table 1** Effects of selective tachykinin receptor antagonists on changes in mean arterial blood pressure (MAP) elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P (SP) or neurokinin A (NKA) in the conscious rat

Antagonist	Agonist	n	Baseline MAP	ΔMAP (mm Hg) Time (min) after SP or NKA injection					
				3	5	10	20	30	
—	CSF	8	99.8 ± 5.0	0.9 ± 0.8	0.5 ± 0.7	1.0 ± 0.4	-0.2 ± 0.8	-0.2 ± 0.5	
—	SP	8	97.3 ± 7.0	16.4 ± 1.6	20.4 ± 2.7	2.0 ± 1.5	3.0 ± 2.5	-1.5 ± 0.8	
(±)-CP 96,345 (5 nmol)	SP	8	99.7 ± 6.9	7.6 ± 2.3*	6.1 ± 3.3*	4.0 ± 4.5	1.8 ± 1.1	-4.0 ± 5.2	
—	NKA	8	88.8 ± 4.2	12.4 ± 2.4	9.6 ± 1.8	5.1 ± 1.8	4.0 ± 1.0	3.3 ± 1.7	
(±)-CP 96,345 (5 nmol)	NKA	8	90.6 ± 5.8	11.2 ± 2.2	10.0 ± 3.0	5.3 ± 3.0	4.5 ± 2.5	3.8 ± 3.2	
—	SP	8	106.2 ± 5.7	15.4 ± 1.0	9.8 ± 1.0	4.2 ± 1.0	1.0 ± 0.5	-0.4 ± 0.7	
MEN 10,376 (650 pmol)	SP	8	103.1 ± 5.6	13.5 ± 0.8	12.3 ± 1.1	2.9 ± 1.4	1.5 ± 1.1	-1.0 ± 0.6	
—	NKA	8	98.1 ± 4.5	17.5 ± 1.1	12.7 ± 1.7	3.1 ± 0.8	-0.6 ± 0.5	-1.9 ± 0.7	
MEN 10,376 (650 pmol)	NKA	8	103.1 ± 3.4	16.2 ± 2.3	12.4 ± 1.8	1.7 ± 1.0	-1.2 ± 1.1	-1.4 ± 0.6	
—	SP	8	97.5 ± 6.8	13.6 ± 2.3	12.5 ± 1.2	6.7 ± 1.1	4.2 ± 1.1	-0.8 ± 0.8	
R 396 (650 pmol)	SP	8	100.0 ± 7.8	10.9 ± 1.1	12.6 ± 1.4	6.7 ± 2.1	4.3 ± 1.3	2.4 ± 0.8	
—	NKA	8	93.7 ± 5.9	15.4 ± 1.8	17.5 ± 2.3	9.4 ± 2.2	4.2 ± 2.0	2.7 ± 2.5	
R 396 (650 pmol)	NKA	8	97.2 ± 6.3	3.9 ± 1.5**	-1.1 ± 2.1**	0.6 ± 1.1*	-0.8 ± 1.7	-1.9 ± 2.2	

Values represent the means ± s.e. mean of (n) rats. Statistical significance of the differences between SP or NKA values in the presence and absence of the antagonist was calculated with a two-way ANOVA and is indicated by \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$ .

**Table 2** Effects of selective tachykinin receptor antagonists on changes in heart rate (HR) elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P (SP) or neurokinin A (NKA) in the conscious rat

Antagonist	Agonist	n	Baseline HR	$\Delta$ HR (beats min <sup>-1</sup> )					
				3	5	10	20	30	
—	CSF	8	300.0 ± 10.0	3.1 ± 6.7	3.2 ± 5.0	-1.4 ± 5.3	-1.8 ± 4.6	-1.3 ± 5.0	
—	SP	8	307.1 ± 18.5	97.6 ± 10.7	94.6 ± 14.6	11.4 ± 10.4	-0.3 ± 2.6	-2.3 ± 9.6	
(±)-CP 96,345 (5 nmol)	SP	8	316.9 ± 14.9	51.1 ± 16.3*	25.1 ± 12.1*	-8.8 ± 11.1	-20.3 ± 18.9	-23.3 ± 35.9	
—	NKA	8	286.2 ± 19.4	93.3 ± 19.2	75.4 ± 25.7	14.8 ± 10.1	9.2 ± 11.6	10.4 ± 13.7	
(±)-CP 96,345 (5 nmol)	NKA	8	290.0 ± 7.5	79.2 ± 11.9	52.5 ± 14.6	45.1 ± 17.5	35.0 ± 19.8	15.0 ± 19.3	
—	SP	8	301.2 ± 23.9	191.2 ± 11.0	173.8 ± 16.4	50.0 ± 10.3	13.8 ± 5.8	-2.5 ± 5.5	
MEN 10,376 (650 pmol)	SP	8	287.5 ± 22.1	172.5 ± 16.4	166.2 ± 14.6	61.2 ± 16.8	18.8 ± 9.3	6.2 ± 9.1	
—	NKA	8	308.8 ± 26.6	175.0 ± 19.4	151.2 ± 21.8	40.0 ± 18.9	-2.5 ± 5.2	-5.0 ± 4.4	
MEN 10,376 (650 pmol)	NKA	8	316.2 ± 33.5	172.9 ± 17.8	185.7 ± 12.3	62.9 ± 18.4	11.4 ± 4.9	0.0 ± 4.7	
—	SP	8	306.2 ± 17.7	139.8 ± 11.4	150.5 ± 16.0	116.5 ± 21.3	74.0 ± 13.5	43.5 ± 10.1	
R 396 (650 pmol)	SP	8	312.5 ± 17.3	118.6 ± 12.4	117.1 ± 10.2	100.0 ± 8.5	65.7 ± 11.3	47.1 ± 10.8	
—	NKA	8	285.3 ± 17.9	83.1 ± 14.7	120.0 ± 11.5	66.2 ± 14.4	48.5 ± 14.6	30.0 ± 12.2	
R 396 (650 pmol)	NKA	8	294.2 ± 20.5	30.0 ± 9.7*	15.0 ± 11.8**	6.7 ± 4.9*	0.1 ± 10.0*	1.7 ± 18.7	

See footnote to Table 1.



**Table 3** Effects of selective tachykinin receptor antagonists on behavioral responses elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P (SP) or neurokinin A (NKA) in the conscious rat

Antagonist	Agonist	n	Face washing	Grooming	Wet-dog shake	Complete behavior
—	CSF	8	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.9	6.3 ± 2.4
—	SP	8	12.2 ± 1.1	6.8 ± 1.4	2.6 ± 1.7	29.3 ± 3.3
(±)-CP 96,345	SP	8	4.8 ± 1.6*	6.2 ± 1.2	4.4 ± 1.3	22.5 ± 2.5
—	NKA	8	7.3 ± 1.9	5.2 ± 2.7	4.8 ± 1.3	32.4 ± 2.8
(±)-CP 96,345	NKA	8	12.1 ± 3.3	6.2 ± 0.9	4.0 ± 2.6	39.4 ± 10.2
—	SP	8	12.3 ± 1.2	5.5 ± 1.0	6.1 ± 1.4	66.9 ± 9.7
MEN 10,207	SP	8	10.0 ± 2.5	6.1 ± 1.7	5.2 ± 1.6	64.2 ± 10.5
—	NKA	8	13.1 ± 1.5	6.9 ± 0.9	9.1 ± 1.8	84.2 ± 5.0
MEN 10,207	NKA	8	12.2 ± 1.4	8.5 ± 1.9	7.7 ± 2.8	78.0 ± 6.4
—	SP	8	7.2 ± 1.4	4.8 ± 1.3	5.6 ± 0.8	64.7 ± 3.6
MEN 10,376	SP	8	6.4 ± 1.9	5.4 ± 1.7	5.0 ± 0.9	57.6 ± 11.2
—	NKA	8	11.0 ± 1.5	9.3 ± 1.6	11.5 ± 1.9	77.5 ± 5.4
MEN 10,376	NKA	8	10.8 ± 3.7	8.2 ± 1.8	9.8 ± 1.6	70.8 ± 8.1
—	SP	8	13.1 ± 1.7	6.5 ± 1.1	11.0 ± 2.6	88.2 ± 10.6
R 396	SP	8	7.3 ± 2.1	6.3 ± 2.5	13.1 ± 1.5	73.8 ± 10.2
—	NKA	8	12.9 ± 1.8	8.6 ± 1.1	8.6 ± 1.1	64.2 ± 6.0
R 396	NKA	8	5.0 ± 0.9*	2.6 ± 1.1*	6.0 ± 2.7	26.6 ± 6.0*

Values represent the frequency of the individual behavioural responses for 30 min and are indicated by the mean ± s.e.mean of (n) rats.

\* $P < 0.05$ , antagonist-treated group as compared with its proper control using a Student's *t* test for paired samples. See text for doses of antagonists.

## Discussion

Administration of SP into the lateral ventricle of conscious rats elicits an increase in mean arterial blood pressure and heart rate concurrently with increased locomotor activity, grooming behaviour and rearing. These behavioural responses are compatible with the reaction of rodents to nociceptive stimuli (Unger et al., 1988). Similar cardiovascular responses can be induced by microinjections of SP into distinct hypothalamic areas suggesting that hypothalamic tachykinin receptors may mediate the central cardiovascular and behavioural effects observed after i.c.v. administration of tachykinins (Itoi et al., 1991).

It is however very difficult to reach any conclusions regarding the exact localization of the tachykinin receptors that mediate the cardiovascular and behavioural responses to i.c.v. SP and NKA. Because of the fast onset of the response after i.c.v. administration of the peptides, one can speculate that these receptors may be localized in the circumventricular organs or in adjacent periventricular structures. A peripheral site of action is unlikely since i.v. injections of SP or NKA cause decreases in blood pressure secondary to systemic vasodilatation (Couture et al., 1989). Additionally, selective activation of NK<sub>2</sub> receptors in the spinal cord failed to produce any cardiovascular changes in the conscious rat. The cardiovascular responses induced by the i.t. injection of tachykinins were ascribed to the activation of a NK<sub>1</sub> receptor in the spinal cord (Hasséssian et al., 1988). Thus, it is doubtful that the i.c.v. action of SP and NKA on the cardiovascular system is due to a diffusion of the peptide in the CSF down to the spinal cord. Furthermore, Higher doses of intrathecal SP (at least 6.5 nmol) were required to induce similar cardiovascular changes in the conscious rat (Hasséssian et al., 1988).

As expected, the cardiovascular effects of i.c.v. SP were reduced after pretreatment of the animals with the selective NK<sub>1</sub> receptor antagonist, (±)-CP 96,345, but were not affected by pretreatment with selective NK<sub>2a</sub> or NK<sub>2b</sub> receptor antagonists. The NK<sub>1</sub> antagonist, (±)-CP 96,345, attenuated the cardiovascular response and only the face washing. This may suggest that the cardiovascular and behavioural effects of i.c.v. SP can be mediated by different brain structures or NK<sub>1</sub> receptor

subclasses which may not be equally influenced by this NK<sub>1</sub> receptor antagonist. Since (±)-CP 96,345 is a nonpeptide compound that crosses the blood brain barrier (Picard and Couture, unpublished observations), the diffusion and distribution of this antagonist in the periventricular areas after i.c.v. administration may differ significantly from the diffusion of SP and this may account for the absence of effect of the antagonist.

The dose of (±)-CP 96,345 used to antagonize SP was relatively high. This is in agreement with the low binding potency of this compound to NK<sub>1</sub> receptors in the rat brain compared to the guinea-pig, human, rabbit or bovine brains (Snider et al., 1991a; Gitter et al., 1991). Even these high doses of (±)-CP 96,345 were devoid of any agonistic activity with respect to changes in blood pressure, heart rate or behaviour. It has been reported that (±)-CP 96,345, albeit at high concentrations, displays non-specific effects in peripheral tissues *in vitro* (Boyle et al., 1991) and also binds with high affinity to the diltiazem site on L-type calcium channels in both rat and guinea-pig CNS (Guard et al., unpublished observations). In the present study, the cardiovascular and behavioural effects of NKA were not affected by (±)-CP 96,345 which suggests a specific action on NK<sub>1</sub> receptors although non-tachykinin receptor-mediated actions of the compound cannot be completely excluded.

The magnitude and duration of the cardiovascular response to i.c.v. NKA were similar to those of SP. Our results are in agreement with the finding of Takano et al. (1990), who however used anaesthetized animals and higher doses of tachykinin peptides. Of all the selective tachykinin receptor antagonists tested, only the NK<sub>2b</sub> receptor antagonist R 396 attenuated the cardiovascular effect of i.c.v. NKA. The two NK<sub>2a</sub> receptor antagonists MEN 10,207 and MEN 10,376 did not affect the cardiovascular response to i.c.v. NKA. The selective NK<sub>2b</sub> receptor antagonist R 396 (Maggi et al., 1990; Patacchini et al., 1991) affected in a similar way both the cardiovascular and the behavioural responses to NKA, except that of wet dog shakes. Wet dog shakes was claimed to be a typical behavioural manifestation induced by the activation of central NK<sub>3</sub> receptors (Elliott & Iversen, 1986; Stoessl et al., 1988) which can be stimulated by NKA (Regoli et al., 1988).

The pressor response to i.c.v. SP or NKA is brought about by sympathoadrenal activation whereas increased release of vasopressin is responsible for an increase in blood pressure after i.c.v. NKB (Takano et al., 1990). The NK<sub>1</sub> antagonist, (±)-CP 96,345, failed to modify the cardiovascular response to NKA which was, however, blocked by R 396, a fairly selective antagonist of NK<sub>2</sub> receptors that is weakly active on NK<sub>3</sub> receptors (Maggi et al., 1990). Thus, the central effects of NKA are unlikely to be mediated by either NK<sub>1</sub> or NK<sub>3</sub> receptors. Our present data strongly suggest that the presence of a discrete population of functionally active NK<sub>2</sub> receptors in the brain which may belong to the NK<sub>2b</sub> receptor subclass (Maggi et al., 1991, van Giersbergen, 1990). Hence, the present functional study sheds light on the conflicting results regarding the presence of NK<sub>2</sub> receptor binding sites in the CNS (Buck et al., 1986; Saffroy et al., 1987; Mantyh et al., 1989; Dam et al., 1988; 1990; Quirion et al., 1991; Dietl & Palacios, 1991).

In conclusion, selective and potent antagonists of NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors have been used to characterize the receptor subtypes which are responsible for the central cardiovascular and behavioural effects of SP and NKA. Although the integrated cardiovascular and behavioural response patterns to both peptides injected i.c.v. were identical, our findings show that the response to SP was mediated by NK<sub>1</sub> receptors and that to NKA by NK<sub>2</sub> receptors which belong to NK<sub>2b</sub> subclass (similar to that found in the hamster isolated trachea). Hence, our data provide evidence for the existence of distinct population of functionally active NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors in the adult rat brain.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Dr Jaw-Kang Chang from Peninsula laboratories, Heidelberg, who generously provided (±)-CP 96,345 and to Dr Carlo A. Maggi from Menarini Pharmaceuticals, Florence for the generous gifts of MEN 10,207 and MEN 10,376. This work was supported by a grant (MT-8925) from the Medical Research Council of Canada (MRCC) to R.C. and by a grant in aid from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Un 47/2-3) to T.U. P.P. holds a studentship from the Université de Montréal, A.P. is a medical scientist of the Heart and Stroke Foundation of Canada. D.R. is a career investigator of the MRCC. R.C. is a senior Scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## References

- Arai, H. et Emson, P.C., Regional distribution of neuropeptide K and other tachykinins (neurokinin A, neurokinin B and substance P) in rat central nervous system. *Brain Res.*, 399: 240-249, 1986.
- Bergstrom, L., Torrens, Y., Saffroy, M., Beaujouan, J.C., Lavielle, S., Chassaing, G., Morgat, J.L., Glowinski, J. et Marquet, A., <sup>3</sup>H-Neurokinin B and <sup>125</sup>I-Bolton Hunter eledoisin label identical tachykinin binding sites in the rat brain. *J. Neurochem.*, 48: 125-133, 1987.
- Boyle, S.J., Howson, W. et McKnight, A.T., An examination of the selectivity of a new non-peptide tachykinin antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, 104: 146P, 1991.
- Buck, S.H., Helke, C.J., Burcher, E., Shults, C.W. et O'Donohue, T.L., Pharmacologic characterization and autoradiographic distribution of binding sites for iodinated tachykinins in the rat central nervous system. *Peptides*, 7: 1109-1120, 1986.
- Buck, S.H., Harbeson, S.L., Hassmann III, C.F., Shatzer, S.A., Rouissi, N., Nantel, F. et Van Giersbergen, P.L.M., [Leu<sup>9</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Leu<sup>10</sup>]-Neurokinin A (4-10) (MDL 28,564) distinguishes tissue tachykinin peptide NK<sub>2</sub> receptors. *Life Sci. (Pharmacol. Lett.)* 47: PL37-PL41, 1990.
- Couture, R., Laneuville, O., Guimond, C., Drapeau, G. et Regoli, D., Characterization of the peripheral action of neurokinins and neurokinin receptor selective agonists on the rat cardiovascular system. *Naunyn-Schm. Arch. Pharmacol.*, 340: 547-557, 1989.
- Dam, T.V., Escher, E. et Quirion, R., Evidence for the existence of three classes of neurokinin receptors in brain. Differential ontogeny of neurokinin-1, neurokinin-2 and neurokinin-3 binding sites in rat cerebral cortex. *Brain Res.*, 453: 372-376, 1988.
- Dam, T.V., Takeda, Y., Krause, J.E., Escher, E. et Quirion, R., Gamma-preprotachykinin-(72-92)-peptide amide: An endogenous preprotachykinin I gene-derived peptide that preferentially binds to neurokinin-2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 246-250, 1990.
- Dielt, M.M. et Palacios, J.M., Phylogeny of tachykinin receptor localization in the vertebrate central nervous system: apparent absence of neurokinin-2 and neurokinin-3 binding sites in the human brain. *Brain Res.*, 539: 211-222, 1991.
- Elliott, P.J. et Iversen, S.D., Behavioural effects of tachykinins and related peptides. *Brain Res.*, 381: 68-76, 1986.

- Guard, S. et Watson, S.P., Tachykinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. *Neurochem. Int.*, 18: 149-165, 1991.
- Gipsen, W.H., Wiegant, V.M., Greven, H.M. et De Wied, D., The induction of excessive grooming in the rat by intraventricular application of peptides derived from ACTH: structure-activity studies. *Life Sci.*, 17: 645-652, 1975.
- Gitter, B.D., Waters, D.C., Burns, R.F., Mason, N.R., Nixon, J.A. et Howbert, J.J., Species differences in affinities of non-peptide antagonists for substance P receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 197: 237-238, 1991.
- Hasséssian, H. et Couture, R., Cardiovascular responses induced by intrathecal substance P in the conscious freely moving rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 13: 594-602, 1989.
- Hasséssian, H., Couture, R. et DeChamplain, J., Sympathoadrenal mechanisms underlying cardiovascular responses to intrathecal substance P in conscious rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 15: 736-744, 1990.
- Hasséssian, H., Drapeau, G. et Couture, R., Spinal action of neurokinins producing cardiovascular responses in the conscious freely moving rat: evidence for a NK-1 receptor mechanism. *Naunyn-Schm. Arch. Pharmacol.*, 338: 649-654, 1988.
- Helke, C.J., Krause, J.E., Mantyh, P.W., Couture, R. et Bannon, M.J., Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms. *FASEB*, 4: 1606-1615, 1990.
- Itoi, K., Jost, N., Badoer, E., Tschöpe, C., Culman, J. et Unger, Th., Localization of the substance P-induced cardiovascular responses in the rat hypothalamus. *Brain Res.*, 558: 123-126, 1991.
- Maggi, C.A., Giuliani, S., Ballati, L., Lecci, A., Manzini, S., Patacchini, R., Renzetti, A.R., Rovero, P., Quartara, L. et Giachetti, A., In vivo evidence for tachykininergic transmission using a new NK-2 receptor-selective antagonist, MEN 10,376. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257: 1172-1178, 1991.
- Maggi, C.A., Patacchini, R., Giuliani, S., Rovero, P., Dion, S., Regoli, D., Giachetti, A. et Meli, A., Competitive antagonists discriminate between NK<sub>2</sub> tachykinin receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.*, 100: 588-592, 1990.
- 
- Mantyh, P.W., Gates, T.S., Mantyh, C.R. et Maggio, J.E., Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. *J. Neurosci.*, 9: 258-279, 1989.

- McLean, S., Ganong, A.H., Seeger, Th.F., Bryce, D.K., Pratt, K.G., Reynolds, L.S., Siok, C.J., Lowe III, J.A. et Heym, J., Activity and distribution of binding sites in brain of a nonpeptide substance P (NK<sub>1</sub>) receptor antagonist. *Science*, 251: 437-439, 1991.
- Minamino, N., Masuda, H., Kangawa, K. et Matsuo, H., Regional distribution of neuromedin K and neuromedin L in rat brain and spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124: 731-738, 1984.
- Nakanishi, S., Mammalian tachykinin receptors. *Ann. Rev. Neurosci.*, 14: 123-136, 1991.
- Nawa, H., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S. et Nakanishi, S., Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. *Nature*, 306: 32-36, 1983.
- Nawa, H., Kotani, H. et Nakanishi, S., Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. *Nature*, 312: 729-734, 1984.
- Patacchini, R., Astolfi, M., Quartara, L., Rovero, P., Giachetti, A. et Maggi, C.A., Further evidence for the existence of NK<sub>2</sub> tachykinin receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.*, 104: 91-96, 1991.
- Quirion, R. et Dam, T.V., Multiple neurokinin receptors: recent developments. *Regul. Peptides*, 22: 18-25, 1988.
- Quirion, R., Dam, T.V. et Guard, S., Selective neurokinin receptor radioligands. In: *Substance P and Related Peptides: Cellular and Molecular Physiology*, Annals of the New York Academy of Sciences, 632: 137-144, 1991.
- Regoli, D., Drapeau, G., Dion, S. et D'Orleans-Juste, P., Pharmacological receptors for substance P and neurokinins. *Life Sci.*, 40: 109-117, 1987.
- Saffroy, M., Beaujouan, J.-C., Torrens, Y., Besseyre, J., Bergström, L. et Glowinski, J., Localization of tachykinin binding sites (NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub>, NK<sub>3</sub> ligands) in the rat brain. *Peptides*, 9: 227-241, 1987.
- Snider, R.M., Constantine, J.W., Lowe III, J.A., Longo, K.P., Lebel, W.S., Woody, H.A., Drozda, S.E., Desai, M.C., Vinick, F.J., Spencer, R.W. et Hess, H.-J., A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK<sub>1</sub>) receptor. *Science*, 251: 435-437, 1991.
- Snider, R.M., Longo, K.P., Drozda, S.E., Lowe III J.A. et Leeman, S.E., Effect of CP-96,345, a nonpeptide substance P receptor antagonist, on salivation in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 10042-10044, 1991b.

- Stoessl, A.J., Dourish, C.T. et Iversen, S.D., The NK-3 tachykinin receptor agonist senktide elicits 5-HT-mediated behaviour following central or peripheral administration in mice and rats. *Br. J. Pharmacol.*, 94: 285-287, 1988.
- Takano, Y., Nagashima, A., Hagio, T., Tateishi, K. et Kamiya, H.-O., Role of central tachykinin peptides in cardiovascular regulation in rats. *Brain Res.*, 528: 231-237, 1990.
- Unger, Th., Becker, H., Petty, M., Demmert, G., Schneider, B., Ganten, D. et Lang, R.E., Differential effects of central angiotensin II and substance P on sympathetic nerve activity in conscious rats. *Circ. Res.*, 56: 563-575, 1985.
- Unger, Th., Carolus, S., Demmert, G., Ganten, D., Lang, R.E., Maser-Gluth, C., Steinberg, H. et Veelken, R., Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: Pharmacological characterization. *Circ. Res.*, 63: 812-820, 1988.
- Van Giersbergen, P.L.M., Shatzer, S.A., Henderson, A.K., Lai, J., Nakanishi, S., Yamamura, H.I. et Buck, S.H., Characterization of a tachykinin peptide NK<sub>2</sub> receptor transfected into murine fibroblast B82 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1661-1665, 1990.
-



## CHAPITRE 3

# CARACTERISATION DES TROIS RECEPTEURS INTRACEREBRAUX DES TACHYKININES DANS LE CONTROLE CARDIOVASCULAIRE ET COMPORTEMENTAL

*"Il y a trois sortes de mensonges: les mensonges, les sacrés mensonges et les statistiques."*

---

Mark Twain, 1888 (Autobiographie)

## Avant-propos au troisième chapitre

Les résultats du deuxième chapitre ont démontré la présence fonctionnelle des récepteurs NK-1 et NK-2B dans le SNC du rat. Toutefois, l'antagoniste non peptidique du récepteur NK-1, le ( $\pm$ )-CP-96,345 possède des effets non spécifiques associés à l'inhibition des canaux calciques de type-L (Schmidt et coll., 1992; Guard et coll., 1993) et des canaux sodiques voltage-dépendant (Caeser et coll., 1993). Ainsi, afin de confirmer l'interaction de la SP avec le récepteur NK-1 central, nous utiliserons au cours de ce chapitre un nouvel antagoniste non peptidique sélectif pour ce récepteur, le RP-67,580 (Garret et coll., 1992; Carruette et coll., 1992; Rouissi et coll., 1993). Par la même occasion, le premier antagoniste non peptidique du récepteur NK-2, le SR-48,968 (Advenier et coll., 1992; Emonds-Alt et coll., 1992) sera utilisé pour confirmer l'interaction de la NKA avec le récepteur NK-2 central chez le rat éveillé. En effet, ces deux nouveaux antagonistes non peptidiques sont à la fois puissants, spécifiques, sélectifs, compétitifs, réversibles et dépourvus d'effets toxiques dans le SNC; ils représentent donc des outils appropriés pour l'étude fonctionnelle des récepteurs NK-1 et NK-2 centraux chez le rat (Advenier et coll., 1992; Rouissi et coll., 1993; Maggi et coll., 1993a; Picard et coll., 1993). Jusqu'à maintenant, l'absence d'antagonistes sélectifs pour les récepteur NK-3 a limité nos connaissances concernant le rôle de ce récepteur dans le contrôle cardiovasculaire et comportemental dans le SNC. Les antagonistes R-486 et R-487 appartiennent à la première génération d'antagonistes pour le récepteur NK-3 (Regoli et coll., 1991). Le R-487 bloque sélectivement les effets antinociceptifs du [MePhe<sup>7</sup>]NKB dans le modèle du tail-flick test chez le rat (Couture et coll., 1993).

Il y aura donc deux volets à cette étude : d'une part, nous avons voulu confirmer l'activation des récepteurs NK-1 et NK-2 centraux suivant l'application i.c.v. de SP et de NKA respectivement, en utilisant des nouveaux antagonistes non peptidiques (RP-67,580 et SR-48,968) et d'autre part, nous avons voulu déterminer l'implication du récepteur NK-3 dans les effets cardiovasculaires et comportementaux centraux des tachykinines en utilisant un agoniste sélectif ([MePhe<sup>7</sup>]NKB) et un antagoniste sélectif (R-486) pour ce récepteur.

(continué sur la page 127a)

**Contribution personnelle à cet article**

J'ai effectué toutes les préparations animales, les mesures des réponses cardiovasculaires et comportementales, les protocoles expérimentaux ainsi que l'analyse et l'interprétation des résultats de cet article. Le Dr. Regoli a fournis les molécules nécessaires à l'originalité de cette étude. De plus, avec l'aide du Dr. Couture, j'ai rédigé et corrigé ce manuscrit.

---

---

*CARDIOVASCULAR AND BEHAVIOURAL EFFECTS OF CENTRALLY  
ADMINISTERED TACHYKININS IN THE RAT: CHARACTERIZATION OF  
RECEPTORS WITH SELECTIVE ANTAGONISTS*

---

Pierre Picard<sup>¶</sup>, Domenico Regoli<sup>†</sup>, Réjean Couture<sup>¶</sup>

¶ Département de physiologie, Faculté de médecine, Université de  
Montréal, Groupe de recherche sur le système nerveux autonome,  
Montréal, Québec, Canada

† Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de  
Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

## Summary

1. The effects of intracerebroventricular (i.c.v.) injection of selective and potent NK<sub>1</sub> (RP 67580), NK<sub>2</sub> (SR 48968) and NK<sub>3</sub> (R 486, [Trp<sup>7</sup>, β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10)) receptor antagonists were assessed on the cardiovascular and behavioural responses elicited by the i.c.v. injection of substance P (SP), neurokinin A (NKA) or [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B ([MePhe<sup>7</sup>]NKB) in the conscious freely moving rat.
2. SP, NKA and [MePhe<sup>7</sup>]NKB (5-650 pmol) evoked dose-dependent increases in mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) with the rank order of potency SP > NKA > [MePhe<sup>7</sup>]NKB. The cardiovascular responses were accompanied by excessive face washing, grooming and wet dog shakes.
3. The cardiovascular effects and face washing behaviour induced by SP (25 pmol) were significantly reduced by the pre-injection (i.c.v., 5 min earlier) of RP 67580 (6.5 nmol). However, this antagonist failed to affect the central effects of 25 pmol NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB.
4. The cardiovascular and behavioural responses (except for wet dog shakes) elicited by NKA (25 pmol) were significantly reduced by 6.5 nmol SR 48968. However, the latter antagonist had no effect on the SP or [MePhe<sup>7</sup>]NKB-mediated responses.
5. Both cardiovascular and behavioural effects produced by either SP or NKA (25 pmol) were completely abolished when rats were pretreated with a combination of RP 67580 (6.5 nmol) and SR 48968 (6.5 nmol), yet this combination of antagonists failed to modify the central effects of [MePhe<sup>7</sup>]NKB.
6. R 486 (6.5 nmol) inhibited the cardiovascular effects as well as wet dog shakes produced by [MePhe<sup>7</sup>]NKB, but it was inactive against the responses induced by either SP or NKA.

7. None of the tachykinin receptor antagonists or agonists caused motor impairment or respiratory distress. All antagonists blocked in a reversible manner and were devoid of intrinsic activity except R 486 (6.5 nmol) which produced a transient increase of MAP and HR.
8. These results suggest that the central effects of SP, NKA and [MePhe<sup>7</sup>]NKB are primarily mediated by central NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors, respectively. However, a minor activation of NK<sub>2</sub> receptors by SP and NK<sub>1</sub> receptors by NKA was seen under blockade of both receptors. This study therefore supports the existence of functional NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors in the adult rat brain.

Keywords: Substance P; neurokinin A; neurokinin B; tachykinin receptors; tachykinin antagonists; central effects; cardiovascular system; behaviour

## Introduction

The mammalian tachykinins, substance P (SP), neurokinin A (NKA), and neurokinin B (NKB) are widely distributed in the central nervous system (CNS) and peripheral tissues. They are believed to play several neurotransmitter functions in central cardiovascular regulation, motor activity, and on sensory, autonomic and endocrine systems (for review see Otsuka & Yoshioka, 1993). So far, three tachykinin receptors termed NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub>, have been cloned and pharmacologically characterized. The rank order of potency of tachykinins is SP > NKA > NKB for the NK<sub>1</sub> receptor, NKA > NKB > SP for the NK<sub>2</sub> receptor and NKB > NKA > SP for the NK<sub>3</sub> receptor (Guard & Watson, 1991; Maggi et al., 1993b; Mussap et al., 1993).

Intracerebroventricular (i.c.v.) injection of SP or NKA in the conscious freely moving rat leads to increase in mean arterial blood pressure (MAP), heart rate (HR), cardiac output, and to enhanced locomotor activity, awareness, scratching and face washing behaviours (Unger et al., 1988; Itoi et al., 1992; Tschöpe et al., 1992). On the other hand, administration of NKB or the NK<sub>3</sub>-selective agonist, senktide, into the lateral ventricle of the conscious rat also induces increases in blood pressure and HR,

but evokes a unique behavioural pattern, the wet dog shake (Itoi et al., 1992). Although all three tachykinins have been reported to act mainly on hypothalamic neurones (Itoi et al., 1991; Massi et al., 1991), the cardiovascular responses induced by either SP or NKA have been associated with an increased sympathoadrenal activity (Unger et al., 1981; Takano et al., 1990), while those induced by i.c.v. injection of NK<sub>3</sub> agonists would result mainly from the release of vasopressin from the hypothalamus and to a minor extent by activation of the sympathetic nervous system (Polidori et al., 1989; Takano et al., 1990; 1993).

Tachykinin antagonists may represent useful pharmacological tools to characterize central tachykinin receptors and to define better the role of these neuropeptides in central cardiovascular regulation. In a recent study, we provided evidence for the existence of distinct populations of functionally active NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors in the adult rat brain with the use of selective tachykinin antagonists, namely (±)-CP 96345 to block the NK<sub>1</sub>, MEN 10207, MEN 10376 and R 396 to inhibit the NK<sub>2</sub> receptor. It was concluded that the cardiovascular and behavioural effects of i.c.v. SP and NKA are mediated by NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors, respectively (Tschöpe et al., 1992). The role of NK<sub>1</sub> receptors in the central action of SP remains, however, to be confirmed as the quinuclidine antagonist (±)-CP 96345 may act as an antagonist of L-type calcium channels in rat cardiac and brain tissue (Schmidt et al., 1992; Guard et al., 1993) and as a blocker of voltage-dependent sodium currents in rat neocortical neurones (Caeser et al., 1993). Hence, non-specific effects produced by (±)-CP 96345, probably not related to an interaction with tachykinin receptors, could not be excluded in our earlier study (Tschöpe et al., 1992). In this respect, the perhydroisoindolone compound RP 67580 is a new, potent and promising non-peptide antagonist selective for the NK<sub>1</sub> receptor showing higher potency in rat than in guinea-pig and man (Garret et al., 1992; Carruette et al., 1992; Rouissi et al., 1993). Moreover, the new selective NK<sub>2</sub> receptor non-peptide antagonist, SR 48968, has higher affinity and stability than the former peptide antagonists (MEN 10207, MEN 10376, R 396, MDL 28564) (Advenier et al., 1992; Emonds-Alt et al., 1992). SR 48968 blocks in a dose-dependent and reversible manner the hyperalgesic response to NKA(4-10) (selective NK<sub>2</sub> agonist) but not that induced by [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (selective NK<sub>1</sub> agonist) in the rat spinal cord (Picard et al., 1993). RP

67580 and SR 48968 are potent antagonists which exert specific, competitive, reversible, yet non toxic antagonism and should therefore be suitable for studying the function of central NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors (Advenier et al., 1992; Rouissi et al., 1993; Maggi et al., 1993a; Picard et al., 1993). Up to now, the lack of a potent and selective NK<sub>3</sub> receptor antagonist had limited our understanding of the role played by this receptor in central cardiovascular regulation. However, R 486, R 487 and GR 138676 belong to the first generation of peptide antagonists selective for the NK<sub>3</sub> receptor (Regoli et al., 1991; Stables et al., 1993). R 487 blocks in a specific manner the antinociceptive effect of intrathecally injected [MePhe<sup>7</sup>]NKB (selective NK<sub>3</sub> agonist) in the rat tail-flick test (Couture et al., 1993).

The purpose of the present study was twofold: firstly, to confirm the participation of NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors in central cardiovascular and behavioural effects of SP and NKA, by using newly developed, non-peptide, receptor selective antagonists (RP 67580 and SR 48968). Secondly, to determine the participation of central NK<sub>3</sub> receptors in the cardiovascular and behavioural effects of tachykinins by using a selective agonist ([MePhe<sup>7</sup>]NKB) and antagonist (R 486) of the NK<sub>3</sub> receptor. A preliminary account of this work has been presented elsewhere (Picard et al., 1992).

## Methods

### *Animal preparation*

Male Wistar rats (Charles River, St. Constant, Québec, Canada) weighing 300-350 g were used. The animals were allowed free access to food and water and maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on 06 h 00 min -18 h 00 min).

Rats were anaesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of 65 mg kg<sup>-1</sup> sodium pentobarbitone (Somnotol; M.T.C. Pharmaceuticals, Cambridge, Ont. Canada) and an i.c.v. polyethylene cannula (PE-20; Intramedic, Clay Adams, NJ, U.S.A.) was implanted into the right brain ventricle by use of a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, U.S.A.) and fixed to the skull with dental cement (Reliance



Dental MFG. Co., Worth, IL, U.S.A.). The co-ordinates were 1.3 mm lateral to the midline, 0.6 mm caudal to the bregma and 5.0 mm vertical from the skull surface. The angle of the head was adjusted according to the horizontal plan with respect to bregma and lambda reference points. The animals were then placed in individual plastic cages (40 cm × 23 cm × 20 cm). After a recovery period of 24 h, rats were anaesthetized again and a second polyethylene cannula (PE-50) was inserted through a femoral artery into the abdominal aorta for measurement of blood pressure and heart rate. The pre-siliconized intraarterial catheter was filled with physiological saline containing heparin sodium salt (100 i.u. ml<sup>-1</sup>), passed through a subcutaneous tunnel and emerged at the back of the neck. Experiments were conducted 24 h after the intravascular surgery on conscious unrestrained rats kept in their resident cage.

Rats were injected i.c.v. with 25 pmol angiotensin II (AII) to verify the potency of the i.c.v. cannula. Only those animals which responded by an immediate sharp rise of blood pressure associated with an intense dipsogenic activity as reported earlier (Thunhorst & Johnson, 1993) were included in the study. The correct position of the i.c.v. cannula was verified histologically by post-mortem dissection.

#### *Measurement of cardiovascular and behavioural responses*

The arterial pressure was monitored through the intraarterial catheter with a Statham pressure transducer (P231D) while the heart rate was measured with a cardiac tachometer (model 7P4) and both variables were displayed on a Grass polygraph model 79D (Grass Instruments Co., Quincy, MA., U.S.A.). Experiments started when the animal was in a resting state and basal MAP and HR were stable.

The behavioural activity was recorded in their resident plastic cage over a 30 min period starting immediately with the i.c.v. injections. During the course of these experiments, the grid cage top was removed. The frequency of the individual behavioural responses: face washing and grooming, was determined according to the 15 s sampling procedure of Gispen et al. (1975). During every consecutive periods of 15 s, a score 1 or 0 was given systematically depending on whether the animal showed the

specific type of behaviour or not, whatever its frequency, intensity or duration during that period. Summation of scores for 30 min following the i.c.v. injection gave the behavioural scores for face washing and grooming in each experiment. The maximal theoretical score was 120 (15 s intervals x 30 min). The wet dog shake was measured according to the number of episodes (less than 1 s each) during the 30 min period whatever the intensity.

### *Experimental protocols*

In the first series of experiments, the effects of three to four doses (5 pmol, 25 pmol, 65 pmol, 325 pmol or 650 pmol) of SP, NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB on MAP and HR were measured following i.c.v. administration. Only one peptide was administered to a rat at increasing doses; each dose was administered at intervals of 24 h to avoid tachyphylaxis (Itoi et al., 1992), in a volume of 1 µl of artificial cerebrospinal fluid (CSF; composition in mM: NaCl 128.6, KCl 2.6, MgCl<sub>2</sub> 2.0 and CaCl<sub>2</sub> 1.4; pH adjusted to 7.2). The catheter was then flushed with 4 µl of CSF over a period of 20-30s and the cardiovascular responses were measured for 30 min. Control animals were injected with 5 µl CSF only.

In the second series of experiments, the animals received randomly a single i.c.v. injection of either 25 pmol SP, NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB (1 µl of peptide solution flushed with 4 µl of CSF) and the cardiovascular and behavioural responses were measured over a period of 30 min. The vehicle CSF containing dimethylsulfoxide (DMSO), used to dissolve the tested antagonist, was injected i.c.v. 5 min prior to the agonist. On the second day, CSF or one of the three antagonists (RP 67580, SR 48968 and R 486) were randomly administered i.c.v., at 6.5 or 65 nmol, 5 min prior to SP, NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB. Only one antagonist was administered to each animal. On the third day, the tested agonist was injected alone to evaluate the reversibility of any inhibition produced by the antagonist. No tachyphylaxis to SP, NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB was seen on MAP, HR, face washing, grooming and wet dog shakes when each agonist (25 pmol) was injected i.c.v. on three consecutive days (Figure 1). The intrinsic activity of the

antagonists was tested in separate experiments. Baseline MAP and HR values were calculated 1 min before the injection of 25 pmol SP, NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB.

### *Peptides and non-peptides*

The non-peptide NK<sub>1</sub> antagonist, RP 67580 (racemic form of 7,7-diphenyl-2[1-imino-2(2-methoxy-phenyl)-ethyl]perhydroisoindol-4-one (3aR, 7aR); mol. wt.: 475,0 for the hydrochloride salt) was a gift from Dr C. Garret, Rhône-Poulenc Rorer, Paris, France. The NK<sub>2</sub> antagonist SR 48968 ((S)-N-methyl-N[4-(4-acetylamino-4-phenyl)piperidino]-2-(3,4-dichlorophenyl)-butyl]benzamide; mol. wt.: 570,0) was a gift of Dr J.-C. Brelière, Sanofi, Montpellier, France. R 486 (H-Asp-Ser-Phe-Trp-β-Ala-Leu-Met-NH<sub>2</sub>; mol. wt.: 868.1) and [MePhe<sup>7</sup>]NKB (H-Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) were synthesized in the laboratory of Dr D. Regoli at Sherbrooke University, Sherbrooke, Canada by conventional solid-phase methods. SP, NKA and AII were purchased from Hükabel Scientific Ltd, Montréal, Canada. Heparin sodium salt Grade II from porcine intestinal mucosa was purchased from Sigma chemicals (St-Louis, MO, U.S.A.). The antagonists and [MePhe<sup>7</sup>]NKB were dissolved in DMSO (Fisher) and CSF was added to obtain the desired solution (the final solution contained a maximum of 30% of DMSO). SP, NKA and AII were dissolved directly in CSF. The stock solutions (1-10 mg ml<sup>-1</sup>) of peptides and non-peptides were divided into 100 µl aliquots and stored at -20 °C until used. Daily dilutions were made in CSF before each experiment.

### *Statistical analysis of data*

The results are expressed as mean ± s.e.mean. Statistical differences were evaluated with Student's *t* test for paired samples or Wilcoxon-Mann-Whitney (U) test for unpaired samples on non parametric values (behaviour frequency). When more than one comparison was made, the significance of differences among groups was evaluated with a two-way analysis of variance (ANOVA) in conjunction with

Bonferroni confidence intervals. Only probability values (*P*) smaller than 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

### *Central cardiovascular and behavioural effects induced by SP, NKA and [MePhe<sup>7</sup>]NKB*

The i.c.v. injection of 5 pmol SP, NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB failed to cause significant cardiovascular changes when compared with CSF values (Figure 2). However, at 25 pmol all three agonists induced significant increases of MAP and HR ( $P < 0.001$ ) which reached a maximum at 3-5 min and returned gradually to pre-injection levels within 30 min (Figures 2 and 3). The doses of 65 pmol and 325 pmol SP produced further increases of MAP and HR. However, cardiovascular responses were maximal at 25 pmol NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB as higher doses (325 and 650 pmol) failed to cause further increases of MAP and HR (Figure 2). Thus, the agonists evoked maximal cardiovascular changes (3-5 min post-injection) with the rank order of potency SP > NKA > [MePhe<sup>7</sup>]NKB (Figure 2). The dose selected for each agonist in the further experiments was 25 pmol.

The cardiovascular responses elicited by SP and NKA were accompanied by excessive face washing and grooming/biting of hindlimbs (Table 3). These behavioural effects occurred simultaneously with the cardiovascular responses and presented a similar time course. On the other hand, i.c.v. injected [MePhe<sup>7</sup>]NKB induced not exclusively but mainly uninterrupted wet dog shakes for the 30 min observation period; this behaviour was not parallel to the cardiovascular effects (Tables 1 - 3). When injected i.c.v., CSF (5  $\mu$ l) produced no appreciable cardiovascular (Tables 1 and 2) or behavioural (Table 3) effects.

---

*Effects of tachykinin receptor antagonists on the responses to SP, NKA and [MePhe<sup>7</sup>]NKB*

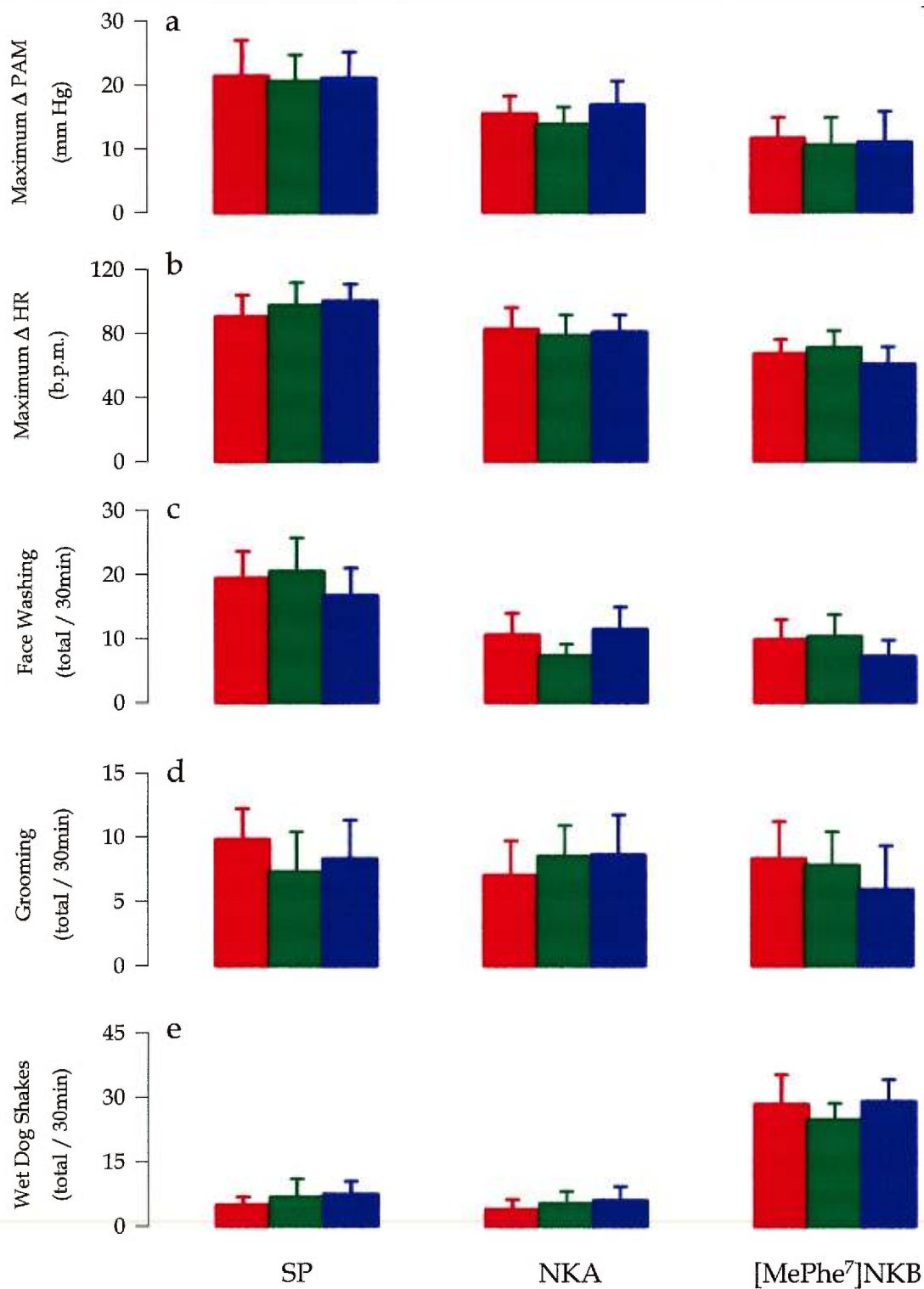
Cardiovascular responses as well as face washing but not grooming and wet dog shake induced by 25 pmol SP were significantly reduced (by about 50-70%) when animals were pretreated with 6.5 nmol RP 67580 (Tables 1 - 3). The inhibitory effect of the antagonist was no longer observed when the agonist was reinjected 24 h later. The cardiovascular response to SP was not further inhibited by higher doses of RP 67580. Maximal  $\Delta$ MAP and  $\Delta$ HR induced by 25 pmol SP in the absence of RP 67580 were  $17.3 \pm 4.2$  mm Hg ( $n=8$ ) and  $93.7 \pm 13.8$  beats  $\text{min}^{-1}$  ( $n=8$ ) while in the presence of 65 nmol RP 67580, they were reduced to  $4.0 \pm 2.5$  mm Hg ( $n=5$ ) and  $40.9 \pm 10.3$  beats  $\text{min}^{-1}$  ( $n=5$ ), respectively. The residual responses to SP in the presence of 6.5 nmol (Tables 1 and 2) and 65 nmol RP 67580 were not statistically different from each other. In contrast, the NK<sub>1</sub> antagonist (6.5 nmol) was inactive against the central cardiovascular and behavioural effects induced by 25 pmol NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB (Tables 1 - 3).

At 6.5 nmol, SR 48968 significantly reduced by approximately 60% the central cardiovascular response and abolished the behavioural effects (but not wet dog shakes) induced by 25 pmol NKA. The inhibition was reversible 24 h later, yet SR 48968 had no effect on the responses to 25 pmol SP or [MePhe<sup>7</sup>]NKB (Tables 1 - 3). The i.c.v. injection of 65 nmol SR 48968 did not reduce further the cardiovascular effects evoked by NKA. Maximal  $\Delta$ MAP and  $\Delta$ HR induced by 25 pmol NKA in the absence of SR 48968 were  $13.4 \pm 3.6$  mm Hg ( $n=8$ ) and  $88.7 \pm 10.5$  beats  $\text{min}^{-1}$  ( $n=8$ ) while in the presence of 65 nmol SR 48968, they were reduced to  $3.1 \pm 2.0$  mm Hg ( $n=5$ ) and  $25.3 \pm 10.1$  beats  $\text{min}^{-1}$  ( $n=5$ ), respectively. The residual responses to NKA in the presence of 6.5 nmol (Tables 1 and 2) and 65 nmol SR 48968 were not statistically different from each other.

RP 67580 (6.5 nmol) and SR 48968 (6.5 nmol) were co-injected i.c.v. and tested against the agonists-mediated effects. This combination of antagonists completely abolished the increases in MAP and HR as well as the face washing, grooming and wet dog shakes induced by SP or NKA (25 pmol), yet this antagonist mixture did not affect the cardiovascular and behavioural responses to [MePhe<sup>7</sup>]NKB (Tables 1 - 3). The blockade of the SP and NKA mediated cardiovascular responses by RP 67580 plus SR

48968 was no longer observed when SP or NKA was re-administered alone 24h later (Figure 4).

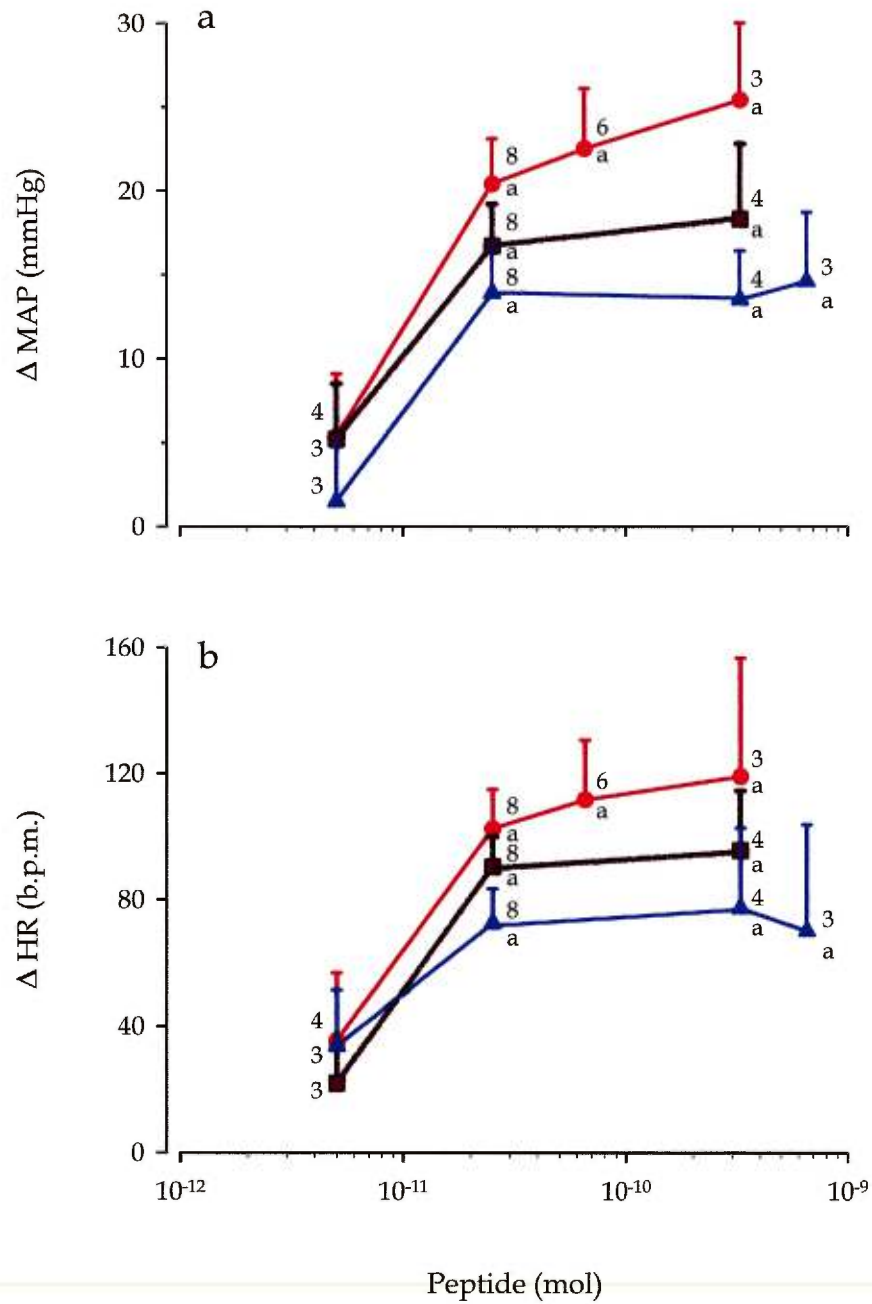
I.c.v. pretreatment with the selective NK<sub>3</sub> receptor antagonist, R 486 (6.5 nmol), inhibited the pressor and tachycardiac responses as well as wet dog shake induced by 25 pmol [MePhe<sup>7</sup>]NKB (Tables 1 - 3). The same pretreatment with R 486 failed, however, to alter both cardiovascular and behavioural responses induced either by SP or NKA (Tables 1 - 3). The cardiovascular effects of [MePhe<sup>7</sup>]NKB were entirely recovered 24 h after treatment with R 486 (Figure 4). There were no significant differences in MAP and HR basal values among the experimental groups (Tables 1 and 2). None of the tested antagonists or agonists showed any apparent toxic effects. Moreover, at 6.5 nmol, RP 67580 or SR 48968 had no significant effect on MAP or HR (Figure 5). On the other hand, the NK<sub>3</sub> antagonist, R 486 (6.5 nmol), caused a small transient increase of MAP and HR that lasted less than 5 min (Figure 5). Furthermore, the three antagonists had no direct effects on the individual behaviours namely face washing, grooming and wet dog shake (Table 4).



**Figure 1.** Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol substance P (SP), neurokinin A (NKA) and [MePhe<sup>7</sup>]NKB on three consecutive days in the conscious rats

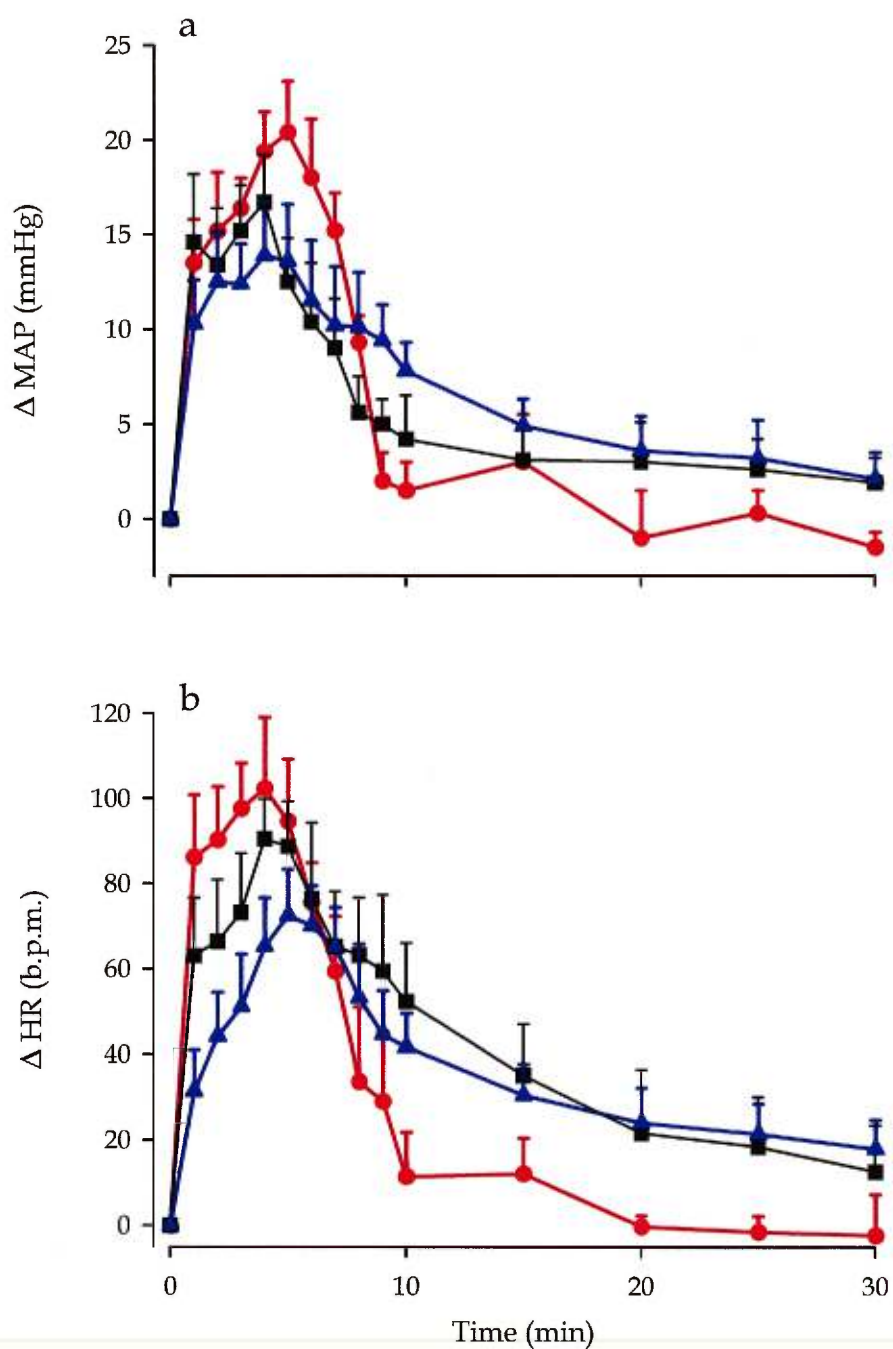
**Figure 1.** Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol substance P (SP), neurokinin A (NKA) and [MePhe<sup>7</sup>]NKB on three consecutive days in conscious rats. The agonist was injected i.c.v. on day 1 (red columns), day 2 (green columns) and day 3 (blue columns). The increases in (a) mean arterial blood pressure (MAP) and (b) heart rate (HR) represent maximal values at 3-5 min post-injection. Individual behaviours were measured for a period of 30 min (c, d and e). Each value represents the mean  $\pm$  s.e.mean of 8 rats for each agonist. There is no statistical difference between days 1, 2 and 3 for each agonist.



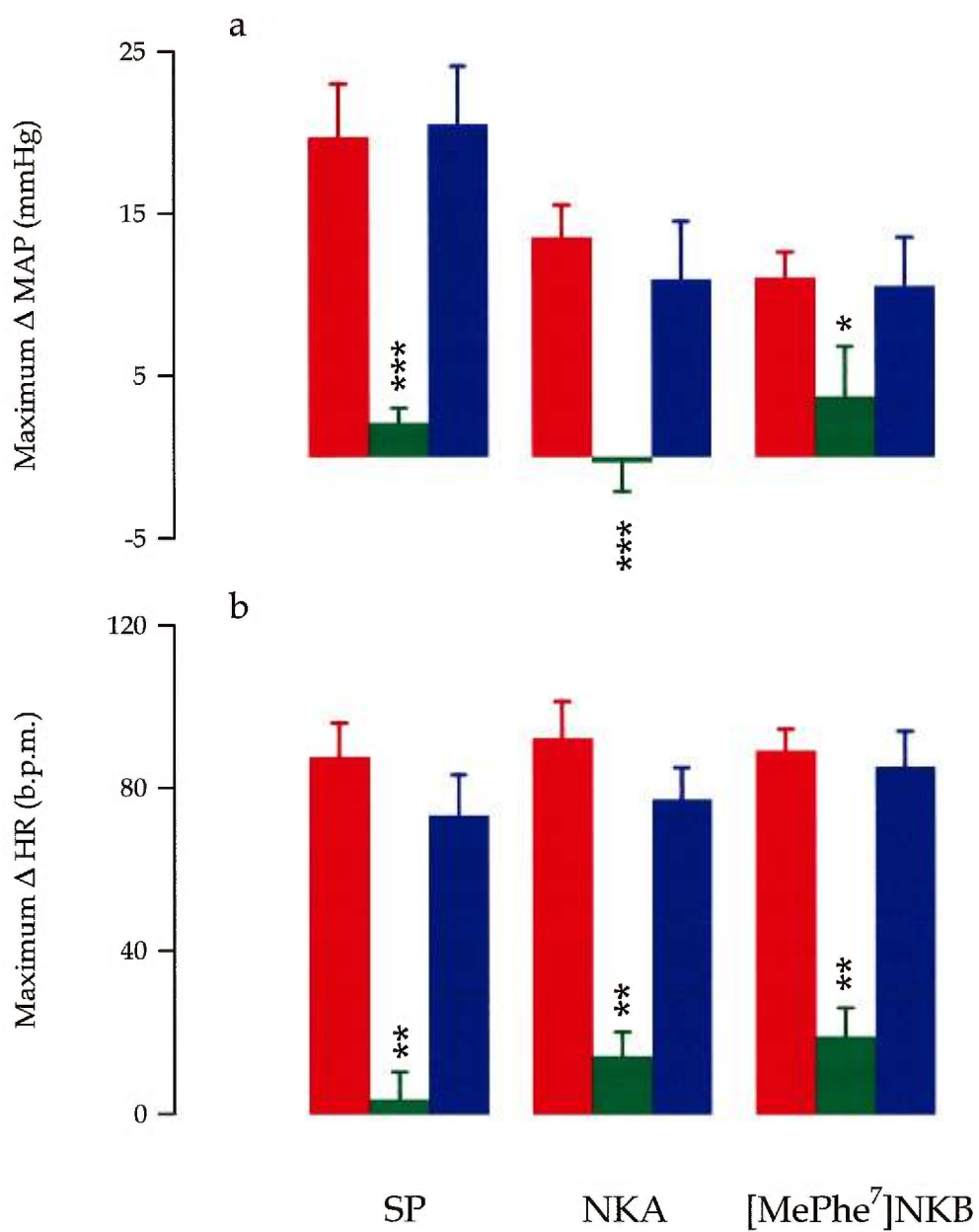


**Figure 2.** Effects of several doses of substance P (●), neurokinin A (■) and [MePhe<sup>7</sup>]NKB (▲) injected intracerebroventricularly in conscious rats

**Figure 2.** Effects of several doses of substance P, neurokinin A and [MePhe<sup>7</sup>]NKB injected intracerebroventricularly in conscious rats. Maximal increases in (a) mean arterial blood pressure (MAP) and in (b) heart rate (HR) measured at 3-5 min post-injection are shown. Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of several rats indicated by numbers. Statistically significant difference compared with CSF values ( $2.1 \pm 1.8$  mm Hg and  $15.1 \pm 7.4$  beats  $\text{min}^{-1}$ ) is indicated by <sup>a</sup> $p < 0.001$ .

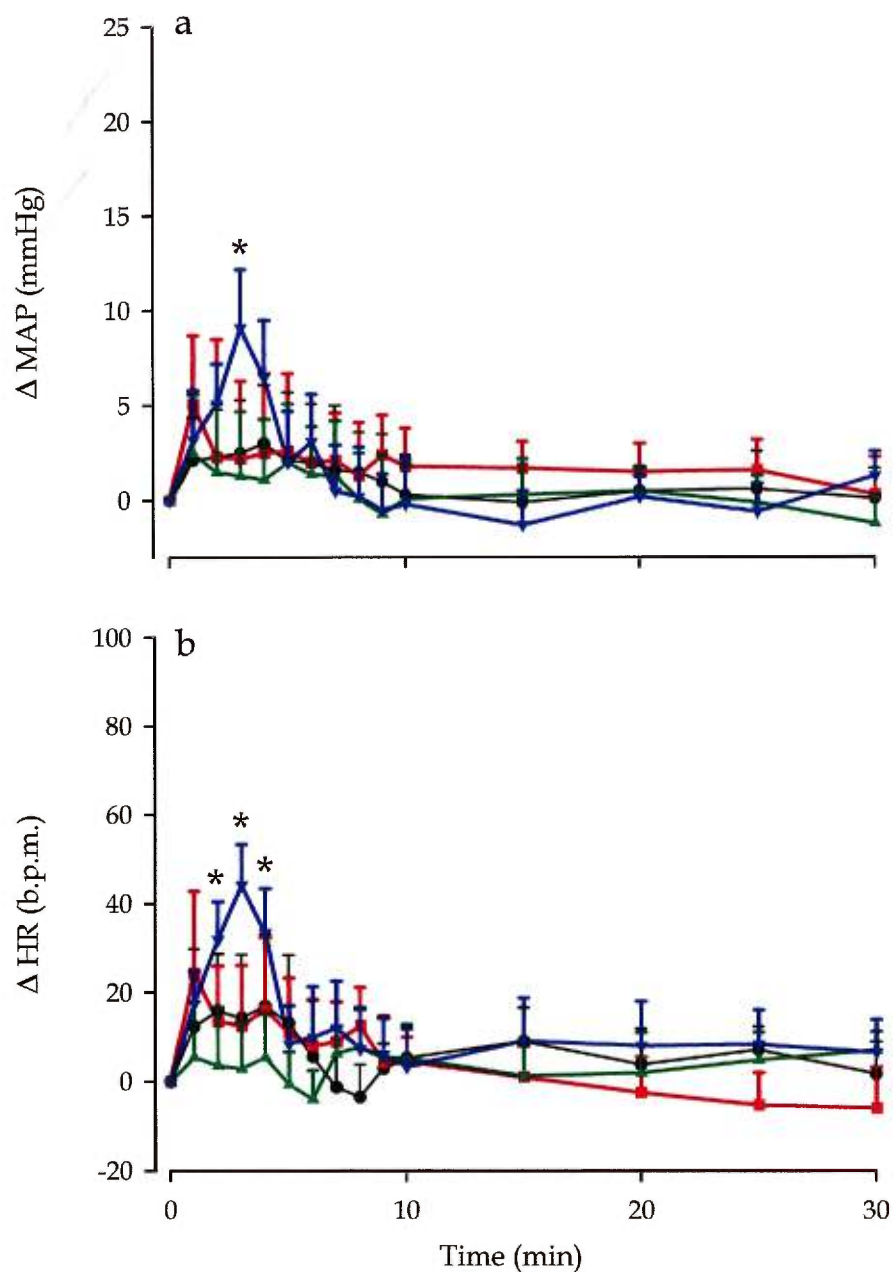


**Figure 3.** Time course of (a) mean arterial blood pressure (MAP), and (b) heart rate (HR) changes evoked by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P (●), neurokinin A (■) and [MePhe<sup>7</sup>]NKB (▲) in conscious rats. Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of 8 rats.



**Figure 4.** Effects of selective tachykinin receptor antagonists on maximal changes in (a) mean arterial blood pressure (MAP) and (b) heart rate (HR) induced by i.c.v. injection of 25 pmol of substance P (SP), neurokinin A (NKA) or [MePhe<sup>7</sup>]NKB in conscious rats.

**Figure 4.** Effects of selective tachykinin receptor antagonists on maximal changes in (a) mean arterial blood pressure (MAP) and (b) heart rate (HR) induced by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P (SP), neurokinin A (NKA) or [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B ([MePhe<sup>7</sup>]NKB) in conscious rats. The agonist was injected alone on day 1 (red columns), 5 min after the antagonist on day 2 (green columns) or alone on day 3 (blue columns). SP and NKA were tested in the presence of RP 67580 plus SR 48968 (6.5 nmol each) while [MePhe<sup>7</sup>]NKB was tested in the presence of 6.5 nmol R 486. Values represent the means  $\pm$  s.e.mean of 7-8 rats. Statistically significant difference compared to the agonist alone (red columns) is indicated by \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .



**Figure 5.** Direct effects of 6.5 nmol RP 67580 (●), 6.5 nmol SR 48968 (■), 6.5 nmol R 486 (▼) or CSF (▲) on (a) mean arterial blood pressure (MAP) and (b) heart rate (HR) after i.c.v. injection in conscious rats. Values represent the means  $\pm$  s.e. mean of 7-8 rats. Statistically significant differences compared to CSF values is indicated by \*  $P < 0.05$ .

**Table 1** Effects of selective tachykinin receptor antagonists on changes in mean arterial blood pressure (MAP) elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P (SP), neurokinin A (NKA) or [MePhe<sup>7</sup>]NKB in the conscious rat

Antagonist	Agonist	n	Baseline MAP	ΔMAP (mm Hg)					
				3	5	10	20	30	
—	CSF	10	97.6 ± 3.6	1.5 ± 0.6	1.0 ± 0.6	1.2 ± 0.7	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.5	
—	SP	10	109.3 ± 7.7	18.5 ± 4.0***	19.2 ± 2.9***	3.3 ± 2.0	1.5 ± 1.6	1.1 ± 1.3	
RP 67580	SP	10	103.2 ± 6.0	5.8 ± 2.6†	8.3 ± 4.0†	2.1 ± 3.5	1.7 ± 1.3	-0.5 ± 0.6	
—	NKA	6	98.5 ± 5.6	13.9 ± 3.1**	12.5 ± 2.4**	8.4 ± 1.3**	4.2 ± 1.3*	2.6 ± 0.9*	
RP 67580	NKA	6	105.6 ± 4.3	10.3 ± 2.5*	9.3 ± 2.9**	6.1 ± 2.1*	3.6 ± 1.9*	1.5 ± 1.8	
—	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	7	93.6 ± 6.7	10.2 ± 1.9**	7.3 ± 2.5*	4.3 ± 2.0*	4.6 ± 1.6*	3.2 ± 1.2*	
RP 67580	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	7	103.1 ± 7.2	12.1 ± 5.3**	11.9 ± 3.4**	8.2 ± 2.4**	3.6 ± 2.7*	1.9 ± 2.1	
—	SP	8	106.5 ± 6.1	18.0 ± 4.3***	20.5 ± 3.0***	3.1 ± 1.9	0.5 ± 0.4	-0.3 ± 1.1	
SR 48968	SP	8	105.2 ± 5.1	12.9 ± 3.2**	17.1 ± 1.9***	2.1 ± 2.2	-1.3 ± 1.6	-2.1 ± 1.9	
—	NKA	8	101.4 ± 4.1	12.5 ± 3.3**	12.6 ± 3.9**	9.0 ± 3.8*	3.9 ± 2.3*	2.2 ± 1.3	
SR 48968	NKA	8	97.1 ± 9.1	4.3 ± 1.8†	5.8 ± 2.5†	4.4 ± 3.1	2.5 ± 1.3*	2.4 ± 2.0	
—	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	8	99.1 ± 5.6	9.8 ± 3.0**	12.5 ± 1.7**	5.4 ± 2.8*	3.6 ± 2.0*	2.8 ± 0.6*	
SR 48968	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	8	102.5 ± 6.3	12.1 ± 4.1**	13.5 ± 2.9**	4.8 ± 1.9*	2.2 ± 1.4	2.5 ± 1.7	

Suite page suivante

Antagonist	Agonist	n	Baseline MAP	$\Delta$ MAP (mm Hg) Time (min) after agonist injection					
				3	5	10	20	30	
—	SP	7	94.8 ± 5.6	15.9 ± 2.4***	19.7 ± 3.3***	3.6 ± 1.8*	4.0 ± 1.9*	1.6 ± 0.7	
RP 67580 + SR 48968	SP	7	97.5 ± 4.3	1.4 ± 2.5††	2.1 ± 0.9†††	0.5 ± 1.9†	1.3 ± 0.4†	0.1 ± 0.9	
—	NKA	8	95.1 ± 3.8	13.5 ± 2.0**	10.9 ± 1.6**	8.5 ± 1.0**	3.2 ± 1.4*	2.8 ± 0.6*	
RP 67580 + SR 48968	NKA	8	100.8 ± 4.4	-0.3 ± 1.8†††	1.2 ± 1.3††	0.6 ± 0.8††	2.1 ± 0.5*	2.2 ± 0.8*	
—	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	5	97.6 ± 6.8	9.9 ± 3.6**	8.1 ± 2.4**	5.3 ± 2.1*	4.7 ± 2.2*	4.8 ± 1.8*	
RP 67580 + SR 48968	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	5	95.2 ± 4.5	8.5 ± 2.3**	5.3 ± 2.9*	4.1 ± 3.1	2.3 ± 1.9	1.6 ± 1.6	
—	SP	7	102.6 ± 5.1	16.5 ± 2.3***	20.3 ± 3.1***	2.9 ± 0.5*	0.2 ± 0.9	-1.1 ± 0.3	
R 486	SP	7	107.1 ± 6.3	17.5 ± 3.6***	18.9 ± 5.1***	6.0 ± 3.2*	1.5 ± 1.6	1.9 ± 1.0	
—	NKA	6	106.3 ± 5.3	13.2 ± 3.5**	11.0 ± 2.0**	6.1 ± 1.2*	2.1 ± 3.4	2.5 ± 1.6	
R 486	NKA	6	108.0 ± 9.1	13.5 ± 3.2**	12.0 ± 2.2**	3.9 ± 1.6*	1.6 ± 1.8	-0.2 ± 1.3	
—	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	8	100.7 ± 7.0	11.0 ± 1.6**	8.8 ± 1.5**	6.0 ± 1.5*	4.3 ± 3.9	3.0 ± 2.3	
R 486	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	8	98.3 ± 5.1	3.7 ± 3.1†	1.2 ± 2.6†	-0.3 ± 2.9†	-0.9 ± 2.6	0.7 ± 2.8	

Values represent the means ± s.e.mean of (*n*) rats. The antagonists were injected at the dose of 6.5 nmol, 5 min prior to the agonist. Statistical comparison to CSF (\*) or to the agonist in the absence of antagonist (†) was calculated with a two-way ANOVA; \* , †*p*<0.05; \*\* , ††*p*<0.01; \*\*\* , †††*p*<0.001.



**Table 2** Effects of selective tachykinin receptor antagonists on changes in heart rate (HR) elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P (SP), neurokinin A (NKA) or [MePhe<sup>7</sup>]NKB in the conscious rat

Antagonist	Agonist	n	Baseline HR	ΔHR (beats min <sup>-1</sup> )					
				3	5	10	20	30	
—	CSF	10	311.4 ± 19.5	7.3 ± 5.2	5.1 ± 9.3	8.2 ± 8.9	3.5 ± 6.1	4.8 ± 7.0	
—	SP	10	305.6 ± 15.6	98.1 ± 12.1 <sup>***</sup>	95.1 ± 9.4 <sup>***</sup>	17.3 ± 6.9	-2.0 ± 8.5	-5.4 ± 7.1	
RP 67580	SP	10	318.0 ± 21.3	43.1 ± 9.5 <sup>**†</sup>	41.2 ± 12.5 <sup>**†</sup>	10.3 ± 8.2	12.5 ± 9.0	0.8 ± 7.2	
—	NKA	6	293.1 ± 22.3	78.5 ± 9.3 <sup>***</sup>	89.1 ± 11.6 <sup>***</sup>	43.9 ± 8.3 <sup>**</sup>	28.1 ± 10.0 <sup>*</sup>	20.1 ± 5.2 <sup>*</sup>	
RP 67580	NKA	6	301.4 ± 17.6	82.5 ± 12.0 <sup>***</sup>	87.3 ± 9.4 <sup>***</sup>	50.1 ± 9.1 <sup>**</sup>	20.5 ± 5.2 <sup>*</sup>	12.3 ± 4.8	
—	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	7	306.8 ± 16.3	60.1 ± 7.3 <sup>**</sup>	76.2 ± 10.1 <sup>**</sup>	38.4 ± 7.8 <sup>**</sup>	29.3 ± 6.1 <sup>*</sup>	25.4 ± 3.8 <sup>*</sup>	
RP 67580	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	7	319.5 ± 18.2	55.4 ± 8.0 <sup>**</sup>	81.2 ± 6.3 <sup>***</sup>	40.3 ± 8.8 <sup>**</sup>	17.9 ± 7.3 <sup>*</sup>	25.1 ± 4.1 <sup>*</sup>	
—	SP	8	311.9 ± 17.1	103.2 ± 11.4 <sup>***</sup>	96.4 ± 10.3 <sup>***</sup>	25.1 ± 12.0	7.8 ± 9.5	-2.6 ± 5.7	
SR 48968	SP	8	298.1 ± 14.3	93.6 ± 8.6 <sup>***</sup>	79.5 ± 9.4 <sup>***</sup>	15.4 ± 7.1	-1.9 ± 7.2	-4.4 ± 6.0	
—	NKA	8	305.0 ± 16.8	65.3 ± 8.1 <sup>**</sup>	93.1 ± 10.5 <sup>***</sup>	51.1 ± 6.8 <sup>**</sup>	34.1 ± 7.4 <sup>**</sup>	12.5 ± 8.0	
SR 48968	NKA	8	303.8 ± 17.4	28.0 ± 9.3 <sup>†</sup>	36.3 ± 7.0 <sup>†</sup>	30.1 ± 4.2 <sup>†</sup>	28.1 ± 4.1 <sup>**</sup>	17.3 ± 6.3 <sup>*</sup>	
—	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	8	301.6 ± 18.3	63.1 ± 9.1 <sup>**</sup>	69.7 ± 7.8 <sup>**</sup>	51.3 ± 6.7 <sup>**</sup>	33.4 ± 9.0 <sup>**</sup>	10.1 ± 7.7	
SR 48968	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	8	289.1 ± 16.3	58.4 ± 7.5 <sup>**</sup>	59.2 ± 8.3 <sup>**</sup>	43.2 ± 5.4 <sup>**</sup>	27.1 ± 4.3 <sup>**</sup>	7.0 ± 8.1	

Suite page suivante

Antagonist	Agonist	n	Baseline HR	$\Delta$ HR (beats min <sup>-1</sup> ) after agonist injection					
				3	5	10	20	30	
-	SP	7	303.4 ± 22.1	87.5 ± 8.4***	80.6 ± 7.7***	12.3 ± 9.1	5.3 ± 3.8	-5.6 ± 6.1	
RP 67580 + SR 48968	SP	7	305.1 ± 23.7	3.5 ± 6.8††	5.3 ± 8.1††	-3.5 ± 6.7	-0.8 ± 4.7	-7.9 ± 5.6	
-	NKA	8	287.1 ± 16.2	80.3 ± 13.5***	92.1 ± 9.1***	60.3 ± 7.2**	31.4 ± 7.5**	12.3 ± 8.1	
RP 67580 + SR 48968	NKA	8	296.1 ± 18.5	10.3 ± 5.3††	14.1 ± 6.0††	3.6 ± 8.0††	7.3 ± 5.1†	4.3 ± 3.6	
-	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	5	294.1 ± 16.0	55.1 ± 12.3**	73.1 ± 9.9**	40.6 ± 8.3**	21.6 ± 8.0*	18.5 ± 6.3*	
RP 67580 + SR 48968	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	5	304.1 ± 14.2	48.3 ± 9.3**	64.1 ± 8.3**	34.2 ± 7.5**	18.3 ± 5.1*	7.3 ± 7.8	
-	SP	7	309.1 ± 17.8	95.3 ± 12.7***	98.3 ± 10.9***	23.4 ± 7.1*	8.6 ± 5.9	-5.8 ± 4.9	
R 486	SP	7	301.2 ± 17.5	93.4 ± 13.0***	98.1 ± 8.3***	17.3 ± 10.8	9.1 ± 6.1	7.6 ± 4.8	
-	NKA	6	297.0 ± 14.9	78.1 ± 9.6***	87.3 ± 10.7***	61.2 ± 8.5**	34.1 ± 7.9**	26.4 ± 5.8*	
R 486	NKA	6	299.3 ± 18.0	62.9 ± 10.8**	90.1 ± 9.3***	53.1 ± 8.0**	27.1 ± 5.6**	16.9 ± 8.1*	
-	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	8	316.2 ± 18.9	61.3 ± 9.7**	89.1 ± 5.3***	43.8 ± 5.7**	39.1 ± 7.3**	21.5 ± 6.0*	
R 486	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	8	320.1 ± 20.5	23.1 ± 8.2††	19.0 ± 7.0*††	14.7 ± 7.1†	12.1 ± 9.0†	8.3 ± 4.1†	

See footnote to Table 1.

**Table 3** Effects of selective tachykinin receptor antagonists on behavioural responses elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol substance P (SP), neurokinin A (NKA) or [MePhe<sup>7</sup>]NKB in the conscious rat

<i>Antagonist</i>	<i>Agonist</i>	<i>n</i>	<i>face washing</i>	<i>grooming</i>	<i>wet-dog shake</i>
—	CSF	10	1.3 ± 0.4	1.2 ± 0.8	2.0 ± 1.3
—	SP	10	17.2 ± 3.1**	9.3 ± 2.6*	5.6 ± 2.8
RP 67580	SP	10	5.3 ± 2.4*†	8.3 ± 3.0*	6.8 ± 3.7
—	NKA	6	9.2 ± 2.6*	6.6 ± 3.0*	4.0 ± 1.6
RP 67580	NKA	6	7.5 ± 2.7*	5.1 ± 1.2*	7.4 ± 2.4*
—	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	7	12.5 ± 3.6*	9.3 ± 3.6*	22.6 ± 7.1**
RP 67580	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	7	9.6 ± 3.7*	8.2 ± 3.4*	26.4 ± 8.3**
—	SP	8	10.7 ± 3.6*	8.5 ± 2.4*	5.1 ± 3.2
SR 48968	SP	8	12.5 ± 4.1*	8.1 ± 2.0*	5.9 ± 2.1
—	NKA	8	8.9 ± 2.9*	7.0 ± 1.5*	9.1 ± 4.3*
SR 48968	NKA	8	0.9 ± 0.2†	1.2 ± 1.0†	10.3 ± 2.9*
—	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	8	9.7 ± 2.1*	6.3 ± 1.2*	25.6 ± 5.4**
SR 48968	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	8	10.1 ± 2.5*	7.0 ± 2.5*	21.6 ± 7.2**
—	SP	7	15.7 ± 2.9**	10.3 ± 2.6*	8.0 ± 2.8*
RP 67580 + SR 48968	SP	7	2.0 ± 0.9††	3.2 ± 0.7†	4.1 ± 2.0†
—	NKA	8	13.2 ± 2.6*	7.0 ± 3.6*	5.1 ± 2.6
RP 67580 + SR 48968	NKA	8	1.3 ± 0.8††	2.9 ± 1.1†	2.6 ± 1.9
—	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	5	10.5 ± 1.9*	6.5 ± 1.6*	30.6 ± 7.1**
RP 67580 + SR 48968	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	5	7.8 ± 1.4*	5.8 ± 2.0*	28.5 ± 6.7**
—	SP	7	15.4 ± 3.2*	8.1 ± 1.2*	12.5 ± 5.1*
R 486	SP	7	17.3 ± 2.7*	7.2 ± 2.1*	10.3 ± 3.1*
—	NKA	6	9.3 ± 1.2*	7.3 ± 2.4*	8.5 ± 2.5*
R 486	NKA	6	7.3 ± 2.0*	6.0 ± 2.0*	9.1 ± 2.3*
—	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	8	5.2 ± 1.7*	5.3 ± 2.0*	22.8 ± 8.5**
R 486	[MePhe <sup>7</sup> ]NKB	8	4.4 ± 1.4*	3.4 ± 1.5	4.5 ± 1.5†

**Tableau 3.** Values represent the frequency of individual behaviour for 30 min and are indicated by the mean  $\pm$  s.e.mean of (*n*) rats. The antagonists were injected at a dose of 6.5 nmol, 5 min prior to the agonist. Statistical comparison to CSF (\*) was evaluated with a Wilcoxon-Mann-Whitney (U) test, while comparison to the agonist in the absence of antagonist (†) was calculated with a student's *t* test for paired samples; \*, †  $p < 0.05$ ; \*\*, ††  $p < 0.01$ .

**Table 4** Effects of selective tachykinin receptor antagonists on behavioural responses in the conscious rat

<i>Treatment</i>	<i>Dose</i> <i>nmol</i>	<i>face washing</i> score 30 min <sup>-1</sup>	<i>grooming</i> score 30 min <sup>-1</sup>	<i>wet-dog shake</i> episodes 30 min <sup>-1</sup>
CSF	—	1.5 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 1.0	1.9 $\pm$ 1.4
RP 67580	6.5	2.1 $\pm$ 1.1	2.5 $\pm$ 1.3	1.4 $\pm$ 0.8
SR 48968	6.5	2.3 $\pm$ 1.6	2.4 $\pm$ 1.5	2.9 $\pm$ 1.0
RP 67580 + SR 48968	6.5 each	2.6 $\pm$ 1.6	1.9 $\pm$ 1.2	2.0 $\pm$ 1.3
R 486	6.5	1.5 $\pm$ 0.7	1.7 $\pm$ 0.9	3.1 $\pm$ 1.8

Values represent the frequency of individual behaviour for 30 min and are indicated by the mean  $\pm$  s.e.mean of 8 rats in each group. No statistical difference was found when compared to CSF values.

## Discussion

The intracerebroventricular injection of SP, NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB elicited dose-dependent increases in mean arterial blood pressure and heart rate accompanied by specific behavioural manifestations in conscious rats. SP and NKA prevailing responses were grooming and face washing, while activation of the NK<sub>3</sub> receptor induced mainly wet dog shake behaviour. Even though it is difficult to associate these behaviours with physiological correlates, the SP/NKA behaviours are typical behaviours observed during the defence reaction (Unger et al., 1988; Itoi et al., 1991).

The hypothalamus may be the site of action of tachykinins, since microinjections of SP into the anterior and ventromedial parts of hypothalamus evoked cardiovascular changes similar to those produced by i.c.v. injection of SP or NKA (Itoi et al., 1991). Moreover, the magnocellular part of the rat hypothalamic paraventricular nucleus was identified as a site of action for the central effect of tachykinins (NK<sub>3</sub> agonists) on the release of vasopressin (Massi et al., 1991; Takano et al., 1993). However, it would be premature to reach any conclusions regarding the exact localisation of the tachykinin receptors activated by i.c.v. SP, NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB. Nonetheless, the fast onset of the response to i.c.v. tachykinin agonists leads one to suggest that receptor sites must be localised in the circumventricular organs or in adjacent periventricular structures. A peripheral site of action is unlikely since i.v. injections of SP, NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB cause decreases in blood pressure (Couture et al., 1989). Furthermore, the possibility of a spinal activation can also be excluded since intrathecal injection of 65 nmol [MePhe<sup>7</sup>]NKB produced no cardiovascular effect while 6.5 nmol of SP injected intrathecally was necessary to induce an increase of 10-15 mm Hg (Hasséssian et al., 1988).

---

Immunocytochemistry, *in situ* hybridization and radioimmunoassay studies have shown discrete and abundant distribution of SP, NKA and NKB (and their preprotachykinin mRNAs) in all major subdivisions of the rat brain (Warden & Young, 1988; Harlan et al., 1989; Marksteiner et al., 1992; Merchenthaler et al., 1992; Lucas et al., 1992). Whereas SP is found throughout the rat brain, NKB is distributed more to forebrain than to brainstem structures (Cuellar & Kanazawa, 1978; Lucas et al., 1992;

Merchenthaler et al., 1992). A high density and widespread distribution of SP and NKA was reported in the rat hypothalamus (Larsen et al., 1992). Also, the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus and the substantia nigra have higher contents of NKB-like immunoreactivity than any other CNS areas (Tateishi et al., 1989; Merchenthaler et al., 1992). Both the NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptors have been found in moderate to high density in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus (Dam et al., 1990a, b; Larsen et al., 1992; Maeno et al., 1993). However, the presence of NK<sub>2</sub> receptor binding sites in the rat brain remains controversial (Mantyh et al., 1989; Quirion et al., 1991; Takeda & Krause; 1991; Mussap et al., 1993).

Our results support our earlier finding that i.c.v. SP acts primarily through the activation of NK<sub>1</sub> receptors to induce cardiovascular and behavioural changes; this conclusion was reached on the basis of results obtained with CP 96345 (Tschöpe et al., 1992). These results needed to be confirmed with RP 67580, a novel NK<sub>1</sub> antagonist (Carruette et al., 1992; Rouissi et al., 1993) which does not have the non-specific action of CP 96345 on calcium and sodium channels (Schmidt et al., 1992; Guard et al., 1993; Caeser et al., 1993). In addition, the present study provides an explanation for the failure of CP 96345 (Tschöpe et al., 1992) or RP 67580 (even at high doses) to abolish the central effects of SP. The persisting residual cardiovascular and behavioural responses to SP measured after pretreatment with the NK<sub>1</sub> receptor antagonist (RP 67580) were blocked when RP 67580 was co-administered with the NK<sub>2</sub> receptor antagonist, SR 48968. These results suggest that SP can activate NK<sub>2</sub> receptors during NK<sub>1</sub> receptor blockade, unmasking the non-selectivity of the natural peptide SP. Since individual pretreatments with SR 48968 and R 486 failed to modify the central effects of SP, it appears that SP acts preferentially on the NK<sub>1</sub> receptor when the latter is functional.

---

The central NKA effects were very similar to those mediated by SP. However, NKA seems to activate mainly NK<sub>2</sub> receptors since only the NK<sub>2</sub> receptor antagonist SR 48968 reduced the biological effects of NKA, while the NK<sub>1</sub> (RP 67580) or NK<sub>3</sub> (R 486) receptor antagonists were inactive against NKA. These data confirm a previous study in which we concluded that the cardiovascular and behavioural effects of i.c.v. NKA are

mediated by a NK<sub>2</sub> receptor that was sensitive to R 396 (NK<sub>2</sub> selective antagonist) but not to CP 96345 (NK<sub>1</sub> selective antagonist) (Tschöpe et al., 1992). However, a higher dose of SR 48968 (65 nmol) was unable to block entirely the NKA-mediated responses, and as was the case with SP administration, the residual effects of NKA were completely abolished when SR 48968 was co-injected with the NK<sub>1</sub> selective antagonist RP 67580. These results can be interpreted in the same way as the SP-mediated responses, but in this case, NKA activates primarily NK<sub>2</sub> receptors. Under NK<sub>2</sub> receptor blockade, a non selective activation of NK<sub>1</sub> receptors has been revealed with NKA.

The most prominent behavioural response (wet dog shakes) evoked by i.c.v. [MePhe<sup>7</sup>]NKB injection is indicative of a different central neuronal pathway and confirms results obtained with senktide (NK<sub>3</sub> agonist), injected either subcutaneously or intracisternally (Stoessl et al., 1988) and i.c.v. (Itoi et al., 1992) in the rat. Senktide also induced pressor responses through vasopressin release when injected either i.c.v. or directly into the hypothalamic paraventricular nucleus of the anaesthetized rat (Takano et al., 1990; 1993). As expected, [MePhe<sup>7</sup>]NKB induced cardiovascular and wet dog shake responses were selectively blocked by the NK<sub>3</sub> receptor antagonist R 486 (Drapeau et al., 1990; Regoli et al., 1991) and were unaffected by RP 67580 or SR 48968 administered individually or in combination, thus assigning the NK<sub>3</sub> receptor as the sole functional tachykinin receptor site mediating [MePhe<sup>7</sup>]NKB responses. Hence, our study confirms the presence of functionally active supraspinal NK<sub>3</sub> sites involved in the central cardiovascular and behavioural effects of tachykinins.

The inhibitory effect of the three antagonists was reversible and not related to motor deficits or to changes of baseline parameters. No residual agonists activity was shown with i.c.v. injection of SR 48968 or RP 67580 which is consistent with *in vitro* studies (Advenier et al., 1992; Carruette et al., 1992). On the other hand, the NK<sub>3</sub> antagonist, R 486, exhibited a direct central stimulatory effect which might be due to a residual agonistic activity on both NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors (Regoli et al., 1991). Since R 486 blocked selectively the [MePhe<sup>7</sup>]NKB-induced effects, this antagonist appears suitable for investigating the functional role of central NK<sub>3</sub> receptors. A similar NK<sub>3</sub>

receptor antagonist R 487 ([Phe<sup>7</sup>, β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10), 6.5 nmol) was also found to block the central cardiovascular and behavioural effects of [MePhe<sup>7</sup>]NKB in a selective and reversible manner (Picard et al., 1992).

In summary, selective and potent antagonists of NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors have been used to characterize the receptor subtypes which are responsible for the central cardiovascular and behavioural effects of SP, NKA and [MePhe<sup>7</sup>]NKB. SP activates mainly NK<sub>1</sub> but also NK<sub>2</sub> receptors whereas NKA-mediated effects are secondary to NK<sub>2</sub> and to a lesser extent NK<sub>1</sub> receptor activation. The interactions of SP and NKA with the NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors were seen at doses as low as 25 pmol. The central effects of [MePhe<sup>7</sup>]NKB are mediated by specific tachykinin receptors which are not identical with those activated by SP or by NKA and which belong to NK<sub>3</sub> receptor subclass. Hence, our data provide pharmacological evidence for the existence of distinct populations of functionally active NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors in the adult rat brain.

### Acknowledgments

We are grateful to Dr J.-C. Brelière from Sanofi Research, Montpellier, France who generously provided SR 48968 and to Dr C. Garret, Rhône-Poulenc Rorer, Paris, France for the generous gift of RP 67580. This study was supported by the Kidney Foundation of Canada and a grant in aid (MT-8925) from the Medical Research Council of Canada (MRCC) to R.C. R.C. is a senior Scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec, D.R. is a career investigator of the MRCC, and P.P. holds studentships from The Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR).



## References

- Advenier, C., Rouissi, N., Nguyen, Q.T., Emonds-Alt, X., Brelière, J.-C., Neliat, G., Naline, E. et Regoli, D., Neurokinin A (NK<sub>2</sub>) receptor revisited with SR 48968, a potent non-peptide antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184: 1418-1424, 1992.
- Caeser, M., Seabrook, G.R. et Kemp, J.A., Block of voltage-dependent sodium currents by the substance P receptor antagonist (±)-CP-96,345 in neurones cultured from rat cortex. *Br. J. Pharmacol.*, 109: 918-924, 1993.
- Carruette, A., Moussaoui, S.M., Champion, A., Cottez, D., Goniot, P. et Garret, C., Comparison in different tissue preparations of the in vitro pharmacological profile of RP 67580, a new non-peptide substance P antagonist. *Neuropeptides*, 23: 245-250, 1992.
- Couture, R., Laneuville, O., Guimond, C., Drapeau, G. et Regoli, D., Characterization of the peripheral action of neurokinins and neurokinin receptor selective agonists on the rat cardiovascular system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 340: 547-557, 1989.
- Couture, R., Boucher, S., Picard, P. et Regoli, D., Receptor characterization of the spinal action of neurokinins in nociception: a three receptor hypothesis. *Regul. Peptides*, 46: 426-429, 1993.
- Cuello, A.C. et Kanazawa, I., The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 178: 129-156, 1978.
- Dam, T.V., Martinelli, B. et Quirion, R., Autoradiographic distribution of brain neurokinin-1/substance P receptors using a highly selective ligand [<sup>3</sup>H]-[Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-substance P. *Brain Res.*, 531, 333-337, 1990a.
- Dam, T.V., Escher, E. et Quirion, R., Visualization of neurokinin-3 receptor sites in rat brain using the highly selective ligand [<sup>3</sup>H] senktide. *Brain Res.*, 506: 175-179, 1990b.
- Drapeau, G., Rouissi, N., Nantel, F., Rhaleb, N.-E., Tousignant, C. et Regoli, D., Antagonists for the neurokinin NK-3 receptor evaluated in selective receptor systems. *Regul. Peptides*, 31: 125-135, 1990.
- Emonds-Alt, X., Vilain, P., Goulaouic, P., Proietto, V., Van Broeck, D., Advenier, C., Naline, E., Neliat, G., Le Fur, G. et Brelière, J.C., A potent and selective non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK<sub>2</sub>) receptor. *Life Sci.*, 50: PL101-PL106 1992.
- Garret, C., Carruette, A., Fardin, V., Moussaoui, S., Peyronel, J.-F., Blanchard, J.-C. et Laduron, P.-M., RP 67580, a potent and selective non-peptide substance P antagonist. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 314, Série III: 199-204, 1992.
- Gispen, W.H., Wiegant, V.M., Greven, H.M. et De Wied, D., The induction of excessive grooming in the rat by intraventricular application of peptides derived from ACTH: structure-activity studies. *Life Sci.*, 17: 645-652, 1975.

Guard, S. et Watson, S.P., Tachykinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. *Neurochem. Int.*, 18: 149-165, 1991.

Guard, S., Boyle, S.J., Tang, K.-W., Watling, K.J., McKnight, A.T. et Woodruff, G.N., The interaction of the NK<sub>1</sub> receptor antagonist CP-96,345 with L-type calcium channels and its functional consequences. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 385-391, 1993.

Harlan, R.E., Garcia, M.M. et Krause, J.E., Cellular localization of substance P - and neurokinin A - encoding preprotachykinin mRNA in the female rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 287: 179-212, 1989.

Hasséssian, H., Drapeau, G. et Couture, R., Spinal action of neurokinins producing cardiovascular responses in the conscious freely moving rat: evidence for a NK-1 receptor mechanism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 338: 649-654, 1988.

Itoi, K., Jost, N., Badoer, E., Tschöpe, C., Culman, J. et Unger, Th., Localisation of the substance P-induced cardiovascular responses in the rat hypothalamus. *Brain Res.*, 558: 123-126, 1991.

Itoi, K., Tschöpe, C., Jost, N., Culman, J., Lebrun, C., Stauss, B. et Unger, Th., Identification of the central tachykinin receptor subclass involved in substance P-induced cardiovascular and behavioral responses in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 219: 435-444, 1992.

Larsen, P.J., Jessop, D.S., Chowdrey, H.S., Mikkelsen, J.D. et Lightman, S.L., Osmotic regulation of substance P and neurokinin A peptide content and substance P binding sites in distinct hypothalamic nuclei of the rat. *Peptides*, 13: 705-712, 1992.

Lucas, L.R., Hurley, D.L., Krause, J.E. et Harlan, R.E., Localization of the tachykinin neurokinin B precursor peptide in rat brain by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Neuroscience*, 51: 317-345, 1992.

Maeno, H., Kiyama, K. et Tokyama, M., Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. *Molec. Brain Res.*, 18: 43-58, 1993.

Maggi, C.A., Patacchini, R., Rovero, P. et Giachetti, A., Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists, *J. Auton. Pharmacol.*, 13: 23-93, 1993a.

Maggi, C.A., Patacchini, R., Giuliani, S. et Giachetti, A., In vivo and in vitro pharmacology of SR 48,968, a non-peptide tachykinin NK<sub>2</sub> receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, 234: 83-90, 1993b.

Mantyh, P.W., Gates, T., Mantyh, C.R. et Maggio, J.E., Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. *J. Neurosci.*, 9: 258-279, 1989.

Marksteiner, J., Sperk, G. et Krause, J.E., Distribution of neurons expressing neurokinin B in the rat brain: immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.*, 317: 341-356, 1992.

Massi, M., Saija, A., Polidori, C., Perfumi, M., Gentili, L., Costa, G. et De Caro G., The hypothalamic paraventricular nucleus is a site of action for the central effect of tachykinins on plasma vasopressin. *Brain Res. Bull.*, 26: 149-154, 1991.

Merchenthaler, I., Maderdrut, J.L., O'Harte, F. et Conlon, J.M., Localization of neurokinin B in the central nervous system of the rat. *Peptides*, 13: 815-829, 1992.

Mussap, C.J., Geraghty, D.P. et Burcher, E., Tachykinin receptors: A radioligand binding perspective. *J. Neurochem.*, 60: 1987-2009, 1993.

Otsuka, M. et Yoshioka, K., Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.*, 73: 229-308, 1993.

Picard, P., Regoli, D. et Couture, R., Use of selective antagonists to dissociate the central cardiovascular and behavioral effects of neurokinins on NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors in the rat. 22nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Anaheim, California, Vol. 18, Part 1: Abstract 194.15, p. 454, 1992.

Picard, P., Boucher, S., Regoli, D., Gitter, B.D., Howbert, J.J. et Couture, R., Use of non-peptide tachykinin receptor antagonists to substantiate the involvement of NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors in a spinal nociceptive reflex in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 232: 255-261, 1993.

Polidori, C., Saija, A., Perfumi, M., Costa, G., De Caro, G. et Massi, M., Vasopressin release induced by intracranial injection of tachykinins is due to activation of central neurokinin-3 receptors. *Neurosci. Lett.*, 103: 320-325, 1989.

Quirion, R., Dam, T.V. et Guard, S., Selective neurokinin receptor radioligands. dans : Substance P and related peptides: Cellular and molecular physiology, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 632: 137-144, 1991.

Regoli, D., Nantel, F., Tousignant, C., Jukic, D., Rouissi, N., Rhaleb, N.-E., Télémaque, S., Drapeau, G. et D'Orléans-Juste, P., Neurokinin agonists and antagonists. *Ann. NY Acad. Sci.*, 623: 170-183, 1991.

Rouissi, N., Claing, A., Nicolau, M., Jukic, D., D'Orléans-Juste, P. et Regoli, D., Substance P (NK-1 receptor) antagonists: in vivo and in vitro activities in rats and guinea pigs. *Life Sci.*, 52: 1141-1147, 1993.

Schmidt, A.W., McLean, S. et Heym, J., The substance P receptor antagonist CP-96,345 interacts with Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur. J. Pharmacol.*, 215: 351-352, 1992.

Stables, J.M., Arkinstall, S., Beresford, I.J.M., Seale, P., Ward, P. et Hagan, R.M., A novel peptidic tachykinin antagonist which is potent at NK<sub>3</sub> receptors. *Neuropeptides*, 24: 232 Abstract C22, 1993.

Stoessl, A.J., Dourish, C.T. et Iversen, S.D., The NK-3 tachykinin receptor agonist senktide elicits 5-HT-mediated behaviour following central or peripheral administration in mice and rats. *Br. J. Pharmacol.*, 94: 285-287, 1988.

Takano, Y., Nagashima, A., Hagio, T., Tateishi, K. et Kamiya, H.O., Role of central tachykinin peptides in cardiovascular regulation in rats. *Brain Res.*, 528: 231-237 1990.

Takano, Y., Nakayama, Y., Matsumoto, T., Saito, R. et Kamiya, H.-O., The mechanism of central pressor actions of tachykinin NK-3 receptor in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Regul. Peptides*, 46: 360-363, 1993.

Takeda, Y. et Krause, J.E., Pharmacological and molecular studies on the diversity of rat tachykinin NK-2 receptor subtypes in rat CNS, duodenum, vas deferens, and urinary bladder. *Ann. NY Acad. Sci.*, 632: 479-482, 1991.

Tateishi, K., Matsuoka, Y., et Hamaoka, T., Establishment of highly specific radioimmunoassays for neurokinin A and neurokinin B and determination of tissue distribution of these peptides in rat central nervous system. *Regul. Pept.* 24: 245-257, 1989.

Thunhorst, R.L. et Johnson, A.K., Effects of arterial pressure on drinking and urinary responses to intracerebroventricular angiotensin II. *Am. J. Physiol.* 264: R211-R217, 1993.

Tschöpe, C., Picard, P., Culman, J., Prat, A., Itoi, K., Regoli, D., Unger, Th. et Couture, R., Use of selective antagonists to dissociate the central cardiovascular and behavioural effects of tachykinins on NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 750-755, 1992.

Unger, Th., Rascher, W., Schuster, C., Pavlovitch, R., Schömig, A., Dietz, R. et Ganten, D., Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II: role of the sympathetic nervous system and vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.*, 71: 33-42, 1981.

Unger, Th., Carolus, S., Demmert, G., Ganten, D., Lang, R.E., Maser-Gluth, C., Steinberg, H. et Veelken, R., Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ. Res.*, 63: 812-820, 1988.

Warden, M.K. et Young, W.S. III, Distribution of cells containing mRNAs encoding substance P and neurokinin B in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 272: 90-113, 1988.

## CHAPITRE 4

# *E*FFETS INTRACEREBROVENTRICULAIRES DU NEUROPEPTIDE GAMMA CHEZ LE RAT CONSCIENT; CARACTERISATION DES RECEPTEURS IMPLIQUES A L'AIDE D'ANTAGONISTES SELECTIFS

---

*"Chercher n'est pas une chose et trouver une autre, mais le gain de la recherche, c'est la recherche même."*

St-Grégoire de Nysse, 335-394 (Homélie sur l'Ecclésiaste)

## Avant-propos au quatrième chapitre

En plus de confirmer la présence fonctionnelle des récepteurs NK-1 et NK-2 dans le SNC du rat, l'étude précédente nous a apporté des évidences concernant la présence fonctionnelle du récepteur NK-3 dans le SNC du rat. Par surcroît, cette étude démontre que nous avons en notre possession tous les outils pharmacologiques nécessaires pour étudier les récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3 centraux dans notre modèle expérimental.

L'administration i.c.v. du NPY chez le rat anesthésié à l'uréthane provoquait des augmentations de pression artérielle et de fréquence cardiaque qui étaient bloquées par le pentolinium sans être affectées par un antagoniste de la vasopressine (Hagio et coll., 1991). La phentolamine bloquait aussi les réponses pressives du NPY, indiquant que les réponses hémodynamiques suivant l'administration i.c.v. de ce peptide sont secondaires à une activation du système nerveux sympathique. La pharmacologie centrale du NPY demeure toutefois inconnue et pourrait relever d'une activation des récepteurs NK-1 et/ou NK-2 en plus d'activer un tierce récepteur à haute affinité pour le NPY. En effet, Takeda et Krause (1991) ont déjà proposé l'existence d'un récepteur sélectif pour les formes allongées de la NKA, tel le NPY. Cette hypothèse demande toutefois à être confirmée par des approches de biologie moléculaire.

Avec l'utilisation d'antagonistes sélectifs pour les récepteurs NK-1 (RP-67,580), NK-2 (SR-48,968) et NK-3 (R-820) et avec une approche de désensibilisation aux récepteurs NK-1 et NK-2, nous avons tenté d'éclaircir cette question. A l'image des études précédentes, le rat éveillé sera utilisé comme modèle expérimental dans ce chapitre pour d'une part, éviter les effets secondaires de l'anesthésie générale et d'autre part, pour mesurer simultanément les réponses cardiovasculaires et comportementales suivant l'administration centrale du peptide.

## Contribution personnelle à cet article

Tous les résultats de cette étude sont issus de mon travail. Avec les conseils et les corrections indispensables du Dr. Couture, j'ai rédigé et corrigé ce manuscrit.

---

*INTRACEREBROVENTRICULAR RESPONSES TO NEUROPEPTIDE  
GAMMA IN THE CONSCIOUS RAT: CHARACTERIZATION OF ITS  
RECEPTOR WITH SELECTIVE ANTAGONISTS*

---

Pierre Picard et Réjean Couture

Département de physiologie, Faculté de médecine, Université de Montréal,  
Groupe de recherche sur le système nerveux autonome, Montréal, Québec,  
Canada

---

Br. J. Pharmacol., (1996) 117, 241-249.

## Summary

1. The cardiovascular and behavioural effects elicited by the intracerebroventricular (i.c.v.) administration of neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) in the conscious rat were assessed before and 5 min after i.c.v. pretreatment with antagonists selective for NK<sub>1</sub> (RP 67,580), NK<sub>2</sub> (SR 48,968) and NK<sub>3</sub> (R 820) receptors. In addition, the central effects of NP $\gamma$  before and after desensitization of the NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors with high doses of substance P (SP) and neurokinin A (NKA) were compared.
  2. Intracerebroventricular injection of NP $\gamma$  (10-780 pmol) evoked dose- and time-dependent increases in mean arterial blood pressure (MAP), heart rate (HR), face washing, head scratching, grooming and wet dog shake behaviours. Similar injection of vehicle or 1 pmol NP $\gamma$  had no significant effect on those parameters.
  3. The cardiovascular and behavioural responses elicited by NP $\gamma$  (25 pmol) were significantly and dose-dependently reduced by pretreatment with 650 pmol and 6,5 nmol of SR 48,968. No inhibition of NP $\gamma$  responses was observed when 6,5 nmol of RP 67,580 was used in a similar study. Moreover, the prior co-administration of SR 48,968 (6,5 nmol) and RP 67,580 (6,5 nmol) with or without R 820 (6,5 nmol) did not reduce further the central effects of NP $\gamma$  and significant residual responses (30 - 50 %) remained.
  4. No tachyphylaxis to NP $\gamma$ -induced cardiovascular and behavioural changes was observed when two consecutive injections of 25 pmol NP $\gamma$  were given 24 h apart.
-



5. Simultaneous NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptor desensitization reduced significantly central effects mediated by 25 pmol NP $\gamma$ . However, significant residual responses persisted as seen after pretreatment with SR 48,968.
6. The results suggest that the central effects of NP $\gamma$  are mediated partly by NK<sub>2</sub> receptors and by another putative tachykinin receptor subtype (NP $\gamma$  receptor ?) which appears to be different from NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptors.

Keywords: tachykinin antagonists, neuropeptide gamma, cardiovascular responses, behaviours, SR 48,968, RP 67,580, R 820

## Introduction

Substance P (SP), neurokinin A (NKA), neurokinin B (NKB) and N-terminally extended forms of NKA, neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) and neuropeptide K (NPK) belong to the mammalian members of the tachykinin family of peptides. These biologically active peptides exert their actions through the activation of three receptors termed neurokinin-1 (NK<sub>1</sub>), NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> (Guard et Watson, 1991; Regoli et al., 1994). Despite they are not highly selective agonists, SP, NKA and NKB are believed to be the endogenous ligands for the NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors, respectively (Regoli et al., 1987). It is unclear whether the multiple NKA related peptides, including NPK and NP $\gamma$  interact with a single class of binding sites (NK<sub>2</sub>) or whether they differentially interact with other undiscovered tachykinin receptor subtypes (Takeda et Krause, 1991). NPK is a 36 amino acid peptide originally isolated from porcine brain extracts (Tatemoto et al., 1985) and thought to be a precursor of NKA (Deacon et al., 1987). NPK is the most potent biologically active endogenous tachykinin whose effects appear to be mediated by NK<sub>2</sub> receptors *in vitro* Beaujouan et al., 1988; van Giersbergen et al., 1992) or by NK<sub>1</sub> receptors *in vivo* (Takeda et Krause, 1989; Décarie et Couture, 1992; Pham et Couture, 1993; Prat et al., 1994).

NP $\gamma$ , a 21 amino acid peptide isolated from rabbit intestine extracts by Kage et al. (1988) is encoded by only one of the four mRNAs generated from the primary transcript of the preprotachykinin (PPT) A gene, called  $\gamma$ -PPT.  $\gamma$ -PPT also codes for SP and NKA and comprises over 75% of all four alternate PPT-A splice variants ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -PPT) expressed in all tissues of the rat (Carter et Krause, 1990). Moreover,  $\beta$ -PPT and  $\gamma$ -PPT together have been estimated to represent over 99% of all mRNA generated from PPT-A in rats and humans (Carter et Krause, 1990; Helke et al., 1990; Marchand et al., 1993). Even though physiological roles for NP $\gamma$  are still poorly defined, this last discovered mammalian tachykinin member merits further investigation since it is relatively abundant in various rat tissues: brain ( $7.54 \pm 0.50$  pmol / g tissue), duodenum ( $9.81 \pm 1.33$  pmol / g tissue) and jejunum ( $7.48 \pm 0.28$  pmol / g tissue) (Takeda et al., 1990). In all rat tissues, the relative abundance of NKA-related peptides are NKA >NP $\gamma$  = NPK > NKA(3-10) (Takeda et al., 1990).

NP $\gamma$  is a preferential NK<sub>2</sub> receptor agonist but like the other endogenous tachykinins, it is poorly selective and can also stimulate the NK<sub>1</sub> receptor (Helke et al., 1990). In the hamster urinary bladder, the pharmacological profile of NP $\gamma$  was similar to that of NKA and NPK on NK<sub>2</sub> receptor binding, stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis and smooth muscle contraction (van Giersbergen et al., 1992). Moreover, NP $\gamma$  was the most potent tachykinin to contract the human isolated bronchus (Burcher et al., 1991). Since the response curve to NP $\gamma$  was not affected by the NK<sub>2</sub> antagonist MDL 29,913 at 2  $\mu$ M, the authors suggested that NP $\gamma$  acts via a "non-classical" NK<sub>2</sub> receptor. More recently, the contractile effect of NP $\gamma$  on the human isolated bronchus was characterized with the NK<sub>2</sub> selective antagonist SR 48,968 (Advenier et al., 1992), as an NK<sub>2A</sub> receptor subtype (Qian et al., 1994). When administered intravenously (i.v.) in the guinea-pig, NP $\gamma$  increased total lung resistance and decreased markedly dynamic lung compliance (Yuan et al., 1994). These effects on lung functions were weakly inhibited by MDL 29,913 (10  $\mu$ mol kg<sup>-1</sup> i.v.) but markedly by SR 48,968 (100 nmol kg<sup>-1</sup> i.v.), while unaffected by a selective NK<sub>1</sub> antagonist, CP 96,345 (200 nmol kg<sup>-1</sup> i.v.). It was therefore concluded that NP $\gamma$  exerts its effects solely via NK<sub>2</sub> receptor activation in this model. On the other hand, when administered intrathecally (T-9 level) in the

conscious rat, NP $\gamma$  (78 pmol - 78 nmol) induced dose-dependent increases in heart rate and mean arterial blood pressure; these effects were blocked by RP 67,580 (selective NK<sub>1</sub> receptor antagonist), but not by SR 48,968 nor R 486 (selective NK<sub>3</sub> antagonist) (Poulat et al., accompanying paper).

In the urethane anaesthetized rat, NP $\gamma$  (i.c.v.; 0.5 nmol) induced increases in blood pressure and heart rate whose effects were blocked by pentolinium but not by a vasopressin antagonist (Hagio et al., 1991). Phentolamine also blocked the pressor response induced by NP $\gamma$ . These results indicate that hemodynamic responses occurring following central administration of NP $\gamma$  are secondary the activation of the sympathetic nervous system. It remains, however, unknown whether the central actions of NP $\gamma$  are mediated by NK<sub>2</sub>, NK<sub>1</sub> or both receptors or via a novel yet undiscovered tachykinin receptor subtype showing high affinity for NP $\gamma$ . With the use of selective NK<sub>1</sub> (RP 67,580), NK<sub>2</sub> (SR 48,968) and NK<sub>3</sub> (R 820) receptor antagonists and a protocol of desensitization for NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors, the present study addresses this issue. These experiments are performed in the conscious freely moving rat to avoid the deleterious effect of general anaesthesia and to assess simultaneously both the cardiovascular and behavioural changes elicited by central injection of NP $\gamma$ .

## Methods

### *Animal preparation*

The animals were cared for in accordance with the principles and guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the CDEA of the Université de Montréal. Male Wistar rats weighing 300-350 g were purchased from Charles River (St. Constant, Québec, Canada). The animals were kept in a room at 20-25°C in individual plastic cages (40 cm × 23 cm × 20 cm) and were submitted to a 12 h light/dark cycle (lights on 6 h 00 min - 18 h 00 min) with free access to commercial food and tap water.

Rats were temporarily anaesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of sodium pentobarbitone 65 mg kg<sup>-1</sup> (Somnotol ; M.T.C. Pharmaceuticals, Cambridge,

Ontario, Canada) to allow instrumentation of a polyethylene i.c.v. cannula (PE-20; Intramedic, Clay Adams, NJ, U.S.A.). The i.c.v. catheter was inserted with a guide cannula into the right lateral brain ventricle by use of a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, U.S.A.). The angle of the cranium was corrected to fit the lateral horizontal plan and adjusted in the rostro-caudal horizontal plan with respect to bregma and lambda reference points. The cannula was then positioned at the following stereotaxic coordinates: 1.3 mm lateral to the midline, 0.6 mm caudal to the bregma and 5.0 mm vertical from the skull surface. Thereafter, the catheter was permanently fixed to the skull with cyanoacrylate glue (Krazy Glue, Longueuil, Québec) and dental cement (Reliance Dental MFG. Co., Worth, IL, U.S.A.).

The animals were returned to their resident plastic cages for a recovery period of 72 h. After this period, rats were briefly reanaesthetized and instrumented with a second cannula (PE-50) implanted into the left femoral artery all the way to the abdominal aorta for the measurement of blood pressure and heart rate (HR). The intraarterial catheter was pre-siliconized to avoid long term blood clotting, filled with physiological saline containing heparin sodium salt ( $100 \text{ i.u. ml}^{-1}$ ) and passed through a subcutaneous underpass to emerge at the back of the neck at about 1 cm caudal to the i.c.v cannula. Experiments were conducted 48 h after the intravascular surgery in conscious, unrestrained rats kept in their resident plastic cages with the top grid removed.

#### *Measurement of cardiovascular and behavioural responses*

The arterial blood pressure was monitored through the intraarterial catheter with a Statham pressure transducer (P231D) while the HR was measured with a cardiac tachometer (model 7P4) and both variables were registered on a Grass polygraph model 79D (Grass Instruments Co., Quincy, MA, U.S.A.). Experiments were performed during the day and started when the animal reached a resting state and stable basal mean arterial blood pressure (MAP) and HR.

The behavioural activity of the rat was assessed for over a 30 min period starting immediately after i.c.v. injection. The frequency of individual behaviours: face washing (FW), head scratching (HS) and grooming (G) was determined according to the 15 s sampling procedure of Gispen et al. (1975). During every consecutive period of 15 s, a score of 1 or 0 was given systematically depending on whether the animal showed the specific type of behaviour or not, whatever its frequency, intensity or span during that interval. Summation of scores for 30 min following the i.c.v. injection gave the behavioural score for face washing, head scratching and grooming in each experiment. The maximal theoretical score was 120 (15 s intervals  $\times$  30 min). The wet dog shake behaviour was measured according to the number of episodes (less than 1 s each) during the 30 min period, whatever the intensity. Rats were injected i.c.v. with 25 pmol angiotensin II to verify the potency of the i.c.v. cannula. Only those animals which responded with an immediate sharp rise in blood pressure, associated with an intense dipsogenic activity as reported earlier (Kirby et al., 1992), were included in the study. The correct position of the i.c.v. cannula was also verified histologically by post-mortem dissection. The rate of successful implantation was close to 95%.

#### *Experimental protocols*

In the first series of experiments, the animals ( $n = 7$  to  $9$  per group) received i.c.v. injection of increasing doses of NP $\gamma$  (1 pmol, 10 pmol, 25 pmol, 78 pmol, 780 pmol) diluted in a volume of 1  $\mu$ l and flushed with 4  $\mu$ l of cerebrospinal fluid (CSF; composition in mM: NaCl 128.6, KCl 2.6, MgCl<sub>2</sub> 2.0 and CaCl<sub>2</sub> 1.4; pH adjusted to 7.2). The injection period lasted about 30 s and was immediately followed by cardiovascular and behavioural measurements for 30 min. Each dose was administered at intervals of 48 h to avoid tachyphylaxis (Itoi et al., 1992; Picard et al., 1994). An additional group ( $n = 22$ ) of control rats received 5  $\mu$ l CSF only. This dose-response curve to NP $\gamma$  was performed to better estimate its potency and to select the dose in the protocol using the selective tachykinin antagonists.

A second series of experiments was designed to estimate possible tachyphylaxis after two consecutive injections of  $\text{NP}\gamma$  given 24 h apart. Therefore, at the same time, on day 1 and day 2, a group of rats ( $n = 8$ ) were injected with 25 pmol  $\text{NP}\gamma$  and the effects were measured on both the cardiovascular system and behavioural activity. This control experiment was required to confirm the adequacy of this schedule in the protocol using the antagonists against that dose of  $\text{NP}\gamma$ .

In the third part of this study, one or a combination of three antagonists (RP 67,580, SR 48,968 or R 820) was given i.c.v. in a volume of 1  $\mu\text{l}$  as a pretreatment 5 min prior to the injection of 25 pmol  $\text{NP}\gamma$ . On the first day of the experiment, the vehicle CSF containing dimethylsulphoxide (DMSO), used to dissolve the tested antagonist, was injected i.c.v. 5 min prior to  $\text{NP}\gamma$  (25 pmol). On the second day, one of the following pretreatments was given, prior to  $\text{NP}\gamma$ , to five groups of rats: group 1 ( $n = 8$ ), 650 pmol SR 48,968; group 2 ( $n = 8$ ), 6.5 nmol SR 48,968; group 3 ( $n = 8$ ), 6.5 nmol RP 67,580; group 4 ( $n = 8$ ), 6.5 nmol SR 48,968 + 6.5 nmol RP 67,580; group 5 ( $n = 8$ ), 6.5 nmol SR 48,968 + 6.5 nmol RP 67,580 + 6.5 nmol R 820. Doses of antagonists used in these experiments are based on a previous study (Picard et al., 1994). Each animal received only one pretreatment. On the third day,  $\text{NP}\gamma$  was injected alone to evaluate the reversibility of any inhibition observed on day 2. The intrinsic activity of the antagonists was tested in separate experiments ( $n = 8$ ). Baseline MAP and HR values were calculated 1 min before the injection of  $\text{NP}\gamma$ .

Another group of rats ( $n = 6$ ) was used in a fourth series of experiments designed to clearly rule out the participation of  $\text{NK}_1$  receptors in the central effects of  $\text{NP}\gamma$  and to gain more information concerning the substantial cardiovascular and behavioural component which is resistant to  $\text{NK}_2$  receptor blockade after  $\text{NP}\gamma$  injection. Therefore, on the first day,  $\text{NP}\gamma$  (25 pmol) was injected i.c.v. and the cardiovascular and behavioural responses were measured over a period of 30 min. On the second day, SP and NKA were co-administered 3 - 5 times at 30 min intervals with high doses (6.5 nmol) to cause rapid desensitization of  $\text{NK}_1$  and  $\text{NK}_2$  receptors. After complete desensitization to SP and NKA,  $\text{NP}\gamma$  (25 pmol) was injected i.c.v. and its central effects

were compared to those observed 24 h earlier. One hour after NP $\gamma$  injection, SP and NKA were co-administered again to ascertain the desensitization.

#### *Peptides and non-peptides*

The non-peptide NK<sub>1</sub> antagonist, RP 67,580 (racemic form of 7,7-diphenyl-2[1-imino-2-(2-methoxy-phenyl)-ethyl]perhydroisoindol-4-one (3aR, 7aR); mol. wt.: 475,0 for the hydrochloride salt) was a gift from Dr C. Garret, Rhône-Poulenc Rorer, Paris, France. The NK<sub>2</sub> antagonist SR 48,968 ((S)-N-methyl-N[4-(4-acetylamino-4-phenyl-piperidino)-2-(3,4-dichlorophenyl)-butyl]benzamide; mol. wt.: 570,0) was a gift of Dr J.-C. Brelière, Sanofi, Montpellier, France. The compound R 820 (3-Indolylcarbonyl-Hyp-Phg-N(Me)-Bzl), synthesized in the laboratory of Dr D. Regoli (Sherbrooke University, Sherbrooke, Canada), is a competitive and selective antagonist of the NK<sub>3</sub> receptor (Regoli et al., 1994). NP $\gamma$ , SP, NKA and angiotensin II were purchased from Hükabel Scientific Ltd, Montréal, Canada. Heparin sodium salt Grade II from porcine intestinal mucosa was purchased from Sigma chemicals (St.Louis, MO, U.S.A.). The antagonists were dissolved in DMSO (Fisher) and CSF was added to obtain the desired solution (the final solution contained a maximum of 20% of DMSO). NP $\gamma$ , SP, NKA and angiotensin II were dissolved directly in CSF. The stock solutions (1-10 mg ml<sup>-1</sup>) of peptides and non-peptides were divided into 100  $\mu$ l aliquots and stored at -20°C until used. Daily dilutions were made in CSF before each experiment.

#### *Statistical analysis of data*

The results are expressed as mean  $\pm$  s.e.mean. Statistical differences were evaluated with Student's *t* test for paired samples or Wilcoxon-Mann-Whitney (U) test for unpaired samples on non parametric values (behaviour frequency). When more than one comparison was made, the significance of differences among groups was evaluated with a one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) in conjunction

with Bonferroni confidence intervals. Only probability values ( $P$ ) smaller than 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

### *Central cardiovascular and behavioural effects induced by NP $\gamma$*

The time course of MAP and HR variations elicited by the i.c.v. injection of NP $\gamma$  are illustrated on Figure 1. While 1 and 10 pmol NP $\gamma$  failed to modify MAP when compared to CSF, higher doses (25, 78 and 780 pmol) of NP $\gamma$  elicited dose- and time-dependent increases in MAP. The pressor response reached a maximum at 3-5 min (25 and 78 pmol) or 7-9 min (780 pmol) before returning gradually to pre-injection values. Contrary to the MAP response, HR was significantly ( $P < 0.05$ ) increased with 10 pmol of NP $\gamma$ . Higher doses of NP $\gamma$  (25 - 780 pmol) raised in a dose- and time-dependent fashion the HR. The tachycardiac response reached maximum values within 3 min and returned to basal values in parallel with the pressor response.

The cardiovascular responses to i.c.v. NP $\gamma$  were accompanied by a marked increase in behavioural activity. As shown in Table 1, face washing, head scratching, grooming and wet dog shake increased dose-dependently following injection of NP $\gamma$  (10 - 780 pmol). While grooming was significantly enhanced by 10 pmol NP $\gamma$ , the threshold dose for face washing and head scratching was 25 pmol and that for the wet dog shake was 78 pmol. In addition, face washing, head scratching and grooming manifestations seemed to occur in close parallel with the cardiovascular responses and presented a similar time course.

---



### *Reproduction of the central effects of NPY*

This series of experiments was undertaken to evaluate the possible desensitization to NPY-induced cardiovascular and behavioural effects when two i.c.v. injections of 25 pmol are given one day apart. According to this protocol, the changes in MAP, HR, face washing, head scratching, grooming and wet dog shake produced by the first and second injection of NPY were not significantly different from each other (Figure 2).

### *Effects of selective tachykinin antagonists versus the central effects of NPY*

No statistical difference was observed between baseline MAP and HR values on day 1 (without antagonist), day 2 (5 min after antagonist injection) and day 3 (24 h after antagonist injection) in each of the five groups of rats tested with antagonist (Table 2). The NK<sub>1</sub> receptor antagonist RP 67,580 (6.5 nmol) was inactive against the central cardiovascular and behavioural effects induced by 25 pmol NPY (Figure 3 and Table 3). In contrast, the pressor as well as the face washing, head scratching and grooming behaviours induced by 25 pmol NPY were significantly and dose-dependently reduced when rats were pretreated with the NK<sub>2</sub> selective antagonist SR 48,968 (650 - 6500 pmol) (Figure 3 and Table 3). Whereas the tachycardiac response to NPY was significantly reduced by the highest dose of SR 48,968 (6.5 nmol), the wet dog shake behaviour remained resistant to this treatment. The inhibitory effect of the antagonist on the cardiovascular system was no longer observed when the agonist was readministered 24 h later (Figure 3).

RP 67,580 (6.5 nmol) and SR 48,968 (6.5 nmol) were co-injected and tested against the NPY-mediated effects. This pretreatment was as effective as SR 48,968 alone (6.5 nmol) to reduce NPY-induced responses (Figure 3 et Table 3). The residual effects of NPY were still significantly different from vehicle ( $P < 0.05$ ) except for face washing which was entirely abolished (Figure 3 et Table 3).

Finally, a combination of SR 48,968 (6.5 nmol), RP 67,580 (6.5 nmol) and R 820 (6.5 nmol) was administered as a pretreatment to NPY (25 pmol) to block NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and

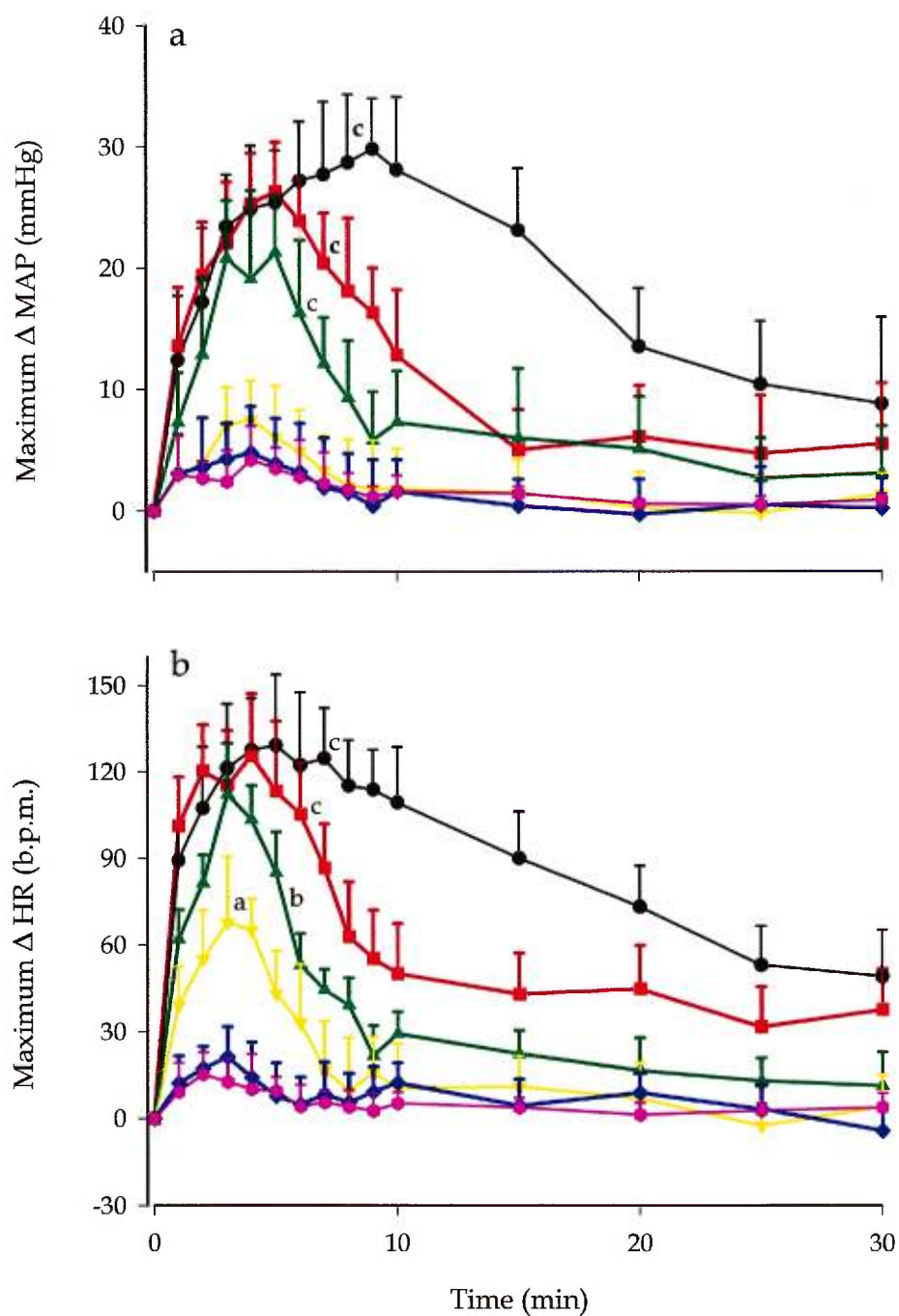
NK<sub>3</sub> receptors. This cocktail of antagonists failed to further suppress the NP $\gamma$ -induced cardiovascular and behavioural effects when compared with SR 48,968 (6.5 nmol) treated animals. The only exception is the wet dog shake effect which was completely abolished (Figure 3 and Table 3).

None of the treatments with antagonists or NP $\gamma$  showed any apparent toxic effects. Moreover, at 6.5 nmol, RP 67,580 or SR 48,968 had no significant effect on MAP, HR or on the individual behaviours (Picard et al., 1994). R 820 (n = 8) was also found to be devoid of intrinsic activity; cardiovascular and behavioural responses to 6.5 nmol R 820 were not significantly different from vehicle values (maximum  $\Delta$  HR :  $13.9 \pm 8.2$  b.p.m. at 3 min post-injection ; maximum  $\Delta$  MAP :  $5.7 \pm 3.1$  mmHg at 3 min post injection; face washing :  $2.1 \pm 2.3$  score 30 min<sup>-1</sup> ; head scratching :  $1.8 \pm 1.3$  score 30 min<sup>-1</sup> ; grooming  $4.4 \pm 2.0$  score 30 min<sup>-1</sup> ; wet dog shake :  $8.1 \pm 3.2$  episodes 30 min<sup>-1</sup>).

#### *Effects of NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptor desensitization on central effects of NP $\gamma$*

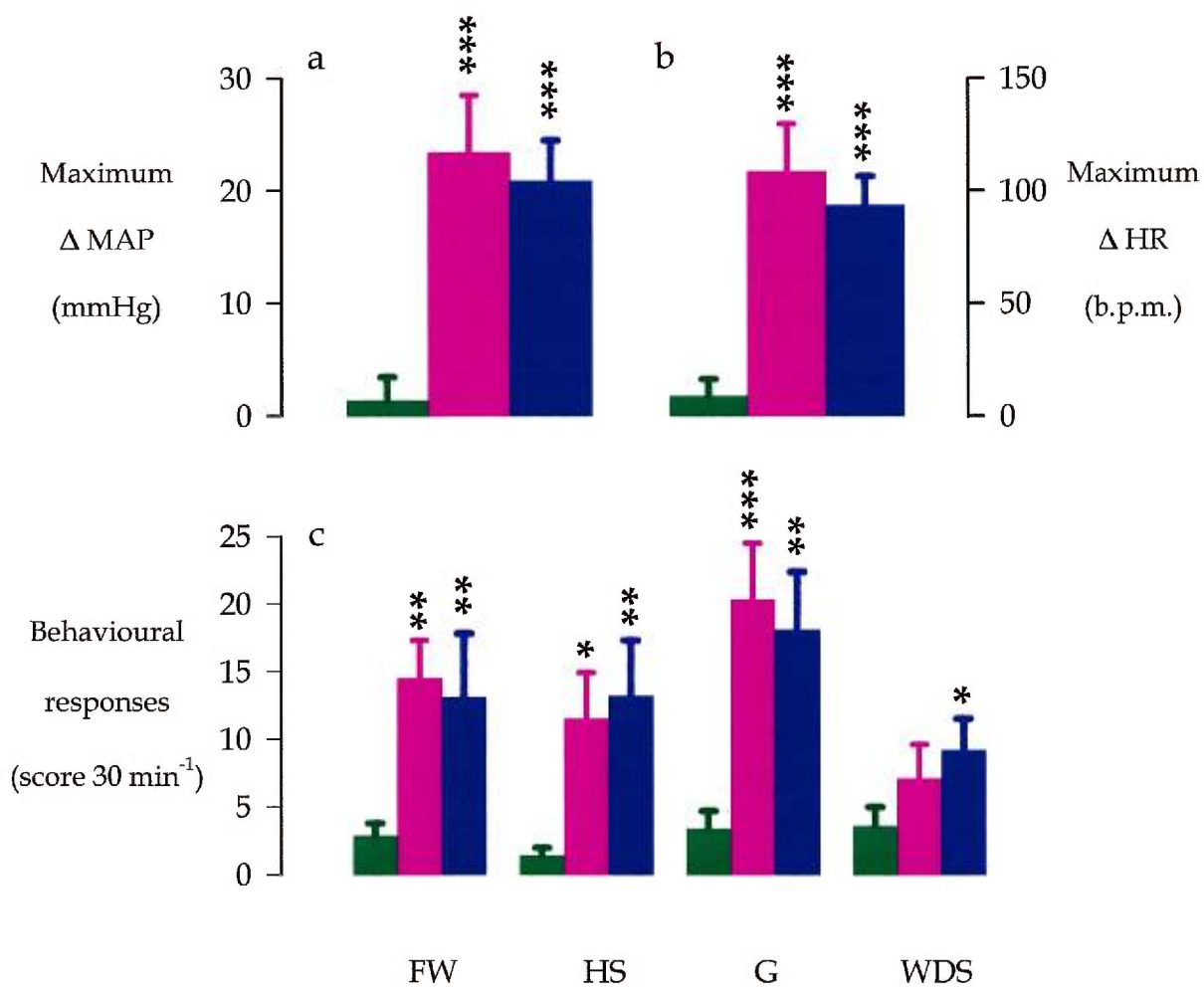
A rapid and complete desensitization to SP and NKA was observed after 3-5 co-injections of 6.5 nmol SP and NKA at 30 min intervals. At the end of this protocol, no central responses could be elicited by co-injection of both peptides. Moreover, the cardiovascular effects as well as the face washing, head scratching and grooming behaviours induced by 25 pmol NP $\gamma$  were significantly decreased when compared to NP $\gamma$  effects measured on the preceding day (Figure 4). However, NP $\gamma$  maintained significant residual effects when compared with CSF values while the wet dog shake behaviour remained unaffected, suggesting a partial and incomplete cross-desensitization between SP / NKA and NP $\gamma$ -induced central effects in rats.

---



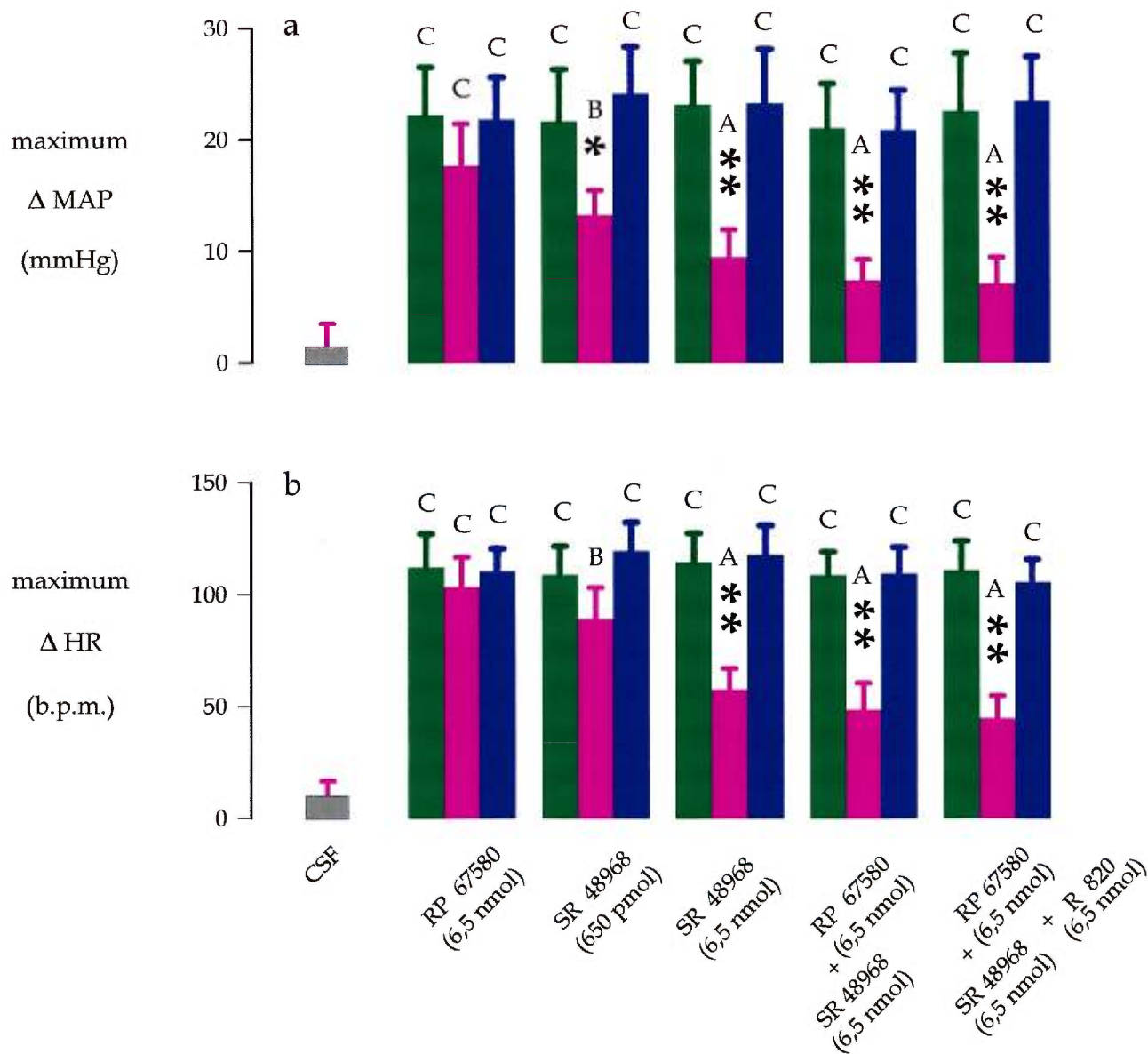
**Figure 1.** Time course of changes in (a) mean arterial blood pressure (MAP) and (b) heart rate (HR) evoked by i.c.v. injection of CSF (●) or NP $\gamma$  at the dose of 1 pmol (◆), 10 pmol (▲), 25 pmol (■) and 780 pmol (●) in the conscious freely moving rat.

Figure 1 Time course of changes in (a) mean arterial blood pressure (MAP) and (b) heart rate (HR) evoked by i.c.v. injections of  $\text{NP}\gamma$  at the dose of 1 - 780 pmol in conscious freely moving rats. Cardiovascular effects mediated by CSF are also shown. Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of 7-9 rats. Baseline MAP and HR values are  $105,3 \pm 9,3$  mmHg and  $342,5 \pm 16,0$  b.p.m. for the CSF group;  $103,2 \pm 10,3$  mmHg and  $361,5 \pm 17,1$  b.p.m. for the 1 pmol group;  $97,5 \pm 9,9$  mmHg and  $337,8 \pm 21,9$  b.p.m. for the 10 pmol group;  $105,4 \pm 13,1$  mmHg and  $362,0 \pm 27,2$  b.p.m. for the 25 pmol group;  $101,0 \pm 13,5$  mmHg and  $353,4 \pm 25,3$  b.p.m. for the 78 pmol group and  $106,3 \pm 8,7$  mmHg and  $351,8 \pm 18,0$  b.p.m. for the 780 group. Statistical comparison to the vehicle for the period of 1-10 min following i.c.v. injection is indicated by a  $P < 0.05$ ; b  $P < 0.01$ ; c  $P < 0.001$ .

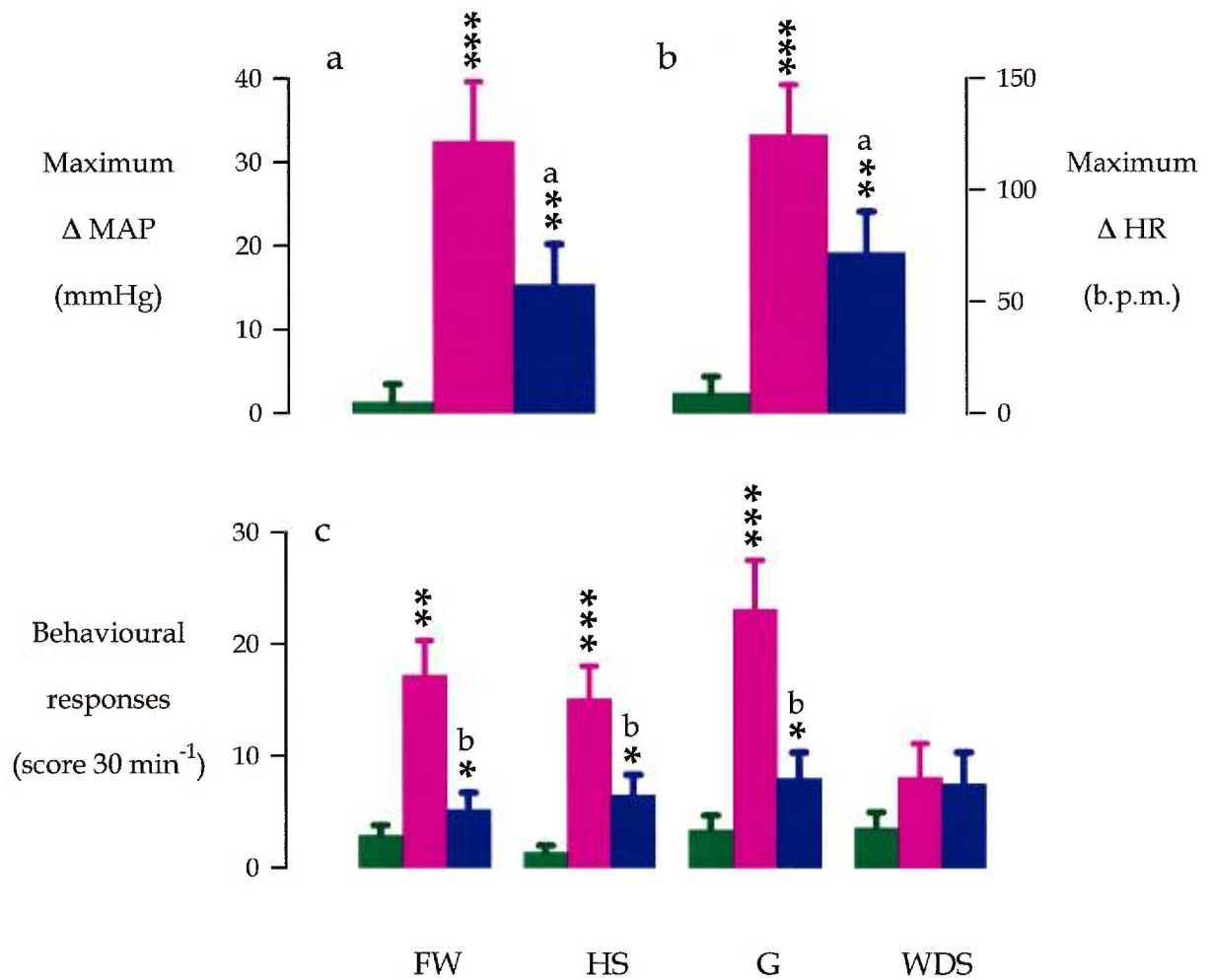


**Figure 2.** Cardiovascular and behavioural effects to i.c.v. injection of CSF (■) or 25 pmol neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) on day 1 (■) and day 2 (■) in the same rats.

Figure 2 Cardiovascular and behavioural effects to i.c.v. injection of CSF (green columns,  $n = 22$ ) or 25 pmol neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) on day 1 (magenta columns,  $n = 8$ ) and day 2 (blue columns,  $n = 8$ ) in the same rats. Shown are maximal changes in (a) in mean arterial blood pressure (MAP), (b) heart rate (HR) and (c) behavioural activity for a 30 min period. FW = face washing, HS = head scratching, G = grooming and WDS = wet dog shake. Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of ( $n$ ) rats. Baseline MAP and HR values are  $100,8 \pm 11,5$  mmHg and  $329,0 \pm 23,7$  b.p.m. for the day 1 group;  $107,8 \pm 9,4$  mmHg and  $377,5 \pm 25,3$  b.p.m. for the day 2 group and  $103,4 \pm 12,5$  mmHg and  $358,0 \pm 19,4$  b.p.m. for the day 3 group. Differences in MAP, HR and behaviours between the two injections of NP $\gamma$  were non-significant. Statistical comparison to CSF are indicated by \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .



**Figure 3.** Effects of selective tachykinin receptor antagonists on maximal changes in (a) mean arterial blood pressure (MAP) and (b) heart rate (HR) induced by the i.c.v. injection of vehicle (■) or 25 pmol NPY in the conscious rats. NPY was injected alone on day 1 (■), 5 min after antagonist on day 2 (■) or alone on day 3 (■). Value represent the mean  $\pm$  s.e. mean of 7-8 rats. Statistical comparison to the vehicle (A, B, C) or to the agonist alone on day 1 (\*; ■) is indicated by \*, A  $P < 0.05$ ; \*\*, B  $P < 0.01$ ; C  $P < 0.001$ .



**Figure 4.** Cardiovascular and behavioural effects to i.c.v. injection of CSF (■) or 25 pmol neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) on day 1 (■) and day 2 (■) in rats which have been previously desensitized to SP and NKA on day 2.



Figure 4 Cardiovascular and behavioural effects to i.c.v. injection of CSF (green columns,  $n = 22$ ) or 25 pmol neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) on day 1 (magenta columns,  $n = 8$ ) and on day 2 (blue columns,  $n = 8$ ) in rats which have been previously desensitized to SP and NKA on day 2. Shown are maximal changes in (a) mean arterial blood pressure (MAP), (b) heart rate (HR) or (c) behavioural activity for a 30 min period. FW = face washing, HS = head scratching, G = grooming and WDS = wet dog shake. Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of 6 rats. Baseline MAP and HR values are  $98,5 \pm 9,2$  mmHg and  $346,0 \pm 19,4$  b.p.m. for the day 1 group;  $103,4 \pm 10,1$  mmHg and  $364,2 \pm 17,6$  b.p.m. for the day 2 group and  $102,4 \pm 11,3$  mmHg and  $344,6 \pm 22,4$  b.p.m. for the day 3 group. Statistical comparison to CSF (\*) or to NP $\gamma$  on day 1 (a and b) are indicated by a\*  $P < 0.05$ ; b,\*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Table 1.** Behavioural responses elicited by i.c.v. injection of neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) in conscious rats

<i>agonist</i>	<i>n</i>	<i>Face washing</i> (score 30 min <sup>-1</sup> )	<i>Head Scratching</i> (score 30 min <sup>-1</sup> )	<i>Grooming</i> (score 30 min <sup>-1</sup> )	<i>Wet dog shakes</i> (episodes 30 min <sup>-1</sup> )
CSF	22	2.9 ± 0.9	1.4 ± 0.6	3.4 ± 1.3	3.6 ± 1.4
NP $\gamma$ (10 pmol)	8	4.9 ± 2.7	3.9 ± 2.1	8.9 ± 3.2*	6.7 ± 3.7
NP $\gamma$ (25 pmol)	9	10.8 ± 4.2*	11.4 ± 3.2*	20.0 ± 5.6**	7.8 ± 4.0
NP $\gamma$ (78 pmol)	7	22.0 ± 7.3 ***	18.4 ± 7.9 ***	47.3 ± 9.5 ***	12.7 ± 5.4*
NP $\gamma$ (780 pmol)	7	36.9 ± 12.9 ***	26.9 ± 13.8 ***	55.9 ± 8.2 ***	16.8 ± 8.9*

Values represent the mean  $\pm$  s.e.mean of (*n*) rats for a period of 30 min. Statistical comparison to CSF was evaluated with a one-way ANOVA and a Wilcoxon-Mann-Whitney (U) test *a posteriori*: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

**Table 2.** Mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) baseline values from the six groups of rats presented in Table 3 and Figure 3.

Pretreatment	Day	treatment	n	Baseline values	
				MAP (mm Hg)	HR (b.p.m.)
vehicle		-	14	104,3 ± 5,2	358,2 ± 14,9
-	1	NP $\gamma$	8	108,5 ± 7,8	348,4 ± 24,3
RP 67,580 (6.5 nmol)	2	NP $\gamma$	8	103,2 ± 8,0	351,2 ± 17,9
-	3	NP $\gamma$	8	98,5 ± 9,1	344,2 ± 19,0
-	1	NP $\gamma$	8	104,3 ± 6,5	360,2 ± 18,4
SR 48,968 (650 pmol)	2	NP $\gamma$	8	108,6 ± 7,7	371,4 ± 21,6
-	3	NP $\gamma$	8	102,3 ± 5,9	357,3 ± 20,7
-	1	NP $\gamma$	8	100,3 ± 8,2	339,1 ± 18,0
SR 48,968 (6.5 nmol)	2	NP $\gamma$	8	97,6 ± 9,1	342,5 ± 20,7
-	3	NP $\gamma$	8	106,3 ± 7,9	336,4 ± 24,1
-	1	NP $\gamma$	8	110,4 ± 7,3	372,9 ± 24,3
RP 67,580 + SR 48,968 (6.5 nmol each)	2	NP $\gamma$	8	115,3 ± 8,3	380,7 ± 23,0
-	3	NP $\gamma$	8	113,2 ± 6,8	391,2 ± 27,4
-	1	NP $\gamma$	8	109,0 ± 5,8	365,0 ± 19,5
RP 67,580 + SR 48,968 + R 820 (6.5 nmol each)	2	NP $\gamma$	8	104,3 ± 9,0	376,2 ± 23,8
-	3	NP $\gamma$	8	111,6 ± 6,3	380,1 ± 16,7

Values represent the mean  $\pm$  s.e. mean from (*n*) rats. Baseline values were measured 1 min prior to NP $\gamma$  administration. No statistical difference was observed between baseline values on day 1, 2 and 3 for each group.

**Table 3.** Effects of selective tachykinin antagonists on behavioural responses elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ )

Pretreatment	treatment	n	face washing (score 30 min <sup>-1</sup> )	head scratching (score 30 min <sup>-1</sup> )	grooming (score 30 min <sup>-1</sup> )	wet dog shakes (episodes 30 min <sup>-1</sup> )
vehicle	-	14	2.6 ± 0.7	2.1 ± 0.5	3.2 ± 1.1	4.2 ± 0.8
-	NP $\gamma$	8	13.9 ± 4.2††	17.2 ± 5.0††	16.2 ± 3.9††	6.1 ± 2.4
RP 67,580 (6.5 nmol)	NP $\gamma$	8	10.4 ± 3.9††	12.1 ± 2.6††	13.8 ± 2.5††	8.3 ± 4.9
-	NP $\gamma$	8	14.0 ± 3.6†††	15.7 ± 4.7††	23.8 ± 5.6†††	10.4 ± 3.3†
SR 48,968 (650 pmol)	NP $\gamma$	8	9.2 ± 2.8††*	8.4 ± 1.6††*	13.4 ± 3.0††*	9.6 ± 2.8†
-	NP $\gamma$	8	13.3 ± 2.4††	14.2 ± 2.8††	20.8 ± 3.2††	9.4 ± 2.9†
SR 48,968 (6.5 nmol)	NP $\gamma$	8	5.8 ± 1.1†**	6.1 ± 1.9†**	9.0 ± 1.8†***	10.1 ± 4.3†

Suite page suivante

**Table 3.** Effects of selective tachykinin antagonists on behavioural responses elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ )

Pretreatment	treatment	<i>n</i>	face washing (score 30 min <sup>-1</sup> )	head scratching (score 30 min <sup>-1</sup> )	grooming (score 30 min <sup>-1</sup> )	wet dog shakes (episodes 30 min <sup>-1</sup> )
-	NP $\gamma$	8	10.4 ± 2.1†	12.8 ± 1.6††	19.8 ± 2.7††	15.7 ± 6.4†
RP 67,580 + SR 48,968 (6.5 nmol each)	NP $\gamma$	8	4.4 ± 2.7*	7.2 ± 2.0†**	9.5 ± 2.3†***	13.0 ± 4.0†
-	NP $\gamma$	8	14.1 ± 3.8†††	12.0 ± 2.5††	27.6 ± 5.3††	13.7 ± 3.0†
RP 67,580 + SR 48,968 + R 820 (6.5 nmol each)	NP $\gamma$	8	6.7 ± 1.3†***	5.9 ± 1.4†**	12.9 ± 4.1†***	6.9 ± 3.8

Values represent the frequency of individual behaviour for 30 min and are indicated by the mean ± s.e. mean of (*n*) rats. The antagonists were injected at the dose indicated 5 min prior to 25 pmol NP $\gamma$ . Statistical comparison to vehicle (†) was evaluated with a Wilcoxon-Mann-Whitney (U) test, while comparison to the agonist in the absence of antagonist (\*) was calculated with student's *t* test for paired samples; \*, † *P* < 0.05; \*\*, †† *P* < 0.01; \*\*\*, ††† *P* < 0.001.

## Discussion

The results of the present study reveal that the i.c.v. administration of NPY in the awake unrestrained rat induces dose- and time-dependent increases in heart rate, blood pressure and behavioural activity (face washing, head scratching and grooming) through the activation of NK<sub>2</sub> receptors and possibly another yet unidentified tachykinin receptor which does not belong to the NK<sub>1</sub> nor the NK<sub>3</sub> receptor subtype.

The cardiovascular and behavioural effects of i.c.v. NPY comply with a general trend which is common to all endogenous PPT-A derived tachykinins. Indeed, dose-dependent increases in MAP and HR were elicited by i.c.v. injection of SP and NKA (Itoi et al., 1992; Picard et al., 1994) and NPK (Prat et al., 1994). In the case of SP, NKA and NPY, these effects were ascribed to sympathetic nervous system stimulation (Unger et al., 1981; 1985; Takano et al., 1990; Hagio et al., 1991). A behavioural arousal reaction including increased locomotion and intense scratching and grooming behaviour accompanies these hemodynamic effects (Itoi et al., 1992; Tschöpe et al., 1992; Picard et al., 1994; Prat et al., 1994). Surprisingly, the order of potency for these natural tachykinins on the cardiovascular system after central administration is NPK > NPY > SP > NKA > NKB (Couture et al., 1995). Therefore, the most potent tachykinins are the N-extended forms of NKA which have been considered as NK<sub>2</sub> agonists in several biological and binding assays (Beaujouan et al., 1988; Takeda and Krause, 1989; Dam et al., 1990a; Van Giersbergen et al., 1992). We may relate this finding to the greater metabolic stability of NPK and NPY due to their longer N-terminal amino acid sequence (Takeda and Krause, 1989). It remains possible that NPY is processed to a more active metabolite such as NPY(1-9) which is the major product of posttranslational processing of  $\gamma$ -PPTA in rat tissues (Wang et al., 1993), however, we must rule out NKA alone as possible metabolite because this peptide is less potent than NPY and NPK in this paradigm and contrary to the latter tachykinins, the central effects of NKA are mediated entirely by NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors (Couture et al., 1995).

*Central receptors activated by i.c.v.NP $\gamma$* 

Although NP $\gamma$ -induced responses are qualitatively similar to those of NPK, SP and NKA, the relative involvement of NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors differs substantially for each peptide. We have previously shown that i.c.v. SP activates primarily NK<sub>1</sub> receptors but also NK<sub>2</sub> receptors under NK<sub>1</sub> receptor blockade. Conversely, the central effects of NKA were mediated mainly through NK<sub>2</sub> receptors while a minor NK<sub>1</sub> receptor component was unmasked under NK<sub>2</sub> receptor inhibition (Picard et al., 1994). It is noteworthy to mention that the treatment with 6.5 nmol RP 67,580 + 6.5 nmol SR 48968 completely abolished the cardiovascular and behavioural responses induced by i.c.v. SP and NKA (Picard et al., 1994). In contrast, the central actions of NPK were mediated solely by the NK<sub>1</sub> receptor as no residual responses were observed when NPK was pretreated with RP 67,580 (6.5 nmol) in a protocol similar to the present study (Prat et al., 1994). Moreover, as stated earlier, the cardiovascular responses induced by either SP or NKA, thus by activation of NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors, have been associated with an increased sympathoadrenal activity (Unger et al., 1981; 1985; Takano et al., 1990), while those induced by i.c.v. injection of NK<sub>3</sub> agonists would result mainly from the release of vasopressin from the hypothalamus and to a minor extent by activation of the sympathetic nervous system (Polidori et al., 1989; Takano et al., 1990; 1993). From these previous studies, one could reason that NP $\gamma$  acts through the activation of NK<sub>1</sub> or NK<sub>2</sub> or both receptors to activate primarily the central autonomic nervous system. Despite our results suggest that NK<sub>2</sub> receptors are partly involved in the central effects of NP $\gamma$ , they rule out the participation of NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptors in these effects. Since important residual responses persisted after treatment with a combination of NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptor antagonists or after NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptor desensitization, the presence of a new tachykinin receptor subtype displaying a high affinity for NP $\gamma$  can be suggested in the rat brain. Although it is well established that there exist only three different tachykinin receptors that preferentially interact with SP (NK<sub>1</sub>), NKA (NK<sub>2</sub>) and NKB (NK<sub>3</sub>), it remains unclear whether the multiple NKA-related peptides interact with a single class of binding sites (NK<sub>2</sub>) or whether they differentially interact with other undiscovered tachykinin receptor subtypes (Takeda and Krause, 1991).

*Site of action for NPY*

A spinal site of action for i.c.v. injection of NPY is unlikely since the dose of NPY necessary to elicit pressor and tachycardiac responses after i.c.v. injection (10-25 pmol) was much lower than that required intrathecally (78 pmol) (Poulat et al., accompanying paper). The hypothalamus may be the site of action of tachykinins since microinjections of SP into the anterior, ventromedial and medial preoptic parts of the hypothalamus of the awake unrestrained rat evoked cardiovascular and behavioural changes similar to those produced by i.c.v. injections of SP or NKA (Itoi et al., 1991; 1994). However, it would be premature to reach any conclusions regarding the exact localization of the tachykinin receptors activated by i.c.v. NPY. Nonetheless, the fast onset of the response to i.c.v. NPY leads one to suggest that receptors sites must be localized in the circumventricular organs or in adjacent periventricular structures. A peripheral site of action is also unlikely since these peptides are vasodilators and hypotensors after systemic administration (Couture et al., 1989; Décarie et Couture, 1992)

The NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptors have been found in moderate to high density in the rat hypothalamus (Dam et al., 1990b, c; Larsen et al., 1992; Maeno et al., 1993). In contrast, the presence of NK<sub>2</sub> receptors in the rat brain remains controversial (Mantyh et al., 1989; Quirion et al., 1991; Takeda and Krause 1991; Mussap et al., 1993) most likely because these receptors, present in small amount in very discrete areas, cannot be adequately measured with currently available NK<sub>2</sub> receptor radioligands. Bolton Hunter-labelled NKA and [<sup>3</sup>H]-NKA were among the first NK<sub>2</sub> radioligands used. However, their use was limited due to their relatively poor selectivity and weak affinity (Buck et al., 1986; Bergstrom et al., 1987; Foster et Tridgett, 1988). A widely used radioligand is [<sup>125</sup>I]-NKA, which has high affinity at peripheral NK<sub>2</sub> sites (Buck et Krstenansky, 1987). However, in studies using [<sup>125</sup>I]-NKA as a probe in the guinea pig lung, Burcher et al. (1989) found that this radioligand was displaced by SP > NKA > NKB, demonstrating binding to the NK<sub>1</sub> receptors. Curiously, in the presence of phosphoramidon and other peptidase inhibitors, Bolton-Hunter labelled SP and [<sup>125</sup>I]-NKA were both displaced by SP > [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP > SP methyl ester > NPY > NKA = NKB = kassinin >> NPK, again suggesting binding to NK<sub>1</sub> receptors (Geraghty et al.,



1992). High-affinity NK<sub>2</sub> binding sites were found using the radioligand [<sup>125</sup>I]-NPγ in the rat CNS and in the periphery (Dam et al., 1990a; Takeda et Krause, 1991). NPγ was the most potent binding competitor of [<sup>125</sup>I]-NPγ in the CNS (NPγ > NKA > eledoisin > SP), but appears equipotent with NPK and NKA in the periphery, suggesting that [<sup>125</sup>I]-NPγ can interact with more than one receptor. Interestingly, two different pharmacological profiles of NK<sub>2</sub> receptors were shown with this radioligand in rat duodenum, vas deferens and urinary bladder membrane preparations (Takeda et Krause, 1991). The rank order of potency of synthetic and naturally occurring tachykinin peptides in displacing <sup>125</sup>I-NPγ-binding was NPγ = NPK > NKA > NKB = eledoisin = [βAla<sup>8</sup>]NKA(4-10) > SP > physalaemin > [Lys<sup>6</sup>]eledoisin(6-10) in rat duodenum and NPγ = NPK = NKA > NKB = eledoisin = [Lys<sup>6</sup>]eledoisin(6-10) = [βAla<sup>8</sup>]NKA(4-10) > SP > physalaemin in rat vas deferens and urinary bladder. In addition, Takeda et Krause (1991), reported a more evident discrepancy between levels of NK<sub>2</sub> receptor mRNA and the binding capacity (B<sub>max</sub>) of [<sup>125</sup>I]-NPγ to specifically bind these tissue membranes. The relative amount of NK<sub>2</sub> receptor mRNA in duodenum, vas deferens and urinary bladder were 0.08, 0.33 and 1.0, respectively while the B<sub>max</sub> (fmol mg<sup>-1</sup> protein) for [<sup>125</sup>I]-NPγ to those tissues were 59.0 ± 3.4, 16.5 ± 0.6 and 50.8 ± 3.0, respectively. They concluded that there appear to exist two distinct intra-species subtypes of NK<sub>2</sub> receptors in rat tissues. Whereas [<sup>125</sup>I]-NPγ binding sites in the CNS appear to correlate well with the potent antidipsogenic and antinatriorexic effects of NKA and related tachykinins in the rat (Massi et al., 1990; 1991), other investigators (Badgery-Parker et al., 1993) have reported weak specific binding for a new NK<sub>2</sub> radioligand [<sup>125</sup>I]-[Lys<sup>5</sup>,Tyr(I)<sub>2</sub><sup>7</sup>, MeLeu<sup>9</sup>,Nle<sup>10</sup>]-NKA(4-10) in adult rat brain, suggesting a low level of central NK<sub>2</sub> receptors. Consistent with the relative abundance of γ-PPT mRNA in rat brain (Krause et al., 1987; Marchand et al., 1993) and [<sup>125</sup>I]-NPγ in the rat CNS (Dam et al., 1990a) in comparison with NK<sub>2</sub>-like binding sites, distinct NPγ-preferring receptors may exist.

### *Conclusion*

In summary, i.c.v. NPY induces marked increases in MAP, HR as well as grooming and motor behaviour. Pharmacological evidence suggest that these effects are secondary to NK<sub>2</sub> receptor activation and another yet unidentified NPY<sub>1</sub>-preferring site in the rat brain. Molecular characterization of distinct intra-species NK<sub>2</sub> receptor subtypes and the development of new highly selective radioligands for NPY<sub>1</sub>-binding sites will be instrumental to confirm this hypothesis.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Dr Domenico Regoli, Sherbrooke University, Dept. of Pharmacology, who generously provided R 820. We also want to acknowledge Drs Claude Garret (Rhône-Poulenc Rorer, Paris, France) and Jean-Claude Brelière (Sanofi, Montpellier, France) for their generous gifts of RP 67,580 and SR 48,968, respectively. This study was supported by the Heart and Stroke Foundation of Québec and a grant-in-aid (MT-8925) from the Medical Research Council of Canada to R.C. P.P. holds studentships from The Heart and Stroke Foundation of Canada and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche.

---

## References

- Advenier, C., Rouissi, N., Nguyen, Q.T., Emonds-Alt, X., Breliere, J.C., Neliat, G., Naline, E. et Regoli, D., Neurokinin A (NK2) receptor revisited with SR 48968, a potent non-peptide antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 184: 1418-1424, 1992.
- Badgery-Parker, T., Zeng, X.-P., Lavielle, S. et Burcher, E., A novel, selective radioligand, [<sup>125</sup>I]-[Lys<sup>5</sup>,Tyr(I<sub>2</sub>)<sup>7</sup>,MeLeu<sup>9</sup>,Nle<sup>10</sup>]-NKA(4-10), for the NK-2 receptor. *Regul. Pept.*, 46: 455-457, 1993.
- Beaujouan, J.-C., Saffroy, M., Petitet, F., Torrens, Y. et Glowinski, J., Neuropeptide K, scyliorhinin I and II: new tools in the tachykinin receptor field. *Eur. J. Pharmacol.*, 151: 353-354, 1988.
- Bergstrom, L., Beaujouan, J.-C., Torrens, Y., Saffroy, M., Glowinski, J., Lavielle, S., Chassaing, G., Marquet, A., D'Orléans-Juste, P., Dion, S. et Regoli, D., <sup>3</sup>H-Neurokinin A labels a specific tachykinin-binding site in the rat duodenal smooth muscle. *Mol. Pharmacol.*, 32: 764-771, 1987.
- Buck, S.H. et Krstenansky, J.L., The dogfish peptides scyliorhinin I and scyliorhinin II bind with differential selectivity to mammalian tachykinin receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 144: 109-111, 1987.
- Buck, S.H., Helke, C.J., Burcher, E., Shults, C.W. et O'Donohue T.L., Pharmacologic characterization and autoradiographic distribution of binding sites for iodinated tachykinins in rat central nervous system. *Peptides*, 7: 1109-1120, 1986.
- Burcher, E., Watkins, D.J. et O'Flynn, N.M., Both neurokinin A and substance P bind to NK1 receptors in guinea-pig lung. *Pulm. Pharmacol.*, 1: 201-203, 1989.
- Burcher, E., Alouan, L.A., Johnson, P.R.A. et Black, J.L., Neuropeptide gamma, the most potent contractile tachykinin tachykinin in human isolated bronchus, acts via a "non-classical" NK2 receptor. *Neuropept.*, 20: 79-82, 1991.
- Carter, M.S. et Krause, J.E., Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide  $\gamma$ . *J. Neurosci.*, 10: 2203-2214, 1990.
- Couture, R., Picard, P., Poulat, P. et Prat, A., Characterization of the tachykinin receptors involved in spinal and supraspinal cardiovascular regulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, in press, 1995.
- Couture, R., Laneuville, O., Guimond, C., Drapeau, G. et Regoli, D., Characterization of the peripheral action of neurokinins and neurokinin receptor selective agonists on the rat cardiovascular system. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 340: 547-557, 1989.

Dam, T.V., Takeda, Y., Krause, J.E., Escher, E. et Quirion, R.,  $\gamma$ -preprotachykinin-(72-92)-peptide amide: an endogenous preprotachykinin I gene-derived peptide that preferentially binds to neurokinin-2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 246-250, 1990a.

Dam, T.V., Escher, E. et Quirion, R., Visualization of neurokinin-3 receptor sites in the rat brain using the highly selective ligand [ $^3\text{H}$ ]senktide. *Brain Res.*, 506: 175-179, 1990b.

Dam, T.V., Martinelli, B. et Quirion, R., Autoradiographic distribution of brain neurokinin-1/substance P receptors using a highly selective ligand [ $^3\text{H}$ ]-[Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-substance P. *Brain Res.*, 531: 333-337, 1990c.

Deacon, C.F., Agoston, D.V., Nau, R. et Conlon, J.M., Conversion of neuropeptide K to neurokinin A and vesicular colocalisation of neurokinin A and substance P in neurons of the guinea pig small intestine. *J. Neurochem.*, 48: 141-146, 1987.

Décarie, A. et Couture, R., Characterization of the peripheral action of neuropeptide K on the rat cardiovascular system. *Eur. J. Pharmacol.*, 213: 125-131, 1992.

Foster, A.C. et Tridgett, R., Comparison of the binding of radiolabelled neurokinin A and eledoisin in rat cortex synaptic membranes. *Br. J. Pharmacol.*, 94: 602-608, 1988.

Geraghty, D.P., Mussap, C.J. et Burcher, E., Radioiodinated substance P, neurokinin A, and eledoisin bind predominantly to NK1 receptors in guinea-pig lung. *Mol. Pharmacol.*, 41: 147-153, 1992.

Gispén, W.H., Wiegant, V.M., Greven, H.M. et De Wied, D., The induction of excessive grooming in the rat by intraventricular application of peptides derived from ACTH: structure-activity studies. *Life Sci.*, 17: 645-652, 1975.

Guard, S. et Watson, S.P., Tachykinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. *Neurochem. Int.*, 18: 149-165, 1991.

Hagio, T., Takano, Y., Nagashima, A., Nakayama, Y., Tateishi, K. et Kamiya H., The central pressor actions of a novel tachykinin peptide,  $\gamma$ -preprotachykinin-(72-92)-peptide amide. *Eur. J. Pharmacol.*, 192: 173-176, 1991.

Helke, C.J., Krause, J.E., Mantyh, P.W., Couture, R. et Bannon, M.J., Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms. *FASEB J.*, 4: 1606-1615, 1990.

Itoi, K., Jost, N., Badoer, E., Tschöpe, C., Culman, J. et Unger, Th., Localization of the substance P-induced cardiovascular responses in the rat hypothalamus. *Brain Res.*, 558: 123-126, 1991.

Itoi, K., Tschöpe, C., Jost, N., Culman, J., Lebrun, C., Stauss, B. et Unger, Th., Identification of the central tachykinin receptor subclass involved in substance P-induced cardiovascular and behavioral responses in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 219: 435-444, 1992.

Itoi, K., Jost, N., Culman, J., Tschöpe, C. et Unger, Th., Further localization of cardiovascular and behavioural actions of substance P in the rat brain. *Brain Res.*, 668: 100-106, 1994.

Kage, R., McGregor, G.P., Thim, L. et Conlon, J.M., Neuropeptide- $\gamma$ : a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from  $\gamma$ -preprotachykinin. *J. Neurochem.*, 50: 1412-1417, 1988.

Kirby, R.F., Thunhorst, R.L. et Johnson, A.K., Effects of a non-peptide angiotensin receptor antagonist on drinking and blood pressure responses to centrally administered angiotensins in the rat. *Brain Res.*, 576: 348-350, 1992.

Krause, J.E., Chirgwin, J.M., Carter, M.S., Xu, Z.S. et Hershey, A.D., Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptide substance P and neurokinin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 881-885, 1987.

Larsen, P.J., Jessop, D.S., Chowdrey, H.S., Mikkelsen, J.D. et Lightman, S.L., Osmotic regulation of substance P and neurokinin A peptide content and substance P binding sites in distinct hypothalamic nuclei of the rat. *Peptides*, 13: 705-712, 1992.

Maeno, H., Kiyama, H. et Tohyama, M., Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. *Mol. Brain Res.*, 18: 43-58, 1993.

Mantyh, P.W., Gates, T., Mantyh, C.R. et Maggio, J.E., Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. *J. Neurosci.*, 9: 258-279, 1989.

Marchand, J.E., Zaccheo, T.S., Connelly, C.S. et Kream, R.M., Selective in situ hybridization histochemical analyses of alternatively spliced mRNAs encoding  $\beta$ - and  $\gamma$ -preprotachykinins in rat central nervous system. *Molec. Brain Res.*, 17: 83-94, 1993.

Massi, M., Gentili, L., Perfumi, M., De Caro, G. et Schulkin, J., Inhibition of salt appetite in the rat following injection of tachykinins into the medial amygdala. *Brain Res.*, 513: 1-7, 1990.

Massi, M., Polidori, C., Perfumi, M., Gentili, L. et De Caro, G., Tachykinin receptor subtypes involved in the central effects of tachykinins on water and salt intake. *Brain Res. Bull.*, 26: 155-160, 1991.

Mussap, C.J., Geraghty, D.P. et Burcher, E., Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. *J. Neurochem.*, 60: 1987-2009, 1993.

Pham, T.M. et Couture, R., Inhibitory action of ( $\pm$ )CP-96,345 on the cardiovascular responses to intrathecal substance P and neuropeptide K in the conscious freely moving rat. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 347: 34-41, 1993.

Picard, P., Regoli, D. et Couture, R., Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered tachykinins in the rat: characterization of receptors with selective antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, 112: 240-249, 1994.

Polidori, C., Saija, A., Perfumi, M., Costa, G., De Caro, G. et Massi, M., Vasopressin release induced by intracranial injection of tachykinins is due to activation of central neurokinin-3 receptors. *Neurosci. Lett.*, 103: 320-325, 1989.

Poulat, P., De Champlain, J. et Couture, R., Cardiovascular effects induced by the intrathecal administration of neuropeptide gamma in conscious rats: receptor characterization and mechanism of action. *Br. J. Pharmacol.*, accompanying paper, 1995.

Prat, A., Picard, P. et Couture, R., Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered neuropeptide K in the rat: receptor characterization. *Br. J. Pharmacol.*, 112: 250-256, 1994.

Qian, Y., Advenier, C., Naline, E., Bellamy, J.F. et Emonds-Alt, X., Effects of SR 48968 on the neuropeptide gamma-induced contraction of the human isolated bronchus. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 8: 71-75, 1994.

Quirion, R., Dam, T.V. et Guard, S., Selective neurokinin receptor radioligands. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 632: 137-144, 1991.

Regoli, D., Drapeau, G., Dion, S. et D'Orléans-Juste, P., Pharmacological receptors for substance P and neurokinins. *Life Sci.*, 40: 109-117, 1987.

Regoli, D., Boudon, A. et Fauchère, J.-L., Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol. Rev.*, 46: 551-599, 1994.

Takano, Y., Nagashima, A., Hagio, T., Tateishi, K. et Kamiya, H.O., Role of central tachykinin peptides in cardiovascular regulation in rats. *Brain Res.*, 528: 231-237, 1990.

Takano, Y., Nakayama, Y., Matsumoto, T., Saito, R. et Kamiya, H.-O., The mechanism of central pressor actions of tachykinin NK-3 receptor in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Regul. Peptides*, 46: 360-363, 1993.

Takeda, Y. et Krause, J.E., Neuropeptide K potently stimulates salivary gland secretion and potentiates substance P-induced salivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 392-396, 1989.

Takeda, Y. et Krause, J.E., Pharmacological and molecular biological studies on the diversity of rat tachykinin NK-2 receptor subtypes in rat CNS, duodenum, vas deferens, and urinary bladder. *Ann. New York Acad. Sci.*, 632: 479-482, 1991.

Takeda, Y., Takeda, J., Smart, B.M. et Krause, J.E., Regional distribution of neuropeptide  $\gamma$  and other tachykinin peptides derived from the substance P gene in the rat. *Regul. Pept.*, 28: 323-333, 1990.

Tatemoto, K., Lundberg, J.M., Jörnvall, H. et Mutt, V., Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 128: 947-953, 1985.

Tschöpe, C., Picard, P., Culman, J., Prat, A., Itoi, K., Regoli, D., Unger, Th. et Couture, R., Use of selective antagonists to dissociate the central cardiovascular and behavioural effects of tachykinins on NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 750-755, 1992.

Unger, Th., Rascher, W., Schuster, C., Pavlovitch, R., Schömig, A., Dietz, R. et Ganten, D., Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II: role of the sympathetic nervous system and vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.*, 71: 33-42, 1981.

Unger, Th, Becker, H., Petty, M., Demmert, G., Schneider, B., Ganten, D. et Lang, R.E., Differential effects of central angiotensin II and substance P on sympathetic nerve activity in conscious rats. *Circ. Res.*, 56: 563-575, 1985.

Van Giersbergen, P.L.M., Shatzer, S.A., Burcher, E. et Buck, S.H., Comparison of the effects of neuropeptide K and neuropeptide  $\gamma$  with neurokinin A at NK<sub>2</sub> receptors in the Hamster urinary bladder. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 345: 51-56, 1992.

Wang, Y., Bockman, C.S., Lovas, S., Abel, P.W., Murphy, R.F. et Conlon, J.M., Neuropeptide  $\gamma$ -(1-9)-peptide: a major product of the posttranslational processing of  $\gamma$ -preprotachykinin in rat tissues. *J. Neurochem.*, 61: 1231-1235, 1993.

Yuan, L., Burcher, E. et Nail, B.S., Use of selective agonists and antagonists to characterize tachykinin receptors mediating airway responsiveness in anesthetized guinea-pig. *Pulmonary Pharmacol.*, 7: 169-178, 1994.

---

## CHAPITRE 5

# CARACTERISATION DES RECEPTEURS AUX TACHYKININES IMPLIQUES DANS LA REGULATION SPINALE ET SUPRASPINALE CHEZ LE RAT EVEILLE

---

*"Non, la science n'est pas une illusion, mais ce serait une illusion de croire que nous puissions trouver  
ailleurs ce qu'elle ne peut pas nous donner."*

Sigmund Freud, 1932 (L'avenir d'une illusion)



## **Avant-propos au cinquième chapitre**

Ce chapitre est une revue sur la caractérisation pharmacologique des récepteurs aux tachykinines impliqués dans le contrôle spinal et supraspinal de l'activité cardiovasculaire. Donc en addition aux trois chapitre précédents, la caractérisation pharmacologique du NPK (Prat et coll., 1994) et de la NKB dans le même modèle expérimental sera revue dans un contexte global. De plus, un sommaire des effets spinaux des tachykinines NPK, NP $\gamma$ , SP, NKA et NKB en présence et en absence d'antagonistes pour les trois récepteurs des tachykinines chez le rat éveillé sera aussi adressé et comparé avec les effets supraspinaux des tachykinines.

### **Contribution personnelle à cet article**

Sauf pour les résultats obtenus avec le NPK, où M. A. Prat a effectué la majorité des travaux, j'ai effectué toutes les préparations animales, les mesures des réponses cardiovasculaires et comportementales, les protocoles expérimentaux ainsi que l'analyse et l'interprétation des résultats de la portion supraspinale de cet article. La partie spinale de cet article a été effectuée par M. P. Poulat. De plus, en concert avec l'ensemble des auteurs, j'ai participé activement à la rédaction et à la correction de cet article. D'une façon approximative, ma contribution pour cet article se chiffre à environ la moitié.

---

---

*CHARACTERIZATION OF THE TACHYKININ RECEPTORS INVOLVED  
IN SPINAL AND SUPRASPINAL CARDIOVASCULAR REGULATION*

---

Réjean Couture, Pierre Picard, Philippe Poulat and Alexandre Prat

Department of Physiology, Faculté de médecine, Université de Montréal, Groupe  
de recherche sur le système nerveux autonome, Montréal, Québec, Canada

---

Can. J. Physiol. Pharmacol. (1995) 73, 892-902.

## Abstract

The pharmacological characterization of the tachykinin receptors involved in spinal and supraspinal cardiovascular regulation is reviewed in this report. In conscious rats, substance P (SP), neurokinin A (NKA), neurokinin B (NKB), neuropeptide K (NPK) and neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) were injected either intrathecally (i.t.) or intracerebroventricularly (i.c.v.) and their effects were assessed on mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR). Moreover, selective antagonists for NK-1 (( $\pm$ )-CP-96345 and RP-67580), NK-2 (SR-48968) and NK-3 (R-486) receptors were tested against the agonists. I.t. tachykinins elicited dose-dependent increases in MAP and HR (NPK > NP $\gamma$  > SP > NKA > NKB). The cardiovascular response to i.t. SP, NPK, and NP $\gamma$  was significantly attenuated by the prior i.t. administration of ( $\pm$ )-CP-96345 and RP-67580 but not by SR-48968 and R-486. By the i.c.v. route, tachykinins also elicited pressor and tachycardiac responses dose dependently (NPK > NP $\gamma$  > SP > NKA > NKB). Senktide and [MePhe<sup>7</sup>]NKB, two NK-3-selective agonists, were slightly more potent than NKB on both parameters. Whereas the cardiovascular response to NPK was largely blocked by ( $\pm$ )-CP-96345 and RP-67580, that to SP was reduced by 40-50%. This treatment had no effect on the cardiovascular response to NKA and [MePhe<sup>7</sup>]NKB. Conversely, SR-48968 reduced by 40-50% the NKA-induced cardiovascular changes without affecting the central mediated effects of NPK, SP and [MePhe<sup>7</sup>]NKB. However, when coadministered, RP-67580 and SR-48968 abolished the effects to SP and NKA while leaving untouched those induced by [MePhe<sup>7</sup>]NKB. Finally, the central effects mediated by [MePhe<sup>7</sup>]NKB, senktide and NKB were blocked by R-486. These findings suggest that the i.t. action of tachykinins on the rat cardiovascular system is mediated by a NK-1 receptor in the spinal cord, while NK-1, NK-2, and NK-3 receptors are likely involved in the supraspinal (hypothalamus) effects of these neuropeptides. It is also concluded that NPK is a pure and powerful NK-1 agonist, in contrast to SP and NKA, which are not selective for NK-1 or NK-2 receptors, respectively.

Keywords: Tachykinins, spinal cord, central cardiovascular control, tachykinin receptor antagonists.

### Résumé

Cette étude est une revue sur la caractérisation pharmacologique des récepteurs des tachykinines impliqués dans le contrôle spinal et supraspinal de l'activité cardiovasculaire. Chez le rat éveillé, les effets de la substance P (SP), de la neurokinine A (NKA), de la neurokinine B (NKB), du neuropeptide K (NPK) et du neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) ont été mesurés sur la pression artérielle moyenne (PAM) et la fréquence cardiaque (FC), après injection intrathécale (i.t.) ou intracérébroventriculaire (i.c.v.). De plus, des antagonistes sélectifs pour les récepteurs NK-1 (( $\pm$ )-CP-96345 et RP-67580), NK-2 (SR-48968) et NK-3 (R-486) ont été testés contre les agonistes. Par voie i.t., les tachykinines ont causé des augmentations dose-dépendante de la PAM et de la FC (NPK > NP $\gamma$  > SP > NKA > NKB). Cette réponse cardiovasculaire à la SP, au NPK ou au NP $\gamma$  était significativement réduite par une pré-administration i.t. de ( $\pm$ ) CP-96345 ou de RP-67580 mais non par SR-48968 ou R-486. Par ailleurs, l'injection i.c.v. de tachykinines a aussi produit des augmentations dose-dépendante de PAM et de FC (NPK > NP $\gamma$  > SP > NKA > NKB). Senktide et [MePhe<sup>7</sup>]NKB, deux agonistes sélectifs du récepteur NK-3, étaient légèrement plus puissants que la NKB sur les deux paramètres. Malgré que la réponse cardiovasculaire du NPK était largement bloquée par le ( $\pm$ )-CP-96345 ou le RP-67580, celle de la SP était réduite de 40-50%. Ce traitement n'a cependant pas affecté les effets associés à la NKA ou au [MePhe<sup>7</sup>]NKB. En revanche, SR-48968 a réduit de 40-50% les effets centraux de la NKA sans modifier ceux du NPK, de la SP ou du [MePhe<sup>7</sup>]NKB. La co-injection de SR-48968 et de RP-67580 a complètement aboli les effets de la SP ou de la NKA sans modifier les effets du [MePhe<sup>7</sup>]NKB. Finalement, les effets centraux du [MePhe<sup>7</sup>]NKB, du senktide ou de la NKB ont été bloqués par le R-486. Ces observations suggèrent que l'action i.t. des tachykinines sur le système cardiovasculaire du rat est due à l'activation d'un récepteur NK-1 dans la moelle épinière, tandis que les récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3 seraient impliqués dans les effets supraspinaux (hypothalamus) de ces neuropeptides. Il est

également conclu que le NPK est un puissant agoniste NK-1, contrairement à la SP et à la NKA qui ne sont pas sélectifs pour les récepteurs NK-1 et NK-2, respectivement.

**Mots-clés:** Tachykinines, moelle épinière, régulation cardiovasculaire, antagonistes des tachykinines.

### **Introduction**

A role for tachykinins has been proposed in central cardiovascular regulation both at spinal and supraspinal levels (Unger et al. 1981; 1985; 1988; Helke et al. 1985; Couture et al. 1988; Hasséssian et al. 1988; 1990; Takano et al. 1990; 1993; Itoi et al. 1991; Tschöpe et al. 1992; Pham et al. 1993; Picard et al. 1994; Prat et al. 1994). Neuroanatomical and neuropharmacological studies in rats suggest that substance P (SP) is an excitatory transmitter in bulbospinal fibers projecting to neurons in the intermediolateral (IML) cell column of the thoracolumbar spinal cord, which is the site of origin of sympathetic preganglionic neurons (Fig. 1). A synaptic contact has been demonstrated between boutons immunoreactive for SP and the cell bodies or proximal dendrites of neurons in the IML cell column (Poulat et al. 1992), including sympathoadrenal neurons (Bacon and Smith 1988). Bulbospinal SP-containing fibers (associated with other mediators) originate in the ventrolateral medulla (Helke et al. 1982; 1985) and the caudal raphe nuclei, where SP is colocalized with 5-hydroxytryptamine, thyrotropin-releasing hormone and neurokinin A (NKA) (Hökfelt et al. 1978; Chan-Palay 1979; Sasek et al. 1990; Nevin et al. 1994). In addition, SP is present in intraspinal fibers (Davis et al. 1984) as well as in a subpopulation of capsaicin-sensitive primary sensory C-fibers, where it coexists with several mediators and neuropeptides, including glutamate, calcitonin gene-related peptide (CGRP), galanin, cholecystokinin (CCK), somatostatin, vasoactive intestinal polypeptide (VIP), NKA, and neuropeptide K (NPK) (Hua et al. 1985; 1986; Holzer 1988). NKA, NPK and SP are derived from a common precursor,  $\beta$ -preprotachykinin (Helke et al. 1990). SP and NKA are released in the spinal cord from sensory terminals in response to noxious

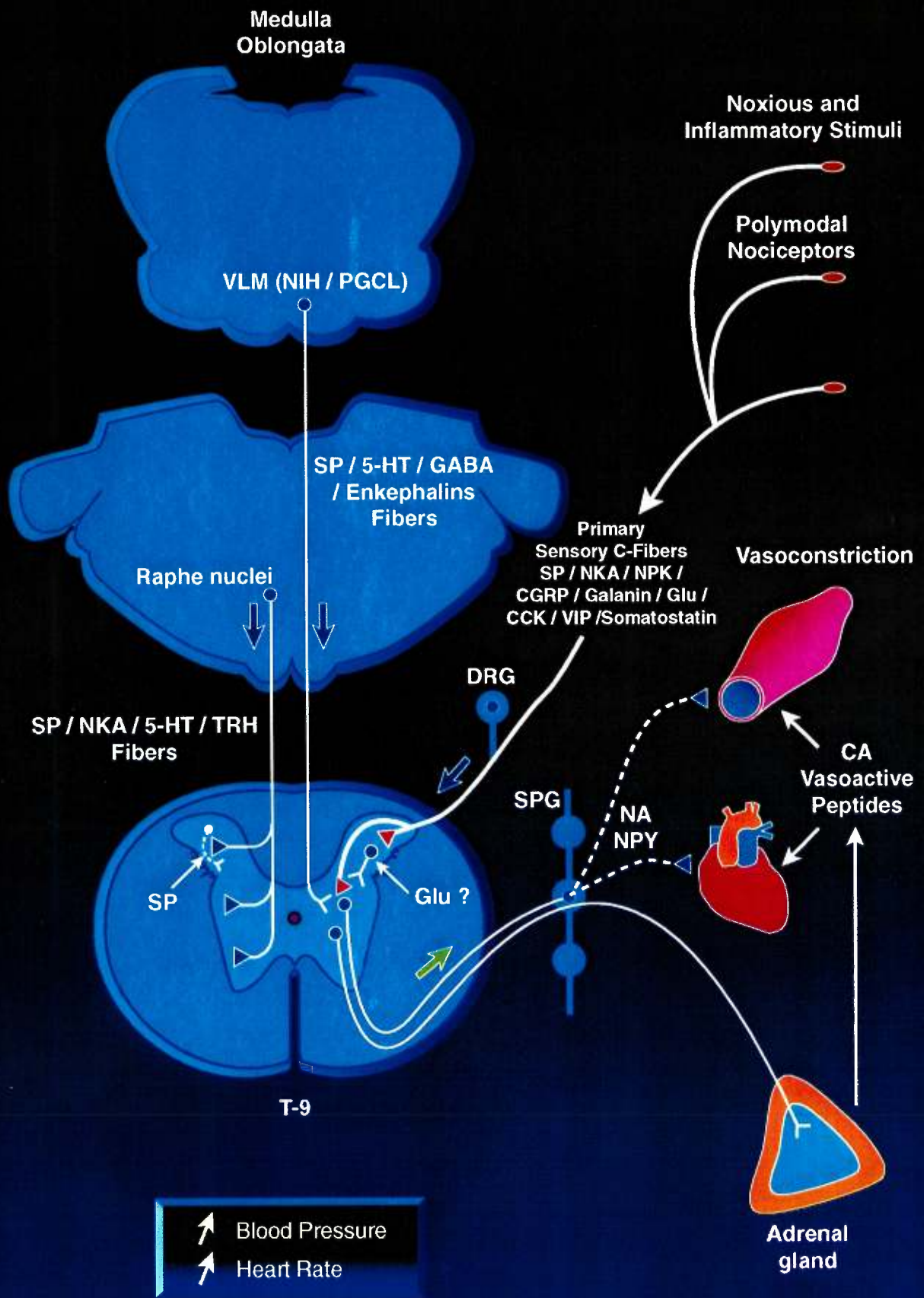


Figure 1. Schematic representation of the putative role played by SP and related tachykinins in spinal cardiovascular regulation. See Introduction for description. VLM, ventrolateral medulla; NIH, nucleus interfascicularis hypoglossi; PGCL, nucleus paragigantocellularis pars lateralis; DRG, dorsal root ganglion; SPG, sympathetic paravertebral ganglionic chain; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; TRH, thyrotropin-releasing hormone; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; NKA, neurokinin A; CGRP, calcitonin gene related peptide; CCK, cholecystokinin; VIP, vasoactive intestinal polypeptide; Glu, glutamate; NA, noradrenaline; NPY, neuropeptide Y; CA, catecholamines; T9, ninth thoracic segment; ↗, increase.

and inflammatory stimuli in the periphery (Duggan et al. 1988; 1990). The iontophoretic application of SP to the IML nucleus excites sympathetic preganglionic neurons in rats (Gilbey et al. 1983) and cats (Backman and Henry 1984) where a high density of SP receptors (NK-1 receptor) are found (Maurin et al. 1984; Takano and Loewy 1985; Buck et al. 1986) as opposed to the lower density of NK-2 and NK-3 receptors (Yashpal et al. 1990a). Finally, the intrathecal (i.t.) administration of SP leads to an increase in blood pressure and heart rate through the peripheral release of catecholamines both in the urethane-anesthetized rat (Yashpal et al. 1985; 1987; Couture et al. 1988) and in the conscious rat (Hasséssian and Couture 1989; Hasséssian et al. 1990).

It is therefore believed that the i.t. injection of tachykinins would mimic the release of SP or related peptides from terminals of bulbospinal, intraspinal, or sensory fibers in the spinal cord. This in turn could lead to increases in blood pressure by peripheral vasoconstriction and tachycardia involving the release of catecholamines and neuropeptide Y from sympathetic postganglionic fibers and the adrenal medulla (Fig. 1).

Furthermore, SP, NKA, neurokinin B (NKB), and their preprotachykinin mRNAs have been found in various regions of the central autonomic network implicated in cardiovascular regulation. The nucleus of the tractus solitarius (nTS) and the ventrolateral medulla contains cardiovagal and vasomotor neurons highly immunoreactive to SP, NKA, and NKB (Phillipu 1988; Nagashima et al. 1989; Van Giersbergen et al. 1992a). These tachykinins and their precursors are present in paraventricular and other hypothalamic nuclei of the rat controlling specific subsets of sympathetic and parasympathetic neurons (Jessop et al. 1990; Marksteiner et al. 1992; Lucas et al. 1992; Larsen et al. 1992; Merchenthaler et al. 1992). While the regional distribution of neuropeptide  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) in the rat central nervous system remains to be studied, NPK was found in various brain areas, including the hypothalamus, the nTS, and the dorsal horn of the spinal cord (Valentino et al. 1986; Diez-Guerra et al. 1989).



The NK-1 and NK-3 receptors have been found in moderate to high density in the rat hypothalamus (Dam et al. 1990a; 1990b; Larsen et al. 1992; Maeno et al. 1993). However, the presence of NK-2 receptors in the rat brain remains controversial (Mantyh et al. 1989; Quirion et al. 1991; Takeda and Krause 1991; Mussap et al. 1993), most likely because these receptors, present in small amount in very discrete areas, cannot be adequately measured with currently available NK-2 receptor radioligands.

Intracerebroventricular (i.c.v.) injection of SP in the rat induced a typical cardiovascular defence reaction characterized by increases in blood pressure, heart rate, cardiac output, sympathetic efferent nerve activity, visceral vasoconstriction, and hindlimb vasodilation (Unger et al. 1981; 1985; 1988). These hemodynamic effects were accompanied by a behavioural arousal reaction, including increased locomotion, scratching, and grooming (Tschöpe et al. 1992). The anterior and ventromedial parts of the hypothalamus may be the site of action of SP, since microinjections of SP into these areas evoked responses similar to those produced by i.c.v. injection of SP (Itoi et al. 1991). I.c.v. injection of NKA also increased blood pressure and heart rate, depending on the activation of the sympathoadrenal system (Takano et al. 1990). In contrast, the pressor response to senktide, an NK-3-selective agonist, was inhibited by pretreatment with a vasopressin  $V_1$  receptor antagonist, and i.c.v. injection of senktide caused an increase in plasma vasopressin level (Takano et al. 1990). Microinjections of senktide into the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus reproduced the responses induced by i.c.v. injection of senktide or NKB on vasopressin release and blood pressure (Takano et al. 1993). These results suggest that the central activation of NK-3 receptors by NKB increases blood pressure mainly via vasopressin release from the hypothalamic-pituitary axis.

This review summarizes the pharmacological evidence supporting a role for tachykinins and their receptors in central cardiovascular regulation. It is hypothesized that the spinal action of tachykinins on the rat cardiovascular system is mediated primarily by the NK-1 receptor, while NK-1, NK-2, and NK-3 receptors subserve the effects of tachykinins at supraspinal level. In these functional studies, the type of receptor was characterized with the use of selective agonists and antagonists, which

were injected either intrathecally (i.t.) or into the right cerebral ventricle (i.c.v.) in the conscious freely moving rat.

## **Materials and methods**

### *Animal model*

Male Wistar rats (Charles River, St. Constant, Que.) weighing 200-250 g (i.t. injections) or 300-350 g (i.c.v. injections) were anesthetized with an intraperitoneal injection of 65 mg/kg sodium pentobarbital (Somnotol; M.T.C. Pharmaceuticals, Mississauga, Ont.). Two catheters were implanted. The first one was introduced through the femoral artery into the descending aorta to monitor blood pressure and heart rate. The second catheter was inserted either into the intrathecal space at the T9 spinal cord level through an incision of the dura at the atlanto-occipital junction or into the right lateral ventricle of the brain, according to methods previously described (Hasséssian et al. 1990; Picard et al. 1994). The intravascular and intrathecal surgery were performed at the same time, while the i.c.v. implantation was made 3 days prior to the intravascular surgery. Experiments were conducted 24 h after the intravascular surgery on conscious unrestrained rats housed individually in their resident plastic cage (40 × 23 × 20 cm). Rats were maintained under a 12 h light : 12 h dark cycle and had free access to food and tap water. The animals were cared for in accordance with the principles and guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA) of the Université de Montréal.

---

### *Measurement of cardiovascular responses*

The arterial blood pressure was monitored through the intraarterial catheter with a Statham pressure transducer (P23ID; Grass instruments Co., Quincy, Mass.) while the heart rate was measured with a cardiac tachometer (model 7P4; Grass instruments Co., Quincy, Mass.) and both signals were registered on a Grass polygraph

(model 79D; Grass Instruments Co., Quincy, Mass.). Experiments started when the rat was in a resting state and basal mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) were stable. The tachykinins and their agonists or antagonists were delivered in a volume of 10  $\mu\text{L}$  (i.t.) or 1  $\mu\text{L}$  (i.c.v.) of artificial cerebrospinal fluid (CSF; composition in mM: NaCl, 128.6; KCl, 2.6;  $\text{MgCl}_2$ , 2.0; and  $\text{CaCl}_2$ , 1.4; pH adjusted to 7.2). The catheter was then flushed with 30  $\mu\text{L}$  (i.t.; void volume of the catheter was 20  $\mu\text{L}$ ) or 4  $\mu\text{L}$  (i.c.v.) of CSF, and the cardiovascular responses were monitored for 30 min. The i.t. and i.c.v. injections plus CSF flush took about 1 min. Control animals were injected with the vehicle only.

### *Experimental protocols*

All experiments reported in this study were done under conditions that did not show any tachyphylaxis of the response. Dose-response curves were produced by i.t. or i.c.v. injection of increasing doses of agonists (SP, NKA, NKB,  $\text{NP}\gamma$ ), except for rats injected i.t. with NPK, which received a single dose. Only one peptide was administered to a rat at intervals of 30-60 min (i.t.) or 24 h (i.c.v.).

Only one antagonist was administered to each animal. The antagonist was injected either 5 min (i.c.v.) or 7-15 min (i.t.) prior to the agonist. The response to the agonist in the presence of the antagonist was compared with that obtained when the agonist was injected alone 24 h (i.c.v.) or 1 h (i.t.) earlier. The intrinsic activity of the antagonists was tested in separate experiments.

### *Compounds*

SP, NKA, NPK, and  $\text{NP}\gamma$  were prepared in CSF, while NKB, ( $\pm$ )-CP-96345, CP-96344, RP-67580, RP-68651, R-486, SR-48968,  $[\text{MePhe}^7]\text{NKB}$ , and senktide were made in dimethyl sulfoxide (DMSO; Fisher, Montréal) and CSF was added to obtain the desired concentration (the final solution contained a maximum of 1-30% DMSO). The stock solutions (1-10 mg/mL) of drugs were divided into 100  $\mu\text{L}$  aliquots and stored at  $-20^\circ\text{C}$

until used. SP, NKA, NKB, NPK, and NP $\gamma$  were purchased from Hükabel Scientific Ltd., Montreal, Qué. ( $\pm$ )-CP-96345 (the racemic mixture of (2S, 3S)- and (2R, 3R)-*cis*-3-(2-methoxybenzylamino)-2-benzhydrylquinuclidine) and CP-96344 (the inactive (2R, 3R)-*cis* enantiomer of CP-96345) were a gift from Dr. B.D. Gitter and Dr. J.J. Howbert at Lilly Research Lab., Ind. RP-67580 (racemic form of 7,7-diphenyl-2[1-imino-2-(2-methoxy-phenyl)-ethyl]perhydroisindol-4-one (3aR, 7aR)) and RP-68651 (the inactive enantiomer of RP-67580) were a gift from Dr. C. Garret, Rhône Poulenc Rorer, Paris, France. SR-48968 ((S)-N-methyl-N[4-(4-acetylamino-4-phenylpiperidino)-2-(3,4-dichlorophenyl)butyl]benzamide) was a gift from Dr. J.-C. Brelière, Sanofi, Montpellier, France. R-486 (H-Asp-Ser-Phe-Trp- $\beta$ -Ala-Leu-Met-NH<sub>2</sub>), [MePhe<sup>7</sup>]NKB (H-Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>), and senktide (succinyl-Asp-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) were synthesized in the laboratory of Dr. D. Regoli at Sherbrooke University, Sherbrooke, Qué.

#### *Statistical analysis of data*

The results are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical differences were evaluated with Student's *t* test for paired or unpaired samples as required. When more than one comparison was made, the significance of differences among groups was evaluated with a one-way analysis of variance (ANOVA) in conjunction with Bonferroni confidence intervals. Only probability values (*p*) smaller than 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

### *Cardiovascular responses to i.t. administered tachykinins*

Dose-response curves to i.t. injection of five natural tachykinins on MAP and HR are depicted in Fig. 2. The HR was increased dose dependently by the five peptides with the rank order of potency  $\text{NPK} > \text{NP}\gamma > \text{SP} > \text{NKA} > \text{NKB}$ . Similarly, NPK was the most potent agonist on MAP, followed by  $\text{NP}\gamma$  and SP; NKA and NKB being the weakest agonists. The dose-response curves on MAP elicited by NPK and SP, but not by  $\text{NP}\gamma$ , exhibited parallelism. While 3.25 nmol NPK and 65 nmol SP increased MAP by about 40 mmHg (1 mmHg = 133.3 Pa), the maximal increase achieved with 7.8 and 78 nmol  $\text{NP}\gamma$  was 20-25 mmHg.

### *Effects of neurokinin antagonists against i.t. tachykinins*

Selective antagonists for the NK-1 (( $\pm$ )-CP-96345, RP-67580), NK-2 (SR-48968), and NK-3 (R-486) receptors were injected intrathecally and tested against the cardiovascular changes elicited by 6.5 nmol SP, 3.25 nmol NPK or 0.78 nmol  $\text{NP}\gamma$ . When given intrathecally, 15 min prior to the agonist, ( $\pm$ )-CP-96345 and RP-67580 (6.5 and 65 nmol) significantly reduced the maximal pressor and tachycardiac responses produced by SP,  $\text{NP}\gamma$ , and NPK. On the other hand, neither SR-48968 (65 nmol) nor R-486 (65 nmol) modified the cardiovascular response to SP or  $\text{NP}\gamma$  (Fig. 3).

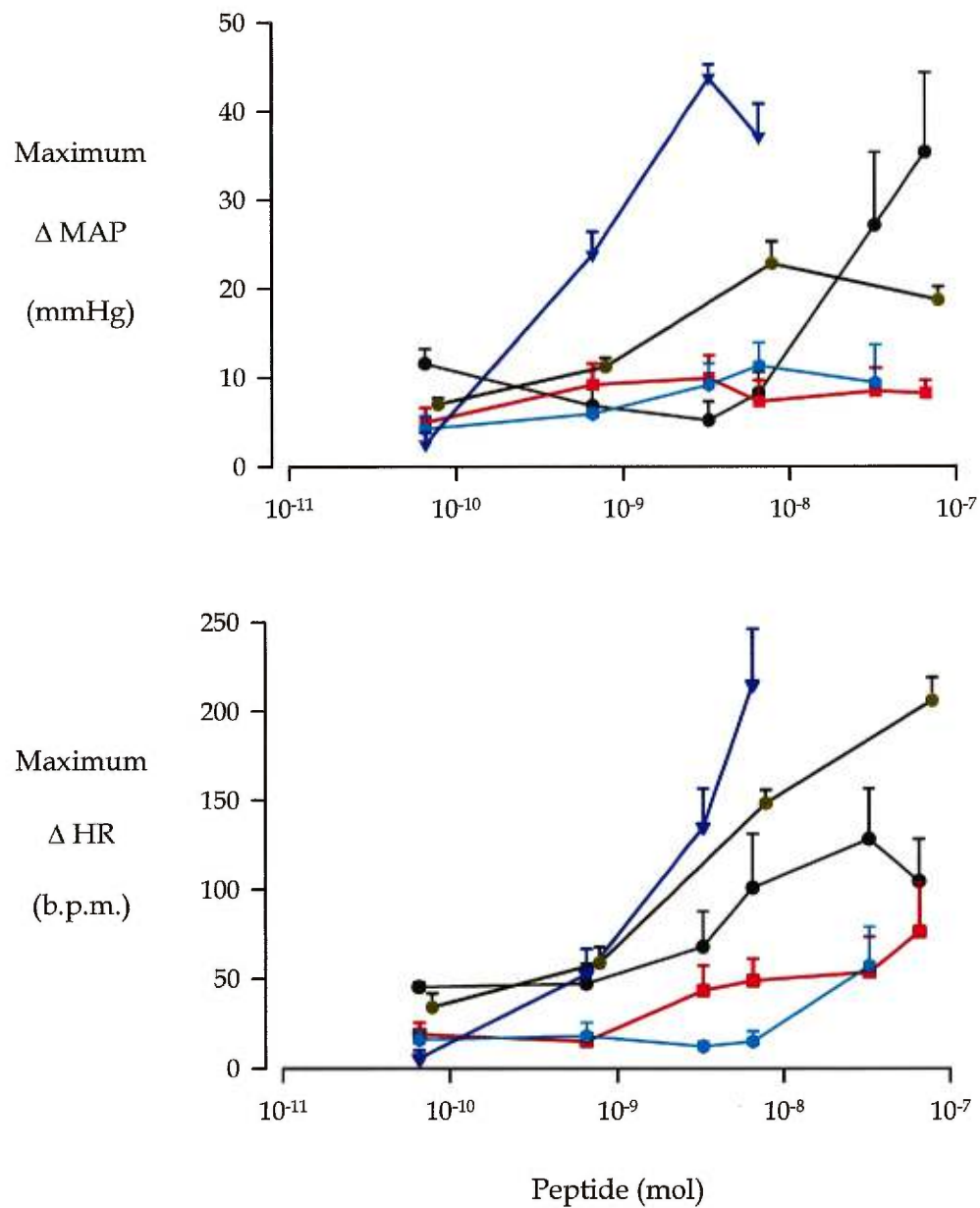
### *Cardiovascular responses to i.c.v. administered tachykinins*

The maximal changes in MAP and HR induced by the i.c.v. injection of several doses of SP, NKA, NKB, NPK,  $\text{NP}\gamma$ , and two NK-3 receptor selective agonists ( $[\text{MePhe}^7]\text{NKB}$  and senktide) are depicted in Fig. 4. All agonists were active, and increased MAP and HR with the following rank order of potency:  $\text{NPK} > \text{NP}\gamma > \text{SP} > \text{NKA} > \text{senktide} = [\text{MePhe}^7]\text{NKB} > \text{NKB}$ .

*Effects of neurokinin antagonists against i.c.v. tachykinins*

The increases in MAP and HR induced by 25 pmol SP, NKA, NKB, NPK, [MePhe<sup>7</sup>]NKB, and senktide were measured in the presence of selective antagonists for each neurokinin receptors (Fig. 5). The i.c.v. administration of 6.5 nmol of (±)-CP-96345 and RP-67580 significantly reduced the SP- and NPK-induced cardiovascular changes. However, the same treatment failed to modify the pressor and tachycardiac responses induced by NKA and [MePhe<sup>7</sup>]NKB. The prior i.c.v. administration of 6.5 nmol SR-48968, significantly reduced the cardiovascular response to NKA, while that to NPK, SP, and [MePhe<sup>7</sup>]NKB remained untouched. The coadministration of RP-67580 and SR-48968 (6.5 nmol each) completely abolished the MAP and HR increases induced by SP and NKA but had no effect against the central response to [MePhe<sup>7</sup>]NKB. Whereas 6.5 nmol R-486 had no significant effect against the central cardiovascular effects induced by SP, NKA, and NPK, this NK-3 receptor antagonist significantly attenuated the central effects mediated by NKB, [MePhe<sup>7</sup>]NKB, and senktide.

In the control experiments, the enantiomers of CP-96345 (CP-96344) and RP-67580 (RP-68651) were found inactive against the cardiovascular effects induced by i.c.v. injection of 25 pmol SP (Fig. 6).

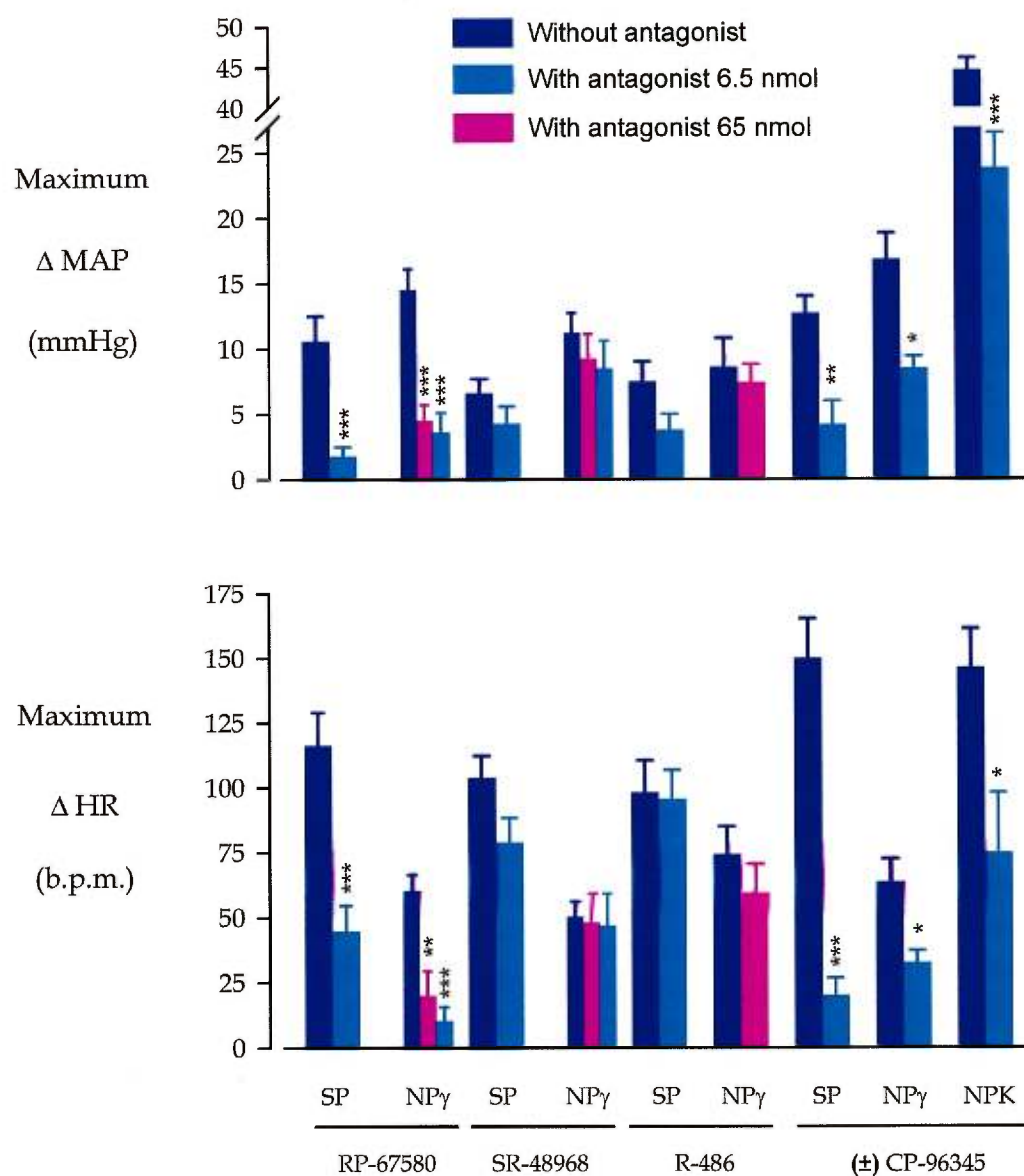


**Figure 2.** Dose-response curves showing the maximum increase in mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) produced by i.t. administration of substance P (●), neurokinin A (■), neurokinin B (●), neuropeptide  $\gamma$  (●) or neuropeptide K (▼) in the conscious rat.

Figure 2. Dose-response curves showing the maximum increase in MAP and HR induced by i.t. injection of SP, NKA, NKB, NPY, and NPK in the conscious rat. The maximum increase for MAP (mmHg) and HR (beats/min) was measured 4-7 and 1-3 min after the injection of agonist, respectively. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of six to eight rats for each peptide. (Results with SP, NKA, NKB and NPK were adapted from Hasséssian et al. (1988) and Pham and Couture (1993)).

---

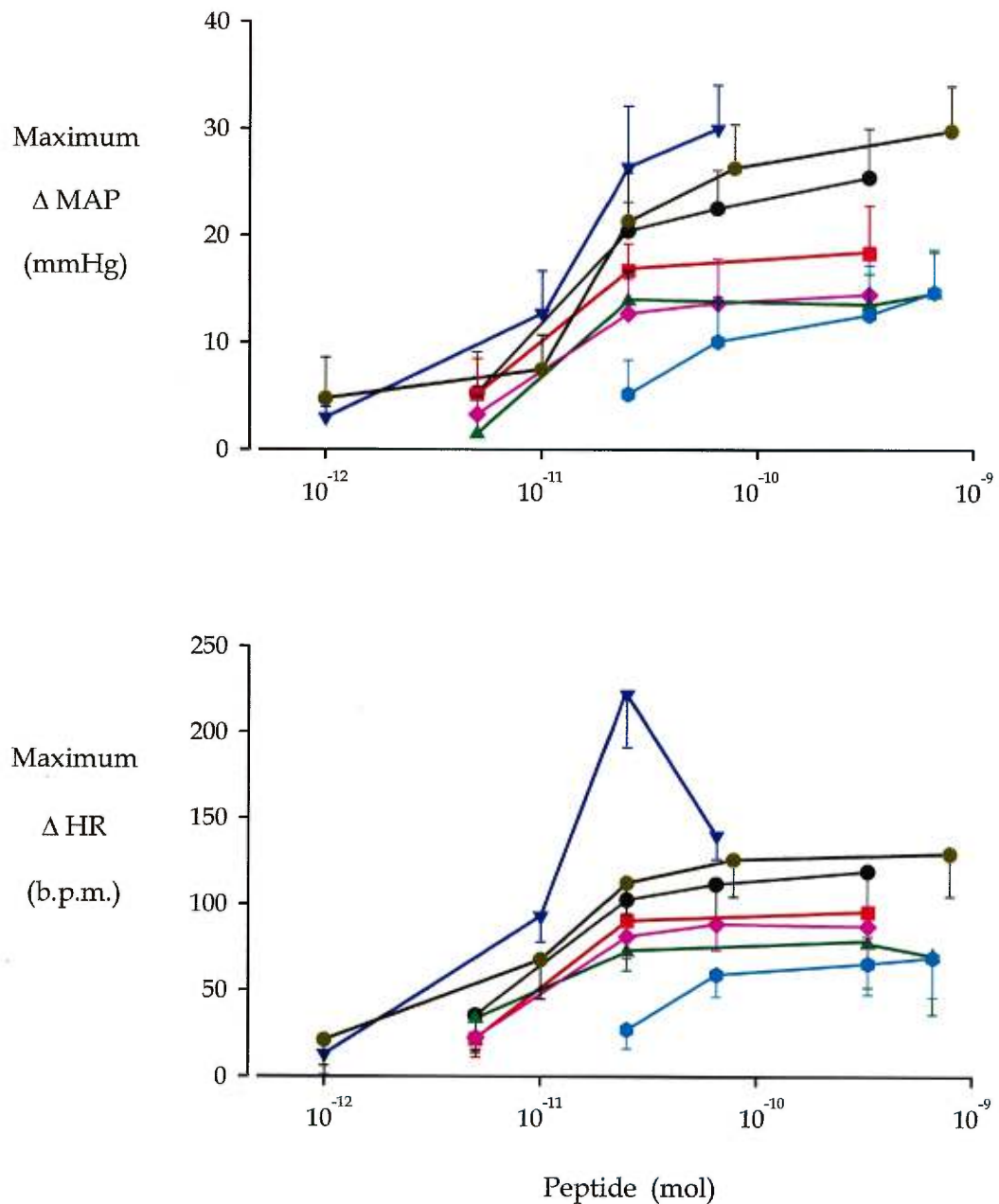




**Figure 3.** Effects of selective tachykinin receptor antagonists on maximal changes in mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) elicited by the i.t. injection of 6.5 nmol substance P (SP), 0.78 nmol neuropeptide  $\gamma$  ( $NP\gamma$ ) or 3.25 nmol neuropeptide K (NPK) in the conscious rat.

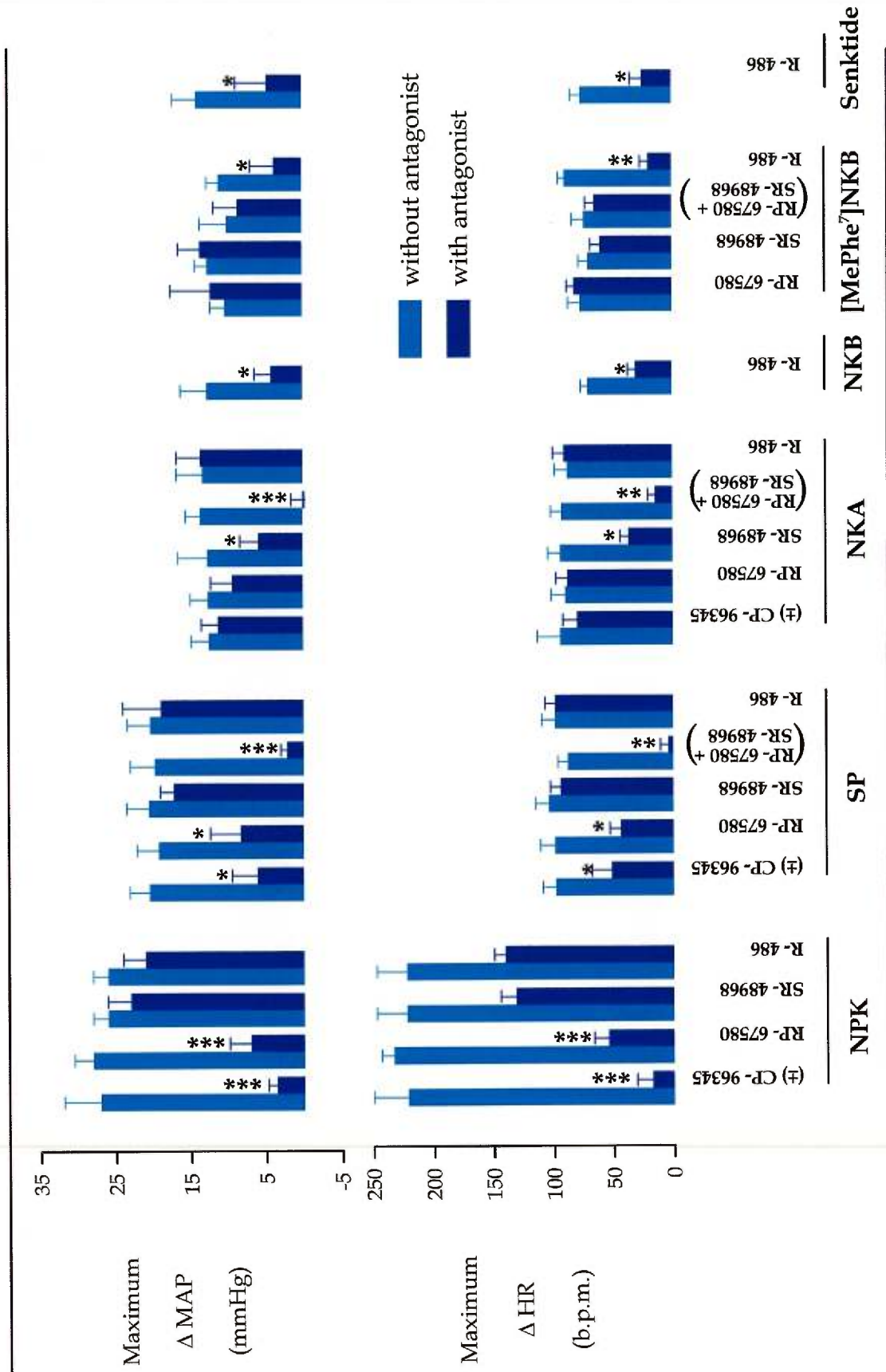
Figure 3. Effects of selective tachykinin receptor antagonists on maximal changes in MAP and HR elicited by the i.t. injection of 6.5 nmol SP, 0.78 nmol NPY, and 3.25 nmol NPK in the conscious rat. Values represent the means  $\pm$  SEM of six to eight rats. The antagonists were injected i.t. at the dose of 6.5 or 65 nmol, 15 or 7 min (RP-67580) prior to the agonist. Statistical comparison with results for the agonist without antagonist are indicated by \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; and \*\*\* $p < 0.001$ . All agonists produced significant ( $p < 0.01$ ) cardiovascular changes when compared with CSF values. (Results with NPK were obtained from Pham and Couture (1993)).

---



**Figure 4.** Dose-response curves showing the maximum increase in mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) produced by i.c.v. administration of substance P (●), neurokinin A (■), neurokinin B (●), neuropeptide  $\gamma$  (●), neuropeptide K (▼), senktide (◆) or [MePhe<sup>7</sup>]NKB (▲) in the conscious rat.

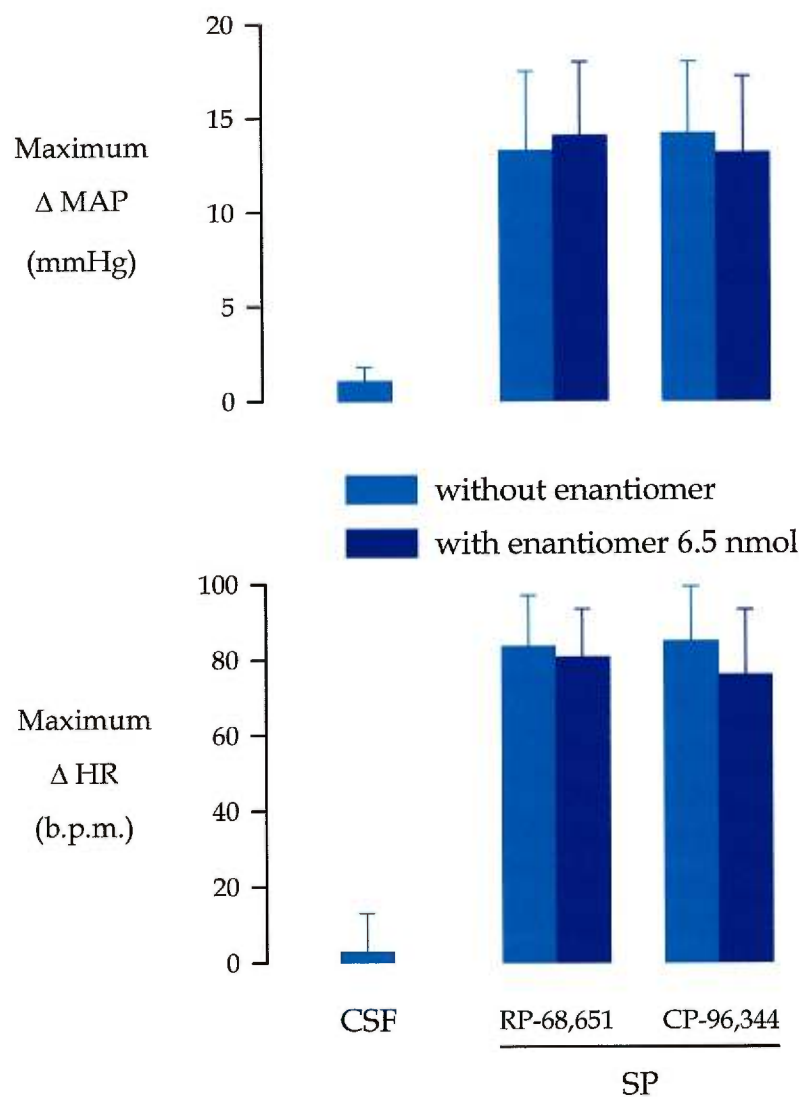
Figure 4. Dose-response curves showing the maximum increase in MAP and HR produced by i.c.v. administration of SP, NKA, NKB, NPY, NPK, senktide, and [MePhe<sup>7</sup>]-NKB in the conscious rat. The maximum increase for MAP (mmHg) and HR (beats/min) was measured within 3-5 min after injection. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of six to eight rats. (Results from SP, NKA, NKB, and NPK were adapted from Picard et al. (1994) and Prat et al. (1994)).



**Figure 5.** Effects of selective tachykinin receptor antagonists on maximal changes in mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol of agonists in the conscious rat.

Figure 5. Effects of selective tachykinin receptor antagonists on maximal changes in MAP and HR elicited by the i.c.v. injection of 25 pmol of agonists in the conscious rat. Values represent the means  $\pm$  SEM of six to eight rats. The antagonists were injected i.c.v. at the dose of 6.5 nmol, 5 min prior to the agonist. Statistical comparison with results for the agonist without antagonist are indicated by \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; and \*\*\*  $p < 0.001$ . All agonists produced significant ( $p < 0.001$ ) cardiovascular changes when compared with CSF values. (Results with SP, NKA, [MePhe<sup>7</sup>]NKB, and NPK were adapted from Picard et al. (1994) and Prat et al. (1994)).

---



**Figure 6.** Effects of the inactive enantiomers CP-96,344 and RP-68,651 on maximal changes in mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) elicited by i.c.v. injection of 25 pmol substance P (SP) in the conscious rat. Values represent the means  $\pm$  s.e. mean of 7 rats. The compounds were injected i.c.v. at the dose of 6.5 nmol, 5 min prior to SP. No statistical difference was obtained on the SP response in the presence and absence of either enantiomers.

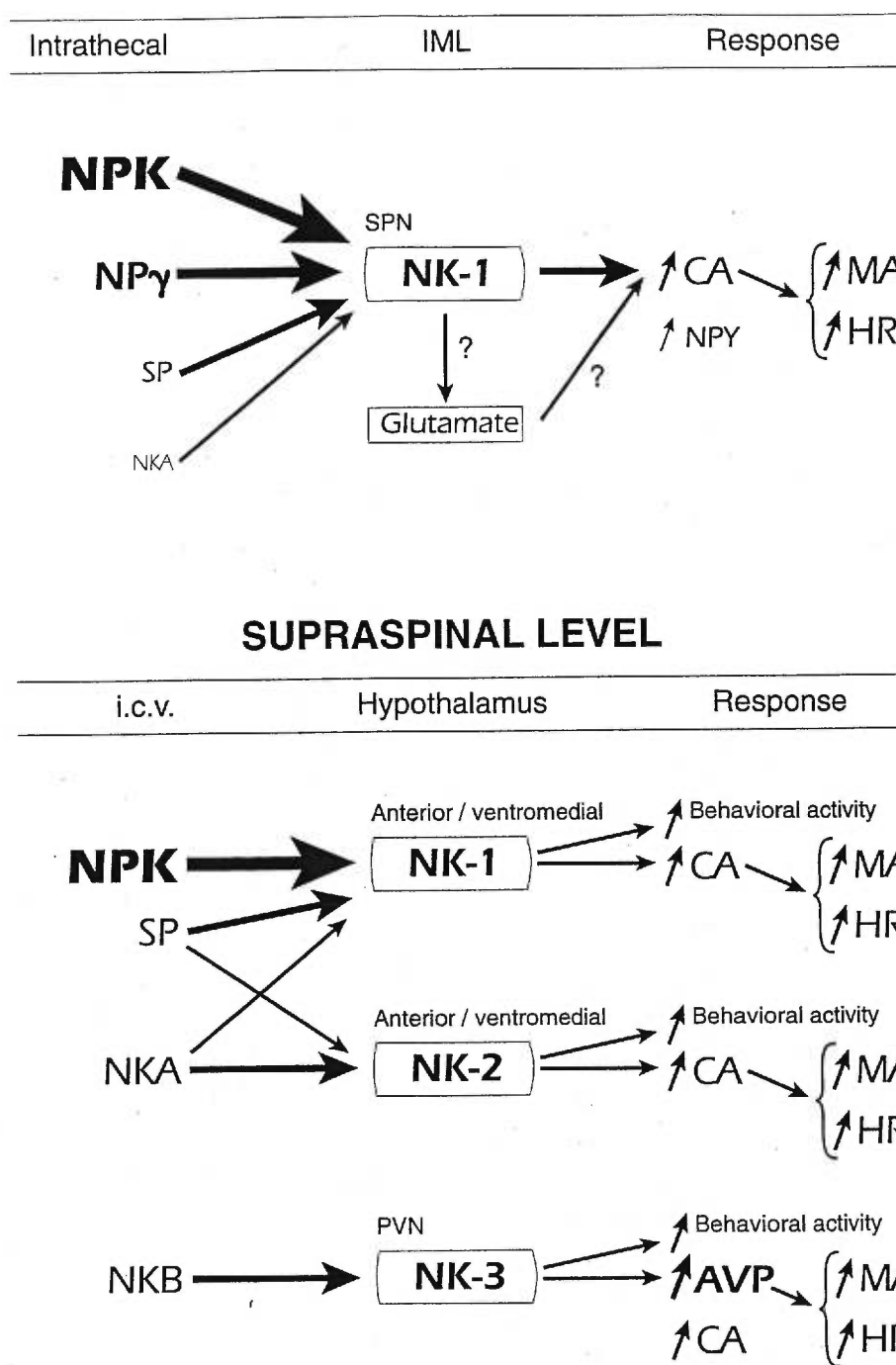


Figure 7. Summary of the putative role of tachykinin receptors in spinal and supraspinal cardiovascular regulation.  
 Abbreviations: IML, intermediolateral cell column; SPN, sympathetic preganglionic neurons; PVN, paraventricular nucleus; CA, catecholamines; AVP, vasopressin; NPY, neuropeptide Y; ↗, increase.



## Discussion

### *Spinal action of tachykinins*

In the conscious freely moving rat, the cardiovascular effects of i.t. administered tachykinins are likely mediated by the activation of a NK-1 receptor in the spinal cord on the basis of the following considerations. (i) The cardiovascular changes induced by the most potent endogenous agonists (NP $\gamma$ , NPK, and SP) were blocked by two NK-1 receptor selective antagonists, namely ( $\pm$ )-CP-96345 (Snider et al. 1991; Rouissi et al. 1991) and RP-67580 (Garret et al. 1992; Carruette et al. 1992; Rouissi et al. 1993). However, the effects of tachykinins were unaffected by SR-48968 and R-486, selective antagonists for the NK-2 (Advenier et al. 1992; Emonds-Alt et al. 1992) and NK-3 (Drapeau et al. 1990; Regoli et al. 1991) receptor, respectively. (ii) The NK-1-selective agonists, [Pro<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP and [ $\beta$ -Ala<sup>4</sup>, Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP(4-11), produced pressor and tachycardiac responses equal to, or greater in intensity than SP, while the NK-2-selective agonist [Nle<sup>10</sup>]NKA(4-10) and the NK-3-selective agonist senktide produced neither a cardiac nor pressor response (Hasséssian et al. 1988). (iii) SP (6.5 nmol) produced cardiovascular responses markedly greater than an equimolar dose of any of its main SP fragments, SP(4-11), [pGlu<sup>5</sup>]SP(5-11), [pGlu<sup>6</sup>]SP(6-11), SP(7-11), SP(1-4), SP(1-7), and SP(1-9) (Hasséssian et al. 1988). This latter finding also suggests that the cardiovascular effect induced by i.t. SP is not likely due to one of its metabolites or fragments.

Surprisingly, NPK and NP $\gamma$ , which have been considered as NK-2 agonists in several binding and radioligand assays (Beaujouan et al. 1988; Takeda and Krause 1989; Dam et al. 1990c; Van Giersbergen et al. 1992b) were found the most potent tachykinins tested *in vivo* in the present model (both i.t. and i.c.v.). This finding may be related to the greater metabolic stability of NPK and NP $\gamma$  (peptides containing a longer N-terminal amino acid sequence than SP) (Takeda and Krause 1989). It remains possible that these peptides are processed to more active metabolites *in vivo*, which is unlikely under *in vitro* conditions of binding assays, which usually contain peptidase inhibitors. Nevertheless, it is unlikely that the central effects of NPK and NP $\gamma$  are due to their

metabolic transformation into NKA, as the latter peptide is less potent than NPK and  $\text{NP}\gamma$  in increasing MAP and HR and also because the central effects of NKA (i.c.v.) were blocked by NK-2-selective antagonists.

Although autoradiographic studies have shown the presence of NK-1 receptors in the IML nucleus, the area of autonomic regulation (Charlton and Helke 1985; Yashpal et al. 1990a), it has been reported that the cardiovascular changes induced by i.t. SP are prevented by a prior i.t. treatment with an NMDA receptor antagonist in urethane-anesthetized rats (Yashpal et al. 1990b). Thus, one cannot exclude the participation of other transmitters or intrinsic-bulbospinal neurons in the spinal action of tachykinins. With respect to the possible involvement of a supraspinal component in the i.t. action of SP, a transection of the spinal cord at the C3-C4 vertebral level prevented the cardiac but not the pressor response to SP in the awakened rat (Hasséssian and Couture 1989). Moreover, the pressor response to i.t. SP appears to be reduced or modulated by a vasodepressor component, which can be revealed following pretreatment with i.v. phentolamine ( $\alpha$ -adrenoceptor antagonist), by chemical sympathectomy with 6-hydroxydopamine, or in rats anesthetized with pentobarbital (Couture et al. 1988; Hasséssian and Couture 1989; Hasséssian et al. 1990). At the highest doses,  $\text{NP}\gamma$  injection displayed a transient vasodepressor response, which blunted the subsequent pressor response. This may explain the lack of parallelism between NPK and  $\text{NP}\gamma$  in the dose-response curves, since no vasodepressor response occurred after i.t. injection of NPK (Pham et al. 1993). Although the exact mechanism responsible for the i.t. vasodepressor response to SP and  $\text{NP}\gamma$  remains to be elucidated, this component was found insensitive to antagonists of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic, cholinergic, histaminergic, serotonergic, and opioid receptors and remained after bilateral adrenalectomy (Couture et al. 1988).

---

The peripheral mechanism underlying the pressor and tachycardiac responses to i.t. tachykinins was investigated in conscious rats in our laboratory (Hasséssian et al. 1990; Pham et al. 1993). The cardiovascular response (intensity and duration) to NPK and SP (T9 level) was correlated with the increases in plasma levels of noradrenaline, adrenaline, and neuropeptide Y and was significantly reduced by peripheral  $\alpha$ - and  $\beta$ -

adrenoceptors blockade. Again, NPK was found more potent than SP in stimulating the sympathoadrenal system upon i.t. administration. Moreover, there appears from those studies that sympathetic fibers play a greater role than the adrenal medulla in the cardiovascular responses to NPK and SP.

#### *Supraspinal action of tachykinins*

In contrast to the spinal cardiovascular action of tachykinins, which appears to derive essentially from a NK-1 receptor, the three neurokinin receptors, namely NK-1, NK-2, and NK-3, seem to be involved in the supraspinal effects of these peptides in the conscious rat. This statement is based on the following observations: (i) All the natural tachykinin agonists produced increases in MAP and HR upon i.c.v. administration. (ii) The selective antagonists for the NK-1 ((±)-CP-96345, RP-67580), NK-2 (SR-48968), and NK-3 (R-486) receptors blocked, in a selective manner, the central effects of the natural or selective agonists for these receptors (SP and NPK for NK-1, NKA for NK-2 and NKB, [MePhe<sup>7</sup>]NKB and senktide for NK-3).

It is interesting to note that the i.c.v. effects of SP and NKA were partly (40-50%) inhibited in the presence of NK-1- and NK-2-selective antagonists, respectively. However, the SP- and NKA-induced cardiovascular changes were completely blocked when both antagonists were coadministered. These results suggest that SP can activate NK-2 receptors during NK-1 receptor blockade, unmasking the nonselectivity of the natural peptide SP. Vice versa, NKA seems to primarily activate NK-2 receptors, but also the NK-1 receptor during NK-2 receptor blockade, revealing the non-selectivity of NKA for the NK-2 receptor. The NK-2 receptor activated by NKA may be similar to the NK-2b receptor subtype described by Maggi et al. (1990), since the central effects of NKA were sensitive to the NK-2b receptor selective antagonist R-396 (Ac-Leu-Asp-Gln-Trp-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>), but not to the NK-2a receptor selective antagonist MEN 10376 ([Tyr<sup>5</sup>,D-Trp<sup>6,8,9</sup>, Lys<sup>10</sup>]NKA(4-10) (Tschöpe et al. 1992).

Because the effects of i.c.v. NPK were reduced more substantially (80-90%) than those of SP (50%) by ( $\pm$ )-CP-96345 and RP-67580, we concluded that NPK is a better NK-1 receptor agonist than SP in the rat central nervous system (Prat et al. 1994).

In a previous study, we found that ( $\pm$ )-CP-96345 (6.5 nmol) had no significant effect on the cardiovascular changes induced by i.t. injection of bradykinin in the conscious rat (Pham and Couture 1993). Moreover, the inactive enantiomer CP-96344 failed to modify the i.c.v. effects of SP. This evidence suggests that the blockade produced by both i.t. and i.c.v. ( $\pm$ )-CP-96345 is due to a specific action on NK-1 receptors and not to an interaction with L-type calcium channels (Guard et al. 1993). The same statement holds true for RP-67580, as its inactive enantiomer, RP-68651, had no effect on the central action of SP. In addition, when given by the i.c.v. route, the NK-1, NK-2, and NK-3 antagonists blocked the effects of agonists in a selective manner. For instance, ( $\pm$ )-CP-96345 and RP-67580, when injected separately, did not affect the responses to NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB. SR-48968 was also inactive against [MePhe<sup>7</sup>]NKB, NPK and SP as it was the case for R-486 vis-à-vis SP, NPK, and NKA. None of the antagonists tested exhibited toxic actions or intrinsic activity when administered by either route. Hence, it appears that these compounds are reliable tools to characterize tachykinin receptors in central cardiovascular regulation in this species.

## Conclusion

This study provides pharmacological evidence suggesting that the pressor and tachycardiac effects induced by i.t. tachykinins are mediated by NK-1 receptors in the spinal cord (Fig. 7). In that regard, NPK and NP $\gamma$  appear to be the most potent agonists. These two neuropeptides are also the most potent tachykinins when injected intracerebroventricularly in the conscious rat. However, the supraspinal cardiovascular actions of tachykinins point to the existence of a distinct population of functionally active NK-1, NK-2 (NK-2b), and NK-3 receptors in the adult rat brain. It should be kept in mind, however, that those receptors may not be involved in the tonic spinal and supraspinal control of the cardiovascular activity, since the cardiovascular parameters

were not affected by any of the tested tachykinin antagonists under resting conditions. Rather it is postulated that these neuropeptides and receptors can play a putative role in cardiovascular reflex or in situations (physical exercise, nociceptive stimuli and stress) involving the central activation of the sympathoadrenal system.

### Acknowledgment

This study was supported by a grant-in-aid (MT-8925) from the Medical Research Council of Canada (MRCC) to R.Couture. P. Picard and A. Prat hold studentships from the Heart and Stroke Foundation of Canada, P. Poulat is a post-doctoral fellow of the MRCC. The secretarial assistance of Ms. Christiane Laurier and the artwork of Mr. Claude Gauthier are gratefully acknowledged.

### References

- Advenier, C., Rouissi, N., Nguyen, Q.T., Emonds-Alt, X., Brelière, J.-C., Neliat, G., Naline, E. et Regoli, D., Neurokinin A (NK<sub>2</sub>) receptor revisited with SR 48968, a potent non-peptide antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184: 1418-1424, 1992.
- Backman, S.B. et Henry, J.L., Effects of substance P and thyrotropin-releasing hormone on thoracic sympathetic preganglionic neurones of the cat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 62: 248-251, 1984.
- Bacon, S.J. et Smith, A.D., Preganglionic sympathetic neurones innervating the rat adrenal medulla: immunocytochemical evidence of synaptic input from nerve terminals containing substance P, GABA or 5-hydroxytryptamine. *J. Auton Nerv Syst.*, 24: 97-122, 1988.
- Beaujouan, J.C., Saffroy, M., Petitet, F., Torrens, Y. et Glowinski, J., Neuropeptide K, scyliorhinin I and II: new tools in the tachykinin receptor field. *Eur. J. Pharmacol.*, 151: 353-354, 1988.
- Buck, S.H., Helke, C.J., Burcher, E., Schultz, C.W. et O'Donohue, T.L., Pharmacologic characterization and autoradiographic distribution of binding sites for iodinated tachykinins in the rat central nervous system. *Peptides*, 7(6): 1109-1120, 1986.
- Carruette, A., Moussaoui, S.M., Champion, A., Cottez, D., Goniot, P. et Garret, C., Comparison in different tissue preparations of the in vitro pharmacological profile of RP 67580, a new non-peptide substance P antagonist. *Neuropeptides*, 23: 245-250, 1992.

Chan-Palay, V., Combined immunocytochemistry and autoradiography after in vivo injections of monoclonal antibody to substance P and [<sup>3</sup>H] serotonin: coexistence of two putative transmitters in single raphe cells and fiber plexuses. *Anat. Embryol., (Berl)* 156: 241-254, 1979.

Charlton, C.G. et Helke, C.J., Autoradiographic localization and characterization of spinal cord substance P binding sites: high densities in sensory, autonomic, phrenic and Onuf's motor nuclei. *J. Neurosci.*, 5: 1653-1661, 1985.

Couture, R., Hasséssian, H. et Gupta, A., Studies on the cardiovascular effects produced by the spinal action of substance P in the rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 11: 270-283, 1988.

Dam, T.V., Escher, E. et Quirion, R., Visualization of neurokinin-3 receptor sites in rat brain using the highly selective ligand [<sup>3</sup>H] senktide. *Brain Res.*, 506: 175-179, 1990a.

Dam, T.V., Martinelli, B. et Quirion, R., Autoradiographic distribution of brain neurokinin-1/substance P receptors using a highly selective ligand [<sup>3</sup>H]-[Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-substance P. *Brain Res.*, 531: 333-337, 1990b.

Dam, T.V., Takeda, Y., Krause, J.E., Escher, E. et Quirion, R.,  $\gamma$ -preprotachykinin-(72-92)-peptide amide: an endogenous preprotachykinin I gene-derived peptide that preferentially binds to neurokinin-2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 246-250, 1990c.

Davis, B.M., Krause, J.E., McKelvy, J.F. et Cabot, J.B., Effects of spinal lesions on substance P levels in the rat sympathetic preganglionic cell column: evidence for local spinal regulation. *Neuroscience*, 13: 1311-1326, 1984.

Diez-Guerra, F.J., Veira, J.A.R., Augood, S. et Emson, P.C., Ontogeny of the novel tachykinins neurokinin A, neurokinin B and neuropeptide K in the rat central nervous system. *Regul. Pept.*, 25: 87-97, 1989.

Drapeau, G., Rouissi, N., Nantel, F., Rhaleb, N.-E., Tousignant, C. et Regoli, D., Antagonists for the neurokinin NK-3 receptor evaluated in selective receptor systems. *Regul. Pept.*, 31: 125-135, 1990.

Duggan, A.W., Hendry, I.A., Morton, C.R., Hutchison, W.D. et Zhao, Z.Q., Cutaneous stimuli releasing immunoreactive substance P in the dorsal horn of the cat. *Brain Res.*, 451: 261-263, 1988.

Duggan, A.W., Hope, P.J., Jarrott, B. Schaible, H.-G. et Fleetwood-Walker, S.M., Release, spread and persistence of immunoreactive neurokinin A in the dorsal horn of the cat following noxious cutaneous stimulation. Studies with antibody microprobes. *Neuroscience*, 35: 195-202, 1990.

Emonds-Alt, X., Vilain, P., Goulaouic, P., Proietto, V., Van Broeck, D., Advenier, C., Naline, E., Neliat, G., Le Fur, G. et Brelière, J.C., A potent and selective non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK<sub>2</sub>) receptor. *Life Sci.*, 50: PL101-PL-106, 1992.

Garret, C., Carruette, A., Fardin, V., Moussaoui, S., Peyronel, J.F., Blanchard, J.C. et Laduron, P.M., RP 67580, un antagoniste, non peptidique, puissant et sélectif de la substance P. *CR. Acad. Sci. Paris*, 314: 199-204, 1992.

Gilbey, M.P., McKenna, K.E. et Schramm, L.P., Effects of substance P on sympathetic preganglionic neurones. *Neurosci. Lett.*, 41: 157-159, 1983.

Guard, S., Boyle, S.J., Tang, K.-W., Watling, K.J., McKnight, A.T. et Woodruff, G.N., The interaction of the NK<sub>1</sub> receptor antagonist CP-96,345 with L-type calcium channels and its functional consequences. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 385-391, 1993.

Hasséssian, H., Drapeau, G. et Couture, R., Spinal action of neurokinins producing cardiovascular responses in the conscious freely moving rat: evidence for a NK-1 receptor mechanism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 338: 649-654, 1988.

Hasséssian, H. et Couture, R., Cardiovascular responses induced by intrathecal substance P in the conscious freely moving rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 13: 594-602, 1989.

Hasséssian, H., Couture, R. et de Champlain, J., Sympathoadrenal mechanisms underlying cardiovascular responses to intrathecal substance P in conscious rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 15: 736-744, 1990.

Helke, C.J., Neil, J.J., Massari, V.J. et Loewy, A.D., Substance P neurons project from the ventral medulla to the intermediolateral cell column and ventral horn in the rat. *Brain Res.*, 243: 147-152, 1982.

Helke, C.J., Charlton, C.G. et Keeler, J.R., Bulbospinal substance P and sympathetic regulation of the cardiovascular system: a review. *Peptides*, 6: 69-74, 1985.

Helke, C.J., Krause, J.E., Mantyh, P.W., Couture, R. et Bannon, M.J., Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors et regulatory mechanisms. *FASEB J.*, 4: 1606-1615, 1990.

---

Hökfelt, T., Ljungdahl, A., Steinbusch, H., Verhofstad, A., Nilsson, G., Brodin, E., Pernow, B. et Goldstein, M., Immunohistochemical evidence of substance P-like immunoreactivity in some 5-hydroxytryptamine-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 3: 517-538, 1978.

Holzer, P., Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience*, 24: 739-768, 1988.

Hua, X.-Y., Theodorsson-Norheim, E., Brodin, E., Lundberg, J.M. et Hökfelt, T., Multiple tachykinins (neurokinin A, neuropeptide K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea pig. *Regul. Pept.*, 13: 1-19, 1985.

Hua, X.-Y., Saria, A., Gamse, R., Theodorsson-Norheim, E., Brodin, E. et Lundberg, J.M., Capsaicin induced release of multiple tachykinins (substance P, neurokinin A and eledoisin-like material) from guinea-pig spinal cord and ureter. *Neuroscience*, 19: 313-319, 1986.

Itoi, K., Jost, N., Badoer, E., Tschöpe, C., Culman, J. et Unger, Th., Localisation of the substance P-induced cardiovascular responses in the rat hypothalamus. *Brain Res.*, 558: 123-126, 1991.

Jessop, D.S., Chowdrey, H.S. et Lightman, S.L., Substance P and substance K in the median eminence and paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuropeptides*, 17: 135-140, 1990.

Larsen, P.J., Jessop, D.S., Chowdrey, H.S., Mikkelsen, J.D. et Lightman, S.L., Osmotic regulation of substance P and neurokinin A peptide content and substance P binding sites in distinct hypothalamic nuclei of the rat. *Peptides*, 13: 705-712, 1992.

Lucas, L.R., Hurley, D.L., Krause, J.E. et Harlan, R.E., Localization of the tachykinin neurokinin B precursor peptide in rat brain by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Neuroscience*, 51: 317-345, 1992.

Maeno, H., Kiyama, K. et Tokyama, M., Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. *Mol. Brain Res.*, 18: 43-58, 1993.

Maggi, C.A., Patacchini, R., Giuliani, S., Rovero, P., Dion, S., Regoli, D., Giachetti, A. et Meli, A., Competitive antagonists discriminate between NK<sub>2</sub> tachykinin receptor subtype. *Br. J. Pharmacol.*, 100: 588-592, 1990.

Mantyh, P.W., Gates, T., Mantyh, C.R. et Maggio, J.E., Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. *J. Neurosci.*, 9: 258-279, 1989.

Marksteiner, J., Sperk, G. et Krause, J.E., Distribution of neurons expressing neurokinin B in the rat brain: immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.*, 317: 341-356, 1992.



- Maurin, Y., Buck, S.H., Wamsley, J.K., Burks, T.F. et Yamamura, H., Light microscopic autoradiographic localization of [<sup>3</sup>H]-substance P binding sites in the rat thoracic spinal cord. *Life Sci.*, 34: 1713-1716, 1984.
- Merchenthaler, I., Maderdrut, J.L., O'Harte, F. et Conlon, J.M., Localization of neurokinin B in the central nervous system of the rat. *Peptides*, 13: 815-829, 1992.
- Mussap, C.J., Geraghty, D.P. et Burcher, E. Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. *J. Neurochem.*, 60: 1987-2009, 1993.
- Nagashima, A., Takano, Y., Tateishi, K., Matsuoka, Y., Hamaoka, T. et Kamiya, H.O., Cardiovascular roles of tachykinin peptides in the nucleus tractus solitarii of rats. *Brain Res.*, 487: 392-396, 1989.
- Nevin, K., Zhuo, H. et Helke, C.J., Neurokinin A coexists with substance P and serotonin in ventral medullary spinally projecting neurons of the rat. *Peptides*, 15(6): 1003-1011, 1994.
- Pham, T.M., de Champlain, J. et Couture, R., Cardiovascular and sympathoadrenal responses to intrathecal injection of neuropeptide K in the conscious rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 347: 42-49, 1993.
- Pham, T.M. et Couture, R., Inhibitory action of (±)CP-96,345 on the cardiovascular responses to intrathecal substance P and neuropeptide K in the conscious freely moving rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 347: 34-41, 1993.
- Phillipu, A., Regulation of blood pressure by central neurotransmitters and neuropeptides. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 111: 1-115, 1988.
- Picard, P., Regoli, D. et Couture, R., Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered tachykinins in the rat: characterization of receptors with selective antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, 112: 240-249, 1994.
- Poulat, P., Marlier, L., Rajaofetra, N. et Privat, A., 5-hydroxytryptamine, substance P and thyrotropin-releasing hormone synapses in the intermediolateral cell column of the rat thoracic spinal cord. *Neurosci. Lett.*, 136: 19-22, 1992.
- Prat, A., Picard, P. et Couture, R., Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered neuropeptide K in the rat: receptor characterization. *Br. J. Pharmacol.*, 112: 250-256, 1994.
- Quirion, R., Dam, T.V. et Guard, S., Selective neurokinin receptor radioligands. In: *Substance P and Related Peptides: Cellular and Molecular Physiology*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 632: 137-144, 1991.

Regoli, D., Nantel, F., Tousignant, C., Jukic, D., Rouissi, N., Rhaleb, N.-E., Télémaque, S., Drapeau, G. et D'Orléans-Juste, P., Neurokinin agonists and antagonists. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 623: 170-183, 1991.

Rouissi, N., Gitter, B.D., Waters, D.C., Howbert, J.J., Nixon, J.A. et Regoli, D., Selectivity and specificity of new, non-peptide, quinuclidine antagonists of substance P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176: 894-901, 1991.

Rouissi, N., Claing, A., Nicolau, M., Jukic, D., D'Orléans-Juste, P. et Regoli, D., Substance P (NK-1 receptor) antagonists: in vivo and in vitro activities in rats and guinea pigs. *Life Sci.*, 52: 1141-1147, 1993.

Sasek, C.A., Wessendorf, M.W. et Helke, C.J., Evidence for coexistence of TRH, SP and serotonin in ventral medullary neurons that project to the IML in the rat. *Neuroscience*, 35: 105-119, 1990.

Snider, R.M., Constantine, J.W., Lowe, III, J.A., Longo, K.P., Lebel, W.S., Woody, H.A., Drozda, S.E., Desai, M.C., Virnick, F.J., Spencer, R.W., and Hess, H.-J., A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK<sub>1</sub>) receptor. *Science*, 251: 435-437, 1991.

Takano, Y., and Loewy, A.D., Reduction of [<sup>3</sup>H]-substance P binding in the intermediolateral cell column after sympathectomy. *Brain Res.*, 333: 193-196, 1985.

Takano, Y., Nagashima, A., Hagio, T., Tateishi, K., and Kamiya, H.O., Role of central tachykinin peptides in cardiovascular regulation in rats. *Brain Res.*, 528: 231-237, 1990.

Takano, Y., Nakayama, Y., Matsumoto, T., Saito, R., and Kamiya, H.-O., The mechanism of central pressor actions of tachykinin NK-3 receptor in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Regul. Pept.*, 46: 360-363, 1993.

Takeda, Y. et Krause, J.E., Neuropeptide K potently stimulates salivary gland secretion and potentiates substance P-induced salivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 392-396, 1989.

Takeda, Y. et Krause, J.E., Pharmacological and molecular studies on the diversity of rat tachykinin NK-2 receptor subtypes in rat CNS, duodenum, vas deferens, and urinary bladder. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 632: 479-482, 1991.

Tschöpe, C., Picard, P., Culman, J., Prat, A., Itoi, K., Regoli, D., Unger, Th. et Couture, R., Use of selective antagonists to dissociate the central cardiovascular and behavioural effects of tachykinins on NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 750-755, 1992.

- Unger, Th., Rascher, W., Schuster, C., Pavlovitch, R., Schömig, A., Dietz, R. et Ganten, D., Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II: role of the sympathetic nervous system and vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.*, 71: 33-42 1981.
- Unger, Th., Becker, H., Petty, M., Demmert, G., Schneider, B., Ganten, D. et Lang, R.E., Differential effects of central angiotensin II and substance P on sympathetic nerve activity in conscious rats. *Circ. Res.*, 56: 563-575, 1985.
- Unger, Th., Carolus, S., Demmert, G., Ganten, D., Lang, R.E., Maser-Gluth, C., Steinberg, H. et Veelken, R., Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ. Res.*, 63: 812-820, 1988.
- Valentino, K.L., Tatemoto, K., Hunter, J. et Barchas, J.D., Distribution of neuropeptide K-immunoreactivity in the rat central nervous system. *Peptides*, 7: 1043-1059, 1986.
- Van Giersbergen, P.L.M., Palkovits, M. et De Jong, W., Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. *Physiol. Rev.*, 72: 789-824, 1992a.
- Van Giersbergen, P.L.M., Shatzer, S.A., Burcher, E. et Buck, S.H., Comparison of the effects of neuropeptide K and neuropeptide  $\gamma$  with neurokinin A at NK<sub>2</sub> receptors in the Hamster urinary bladder. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 345: 51-56, 1992b.
- Yashpal, K., Gauthier, S.G. et Henry, J.L., Substance P given intrathecally at the spinal T<sub>9</sub> level increases adrenal output of adrenaline and noradrenaline in the rat. *Neuroscience*, 15: 529-536, 1985.
- Yashpal, K., Gauthier, S.G., Henry, J.L., Substance P given intrathecally at the spinal T<sub>9</sub> level increases arterial pressure and heart rate in the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 18: 93-103, 1987.
- Yashpal, K., Dam, T.V. et Quirion, R., Quantitative autoradiographic distribution of multiple neurokinin binding sites in rat spinal cord. *Brain Res.*, 506: 259-266, 1990a.
- Yashpal, K., Doroudchi, M. et Henry, J.L., NMDA receptor antagonist blocks the cardiovascular responses to intrathecal administration of substance P. *Physiol. Can.*, 21: 218 (abstract), 1990b.

## CHAPITRE 6

# *I*NTERACTION FONCTIONNELLE ENTRE LE LOSARTAN ET LE RECEPTEUR NK-3 CENTRAL DES TACHYKININES CHEZ LE RAT EVEILLE

---

*"Le monde moderne est plein d'hommes qui s'en tiennent aux dogmes si fermement qu'ils ignorent même  
que ce sont des dogmes."*

Gilbert Keith Chesterton, 1874-1936

## Avant-propos au sixième chapitre

Dans des études de liaison, Chrétien et coll. (1994) ont tout récemment démontré une interaction entre l'antagoniste non peptidique du récepteur AT-1 de l'AII, le losartan (DuP 753), ainsi que son métabolite actif, l'EXP-3174, avec le récepteur NK-3 sur des préparations membranaires de cerveau de rat et de cobaye.

A l'instar des tachykinines, l'AII induit des réponses cardiovasculaires et comportementales lorsque administrée par la voie i.c.v. (Bunermann et coll., 1993). De plus, le losartan bloque les augmentations de pression artérielle, de dyspnoée, de libération de vasopressine et d'hormone lutéinisante induites par l'AII (Wong et coll., 1990a; Kirby et coll., 1992; Stephenson et Steele, 1992; Timmermans et coll., 1993; Toney et Porter, 1993a; Grupp et Harding, 1994; Palmer et coll., 1994). Toutefois, l'activité antihypertensive du losartan administré *per os* a été largement attribuée à sa transformation métabolique en EXP-3174 par simple décarboxylation hépatique (Wong et coll., 1990b; Duncia et coll., 1992). Il est aussi important de noter que ces deux antagonistes non peptidiques (losartan et EXP-3174) traversent librement la barrière hémocéphalique et peuvent ainsi agir sur les récepteurs AT-1 centraux même lorsque administrés en périphérie (Fregly et Rowland, 1991; Song et coll., 1991; Li et coll., 1993).

Nous avons voulu, dans ce chapitre, (a) confirmer dans notre modèle *in vivo* chez le rat éveillé cette nouvelle interaction entre les antagonistes du récepteur AT-1 et le récepteur NK-3 central, (b) déterminer si les effets cardiovasculaires et comportementaux induits par l'administration i.c.v. d'AII sont tributaires d'une action sur les récepteurs NK-3 centraux et (c) déterminer le rôle putatif de l'AII dans les effets cardiovasculaires et comportementaux induits par l'injection i.c.v. de SP, NKA et de l'agoniste [MePhe<sup>7</sup>]NKB.

---

### Contribution personnelle à cet article

J'ai effectué toutes les préparations animales, les mesures des réponses cardiovasculaires et comportementales, les protocoles expérimentaux ainsi que

(continué sur la page 233a)

l'analyse et l'interprétation des résultats de cet article. Mme Chrétien a contribué intellectuellement en nous communicant ses résultats de liaison sur le losartan avant la publication de son article. De plus, j'ai participé activement dans la rédaction et la correction de cet article.

---

---

*FUNCTIONAL INTERACTION BETWEEN LOSARTAN AND CENTRAL  
TACHYKININ NK<sub>3</sub> RECEPTORS IN THE CONSCIOUS RAT*

---

Pierre Picard<sup>¶</sup>, Louise Chrétien<sup>†</sup>, et Réjean Couture<sup>¶</sup>

¶ Département de physiologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Groupe de recherche sur le système nerveux autonome, Montréal, Québec, Canada

† Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

## Summary

1. The cardiovascular and behavioural effects elicited by the intracerebroventricular (i.c.v.) injection of substance P (SP), neurokinin A (NKA), [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B ([MePhe<sup>7</sup>]NKB) or angiotensin II (AII) in the conscious rat were assessed before and 5 min after i.c.v. pretreatment with antagonists selective for angiotensin AT<sub>1</sub> (losartan and its active metabolite EXP 3174), angiotensin AT<sub>2</sub> (PD 123,319) or tachykinin NK<sub>3</sub> (R 486) receptors.
2. I.c.v. administration of 25 pmol AII evoked an increase in mean arterial blood pressure (MAP) and water intake behaviour, accompanied by a transient bradycardia, whereas 25 pmol [MePhe<sup>7</sup>]NKB caused a transient increase in MAP and heart rate (HR) concurrently with a marked wet dog shake behaviour. At the same dose, SP and NKA were more potent than [MePhe<sup>7</sup>]NKB in increasing MAP and HR, but did not produce water intake or wet dog shake behaviours.
3. Losartan (650 pmol, i.c.v.) reduced significantly the cardiovascular and behavioural responses to AII or [MePhe<sup>7</sup>]NKB, but not to SP or NKA. While 65 pmol losartan was inactive, 260 pmol inhibited selectively the central effects of AII. Whereas EXP 3174 (6.5 nmol) blocked both AII and [MePhe<sup>7</sup>]NKB-mediated responses, the dose of 650 pmol blocked only the responses to AII.
4. The central responses to AII and [MePhe<sup>7</sup>]NKB were not affected by PD 123,319 (650 pmol). On the other hand, the [MePhe<sup>7</sup>]NKB-induced central effects were significantly reduced by R 486 (650 pmol). The NK<sub>3</sub>-selective antagonist had no effect against AII.
5. This study provides functional evidence, to support earlier binding data, that losartan (and to some extent its active metabolite EXP 3174) interact with the tachykinin NK<sub>3</sub> receptor in rat brain. However, the cardiovascular and behavioural responses induced by central tachykinin agonists (SP, NKA and [MePhe<sup>7</sup>]NKB) and AII are mediated by unrelated mechanisms.



**Key words:** Losartan; angiotensin II; NK<sub>3</sub> receptor; tachykinin; central cardiovascular regulation; behaviour.

## Introduction

The natural mammalian tachykinins substance P (SP), neurokinin A (NKA) and neurokinin B (NKB) are the preferential agonists for the tachykinin NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors, respectively (Helke et al., 1990; Maggi et al., 1993). To date, several non-peptide NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptor antagonists have been described (Garret et al., 1991; Snider et al., 1991; Advenier et al., 1992; Watling, 1992; McLean et al., 1993). However, the search for non-peptide NK<sub>3</sub> receptor antagonists is still in its infancy. Although some NK<sub>3</sub> receptor antagonists exist, they are unstable peptide analogues (Drapeau et al., 1990). Most recently, a stable, non-peptide NK<sub>3</sub> receptor antagonist named SR 142801 has been described (Emonds-Alt et al., 1995). This compound is a potent antagonist of the human and guinea-pig NK<sub>3</sub> receptor while being almost inactive versus the rat NK<sub>3</sub> receptor. Recent binding studies have shown that losartan (DuP 753), a non-peptide angiotensin II (AII) antagonist at the AT<sub>1</sub> receptor, exhibits moderate affinities for the NK<sub>3</sub> receptor present in rat ( $pK_i = 4.8$ ) and guinea-pig ( $pK_i = 5.0$ ) brain membranes (Chrétien et al., 1994).

Tachykinins and AII are known to participate in central cardiovascular, water and electrolyte balance regulation as well as in behavioural activity (Otsuka & Yoshioka, 1993; Bunnemann et al., 1993). I.c.v. administration of senktide, an NK<sub>3</sub> receptor-selective agonist, leads to increases in mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) through vasopressin release (Nagashima et al., 1989; Takano et al., 1990), decreases in water, salt and alcohol intake (Massi et al., 1991; Ciccocioppo et al., 1994), inhibition of gastric acid secretion (Improta & Broccardo, 1991) and induction of wet dog shake behaviour (Itoi et al., 1992). The NK<sub>3</sub> receptor antagonist, [Trp<sup>7</sup>,β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10) (R 486), attenuates significantly and selectively the central cardiovascular and wet dog shake responses to [MePhe<sup>7</sup>]NKB, a selective NK<sub>3</sub> agonist (Picard et al., 1994). On the other hand, losartan blocks i.c.v. AII-mediated increases in

blood pressure and water intake (Wong et al., 1990a; Kirby et al., 1992; Timmermans et al., 1993, Grupp & Harding, 1994), as well as vasopressin and luteinizing hormone secretion (Stephenson & Steele, 1992; Toney & Porter, 1993a; Palmer et al., 1994). The antihypertensive action of orally administered losartan on the AT<sub>1</sub> receptor has been largely attributed to its metabolic transformation into EXP 3174 (Wong et al., 1990b; Duncia et al., 1992). Systemic losartan crosses the blood brain barrier and blocks central AT<sub>1</sub> receptors (Fregly & Rowland, 1991; Song et al., 1991; Li et al., 1993).

The role of central AT<sub>2</sub> receptors remains controversial (Toney & Porter, 1993a, b; Cooney & Fitzsimons, 1993). Although the AT<sub>2</sub> receptor-selective antagonist PD 123,319 had no effect on central AII-mediated responses, combined treatment with losartan and PD 123,319 was more effective in blocking AII-induced pressor effects than losartan alone (Toney & Porter, 1993a, b). Furthermore, pressor responses induced by microinjection of AII into the rat paraventricular nucleus were significantly attenuated following systemic administration of losartan, but were not affected by PD 123,319 (Bains et al., 1992). Thus, the vasopressor effect induced by i.c.v. AII appears to be primarily mediated by the AT<sub>1</sub> receptor, which is supported by autoradiographic studies (Gehlert et al., 1990; Tsutsumi & Saavedra, 1991), and the i.c.v. treatment with AT<sub>1</sub> receptor antisense oligonucleotides (Gyurko et al., 1993; Sakai et al., 1994).

The objective of this study was (a) to confirm *in vivo* that losartan and other antagonists of AII can block the central tachykinin NK<sub>3</sub> receptor, (b) to examine whether or not the central cardiovascular and behavioural effects of AII are mediated by tachykinin NK<sub>3</sub> receptors and (c) to determine the putative role of AII in the central cardiovascular and behavioural effects of SP, NKA and [MePhe<sup>7</sup>]NKB in the conscious rat.

## Methods

### *Animal preparation*

Male Wistar rats (Charles River, St. Constant, Québec, Canada) weighing 300-350 g were used. The animals were allowed free access to food and water and maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on 06 h 00 min -18 h 00 min).

Rats were anaesthetized with intraperitoneal (i.p.) sodium pentobarbitone (65 mg kg<sup>-1</sup>) (Somnotol; M.T.C. Pharmaceuticals, Cambridge, Ont. Canada) before an i.c.v. polyethylene cannula (PE-20; Intramedic, Clay Adams, NJ, U.S.A.) was implanted with a guide into the right lateral brain ventricle by use of a Kopf stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, U.S.A.), and permanently secured to the skull with dental cement (Reliance Dental MFG. Co., Worth, IL, U.S.A.). The stereotaxic coordinates were 1.3 mm lateral to the midline, 0.6 mm caudal to the bregma and 5.0 mm vertical from the skull surface.

The animals were then housed in individual plastic cages (40 cm × 23 cm × 20 cm) for a recovery period of 24 h, after which rats were anaesthetized again before a second cannula (PE-50) was inserted through the left femoral artery into the abdominal aorta for measurement of blood pressure and heart rate. The pre-siliconized intraarterial catheter was filled with physiological saline containing heparin sodium salt (100 i.u. ml<sup>-1</sup>) and passed through a subcutaneous tunnel to emerge at the back of the neck. Experiments were conducted 48 h after the intravascular surgery on conscious, unrestrained rats kept in their resident cages.

### *Measurement of cardiovascular and behavioural responses*

The arterial blood pressure was monitored through the intraarterial catheter with a Statham pressure transducer (P231D) while the HR was measured with a cardiac tachometer (model 7P4) and both variables were registered on a Grass polygraph model 79D (Grass Instruments Co., Quincy, MA, U.S.A.). Experiments started when the animal was in a resting state and basal MAP and HR were stable. Wet dog shake

behaviour was measured according to the number of episodes (less than 1 s each) occurring during the 30 min period of recording. Rats had access to a tap water distributor which allowed the measurement of the total ingested volume (ml) of water for a period of 30 min after i.c.v. injection.

Rats were injected i.c.v. with 25 pmol AII to verify the potency of the i.c.v. cannula. Only those animals which responded with an immediate sharp rise in blood pressure, associated with an intense dipsogenic activity as reported earlier (Kirby et al., 1992), were included in the study. The correct position of the i.c.v. cannula was also verified histologically by post-mortem dissection.

#### *Experimental protocols*

In the first series of experiments, the animals received randomly a single i.c.v. injection of either 25 pmol AII, SP, NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB (1 µl peptide solution flushed with 4 µl of cerebrospinal fluid (CSF; composition in mM: NaCl 128.6, KCl 2.6, MgCl<sub>2</sub> 2.0 and CaCl<sub>2</sub> 1.4; pH adjusted to 7.2)). The cardiovascular and behavioural responses were then measured over a period of 30 min. Control rats received 5 µl CSF only. On the second day, vehicle or one of the four antagonists, losartan (65 pmol, 260 pmol, 650 pmol or 6.5 nmol), EXP 3174 (65 pmol, 650 pmol or 6.5 nmol), PD 123,319 (650 pmol) or R 486 (650 pmol) were randomly administered i.c.v., 5 min prior to 25 pmol AII or [MePhe<sup>7</sup>]NKB. In addition, losartan (650 pmol) was tested against SP (25 pmol) and NKA (25 pmol) to evaluate its selectivity for AT<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptors. Only one antagonist was administered to each animal. On the third day, the test agonist was injected alone again to evaluate the reversibility of any inhibition produced by the antagonist on day 2. No tachyphylaxis to SP, NKA or [MePhe<sup>7</sup>]NKB was seen when each agonist (25 pmol) was injected i.c.v. on three consecutive days (Picard et al., 1994). The intrinsic activity of the antagonists was tested in separate experiments. Baseline MAP and HR values were calculated 1 min before the injection of agonists.

*Peptides and non-peptides*

Losartan (DuP 753 or MK-954; 2-n-butyl-4-chloro-5-hydroxymethyl-1-[(2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl)methyl]imidazole potassium salt) and EXP 3174 (2-n-butyl-4-chloro-1-[(2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl)methyl]imidazole-5-carboxylic acid) were obtained from Dupont (Delaware, U.S.A.). PD 123,319 (1-[4-(dimethylamino)3-methylphenyl]methyl-5-(diphenylacetyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]pyridine-6-carboxylic acid) was obtained from Parke-Davis (Cambridge, England). The compound R 486 (H-Asp-Ser-Phe-Trp- $\beta$ -Ala-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) is a competitive and selective antagonist of the NK<sub>3</sub> receptor with a pA<sub>2</sub> of 7.5 on the rat portal vein (NK<sub>3</sub> receptor preparation; Drapeau et al., 1990). R 486 and [MePhe<sup>7</sup>]NKB (H-Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) were provided by Dr D. Regoli of Sherbrooke University, Sherbrooke, Canada. SP, NKA and AII were purchased from Hükabel Scientific Ltd, Montréal, Canada. Heparin sodium salt Grade II from porcine intestinal mucosa was purchased from Sigma chemicals (St. Louis, MO, U.S.A.). The antagonists and [MePhe<sup>7</sup>]NKB were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO; Fisher) and CSF was added to obtain the desired solution (the final solution contained a maximum of 20% of DMSO). SP, NKA and AII were dissolved directly in CSF. The stock solutions (1-10 mg ml<sup>-1</sup>) of peptides and non-peptides were divided into 100  $\mu$ l aliquots and stored at -20°C until used. Daily dilutions were made in CSF before each experiment.

*Statistical analysis of data*

The results are expressed as mean  $\pm$  s.e.mean. Statistical differences were evaluated with Student's *t* test for paired samples or Wilcoxon-Mann-Whitney (U) test for unpaired samples on non parametric values (behaviour frequency). When more than one comparison was made, the significance of differences among groups was evaluated with a one-way analysis of variance (ANOVA) in conjunction with Bonferroni confidence intervals. Only probability values (*P*) smaller than 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

### *Cardiovascular and behavioural effects induced by SP, NKA, [MePhe<sup>7</sup>]NKB and AII*

On the first experimental day, i.c.v. injections of equimolar doses (25 pmol) of SP, NKA, [MePhe<sup>7</sup>]NKB or AII produced distinct cardiovascular and behavioural responses (Figures 1 and 2). AII was the most potent vasopressor agonist (peak  $\Delta$ MAP =  $23.6 \pm 4.7$  mmHg;  $P < 0.001$  with CSF peak value) the effect of which persisted over 45 min. On the other hand, tachykinins-induced a transient (8-10 min) pressor response when injected i.c.v. with the rank order of potency: SP (peak  $\Delta$ MAP =  $17.6 \pm 3.9$  mmHg;  $P < 0.01$  with CSF peak value) > NKA (peak  $\Delta$ MAP =  $14.8 \pm 4.2$  mmHg;  $P < 0.01$  with CSF peak value) > [MePhe<sup>7</sup>]NKB (peak  $\Delta$ MAP =  $10.4 \pm 4.4$  mmHg;  $P < 0.05$  with CSF peak value) (Figure 1). Whereas central tachykinins evoked transient increases in HR with the rank order of potency: SP (peak  $\Delta$ HR =  $92.3 \pm 19.7$  b.p.m.;  $P < 0.01$  with CSF peak value) > NKA (peak  $\Delta$ HR =  $69.8 \pm 17.5$  b.p.m.;  $P < 0.01$  with CSF peak value) > [MePhe<sup>7</sup>]NKB (peak  $\Delta$ HR =  $50.1 \pm 21.3$  b.p.m.;  $P < 0.01$  with CSF peak value), AII caused a slight bradycardia (peak  $\Delta$ HR =  $-18.7 \pm 15.7$  b.p.m.;  $P < 0.05$  with CSF peak value) which returned to baseline within 10 min. As expected, AII also evoked a marked dipsogenic response ( $15 \text{ ml} \times 30 \text{ min}^{-1}$ ) not shared by the tachykinins, which did not induce thirst when compared to CSF (Figure 2). Whereas NKA and SP did not induce wet dog shake, AII or [MePhe<sup>7</sup>]NKB produced moderate and intense wet dog shake, respectively (Figure 2).

### *Effects of antagonists on the responses to SP, NKA, [MePhe<sup>7</sup>]NKB and AII*

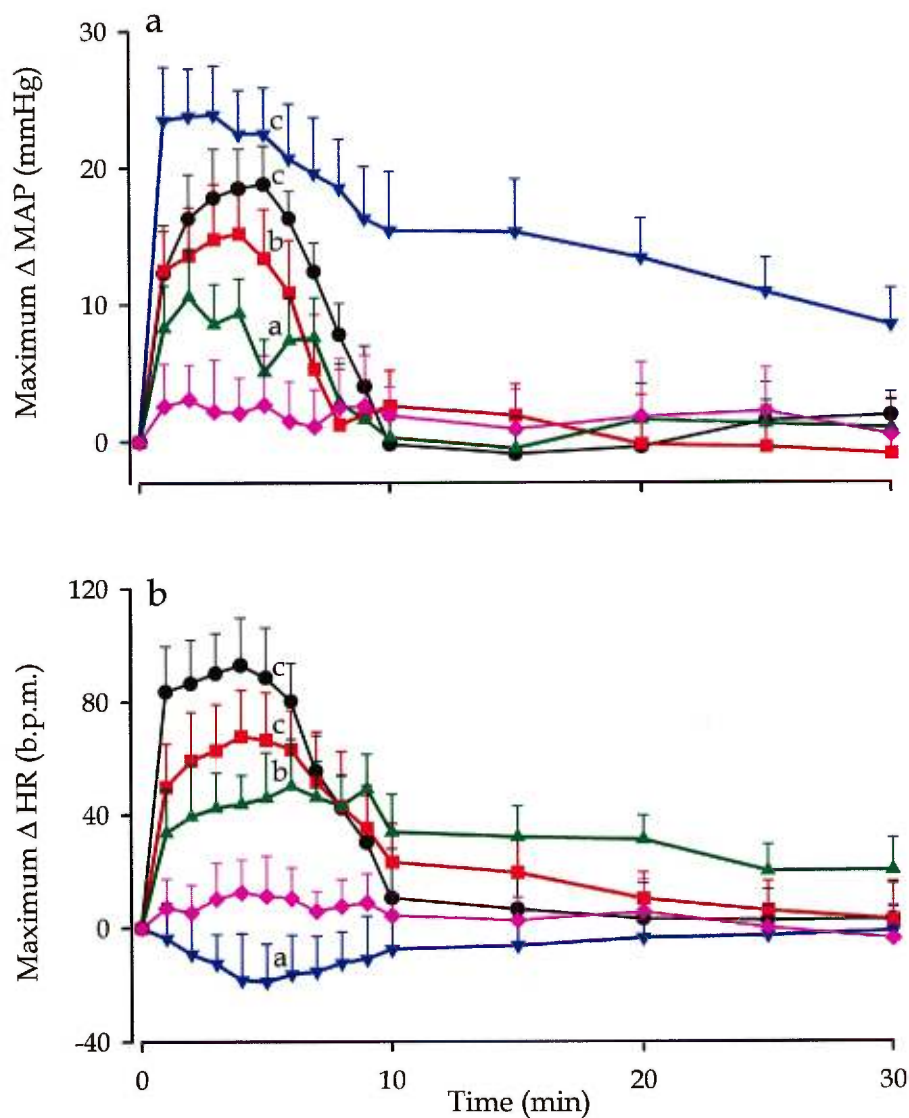
On the second day of experiments, 65 pmol of losartan had no effect on either [MePhe<sup>7</sup>]NKB or AII-mediated responses while 260 pmol of losartan reduced significantly the cardiovascular and drinking responses to AII without affecting the responses to [MePhe<sup>7</sup>]NKB (Figure 2). However, 650 pmol of losartan reduced significantly all responses induced by 25 pmol [MePhe<sup>7</sup>]NKB or AII without affecting those mediated by SP or NKA (Figure 2). All inhibitions produced by losartan were reversible when agonists were tested alone 24 h later (Figure 2). Higher doses of

losartan (6.5 nmol) induced intense episodes of convulsion-like behaviour lasting 1-5 min followed by short resting periods (1-2 min) for 15-30 min in four out of seven rats. At 650 pmol, losartan had no direct effect on any parameters (peak $\Delta$ MAP =  $3.2 \pm 2.8$  mmHg; peak  $\Delta$ HR =  $10.3 \pm 13.8$  b.p.m.; wet dog shake for 30 min =  $12.4 \pm 16.3$  episodes; water intake for 30 min =  $1.1 \pm 0.7$  ml;  $n = 8$ ).

Whereas the central effects of [MePhe<sup>7</sup>]NKB remained unaffected with 65 and 650 pmol EXP 3174, the cardiovascular response was significantly reduced by 6.5 nmol (Figure 3). Pretreatment with 65 pmol EXP 3174 reduced the AII-induced water intake while 650 pmol or 6.5 nmol blocked significantly all the AII-induced effects (Figure 3). The inhibitions were no longer observed when AII or [MePhe<sup>7</sup>]NKB was tested alone on day 3. When injected alone, EXP 3174 (650 pmol or 6.5 nmol) showed no intrinsic activity (6.5 nmol: peak $\Delta$ MAP =  $2.9 \pm 2.5$  mmHg; peak $\Delta$ HR =  $13.9 \pm 12.8$  b.p.m.; wet dog shake for 30 min =  $9.7 \pm 10.5$  episodes; water intake for 30 min =  $0.8 \pm 0.4$  ml;  $n = 6$ ).

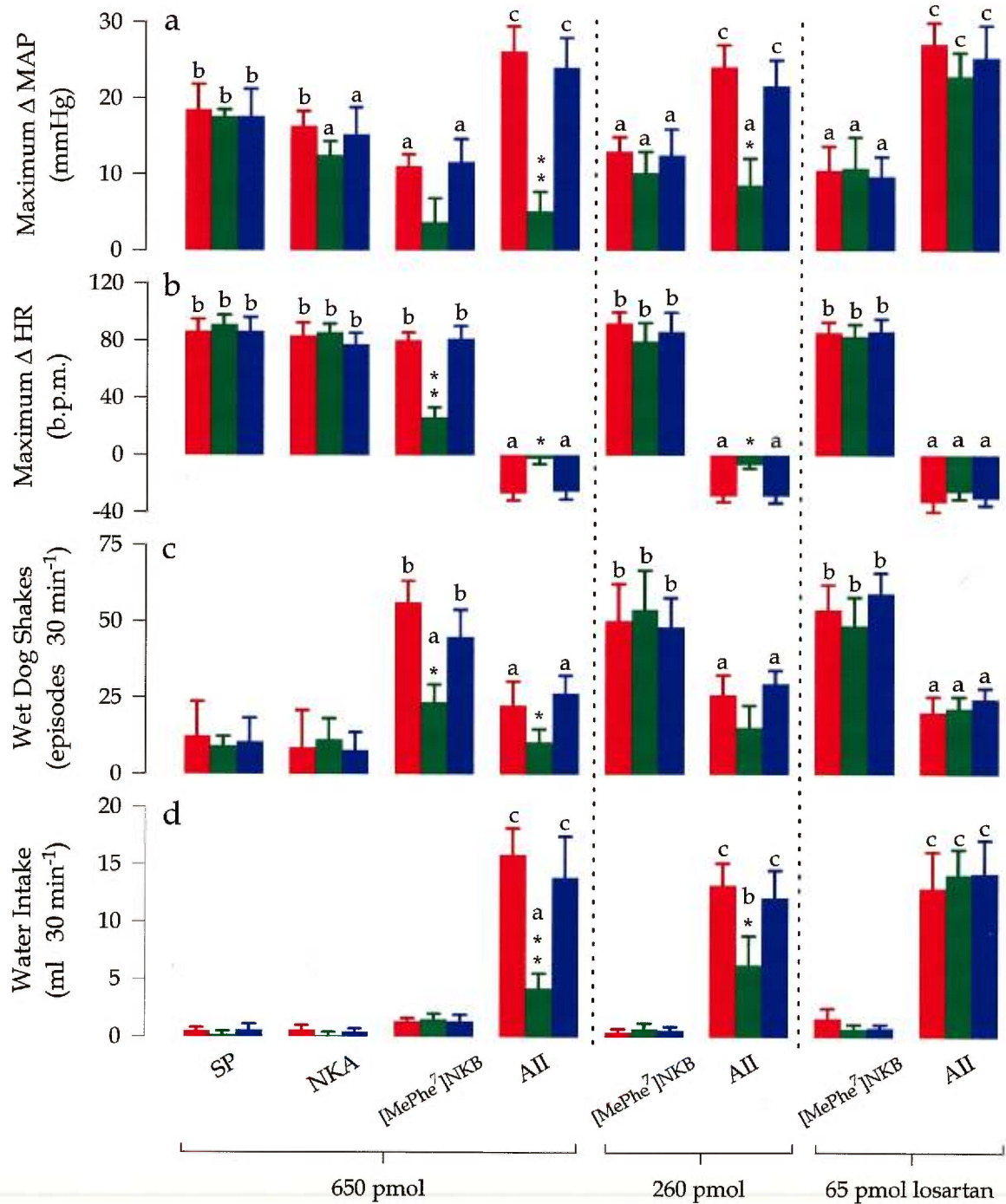
The cardiovascular and behavioural effects induced by [MePhe<sup>7</sup>]NKB or AII were not affected by the AT<sub>2</sub> receptor antagonist PD 123,319 (650 pmol) (Figure 4). On the third day, agonists were reinjected to verify whether PD 123,319 had a delayed action on either AII or [MePhe<sup>7</sup>]NKB as reported earlier with AII (Widdop et al., 1994). PD 123,319 (650 pmol) was still found inactive 24 h after injection (Figure 4). When injected alone, this antagonist (650 pmol) was without effect on any parameters (peak $\Delta$ MAP =  $5.1 \pm 3.8$  mmHg; peak  $\Delta$ HR =  $16.8 \pm 13.9$  b.p.m.; wet dog shake for 30 min =  $9.3 \pm 5.8$  episodes; water intake for 30 min =  $2.0 \pm 1.1$  ml;  $n = 8$ ).

The peptide NK<sub>3</sub> receptor antagonist, R 486 (650 pmol) significantly reduced the effects of [MePhe<sup>7</sup>]NKB without altering the AII-mediated effects (Figure 5). The inhibition was over when [MePhe<sup>7</sup>]NKB was readministered alone on the third day. When injected alone, R 486 (650 pmol) showed no intrinsic activity (peak $\Delta$ MAP =  $3.6 \pm 1.9$  mmHg; peak  $\Delta$ HR =  $17.8 \pm 14.0$  b.p.m.; wet dog shake for 30 min =  $12.4 \pm 7.6$  episodes; water intake for 30 min =  $0.3 \pm 0.1$  ml;  $n = 8$ ).



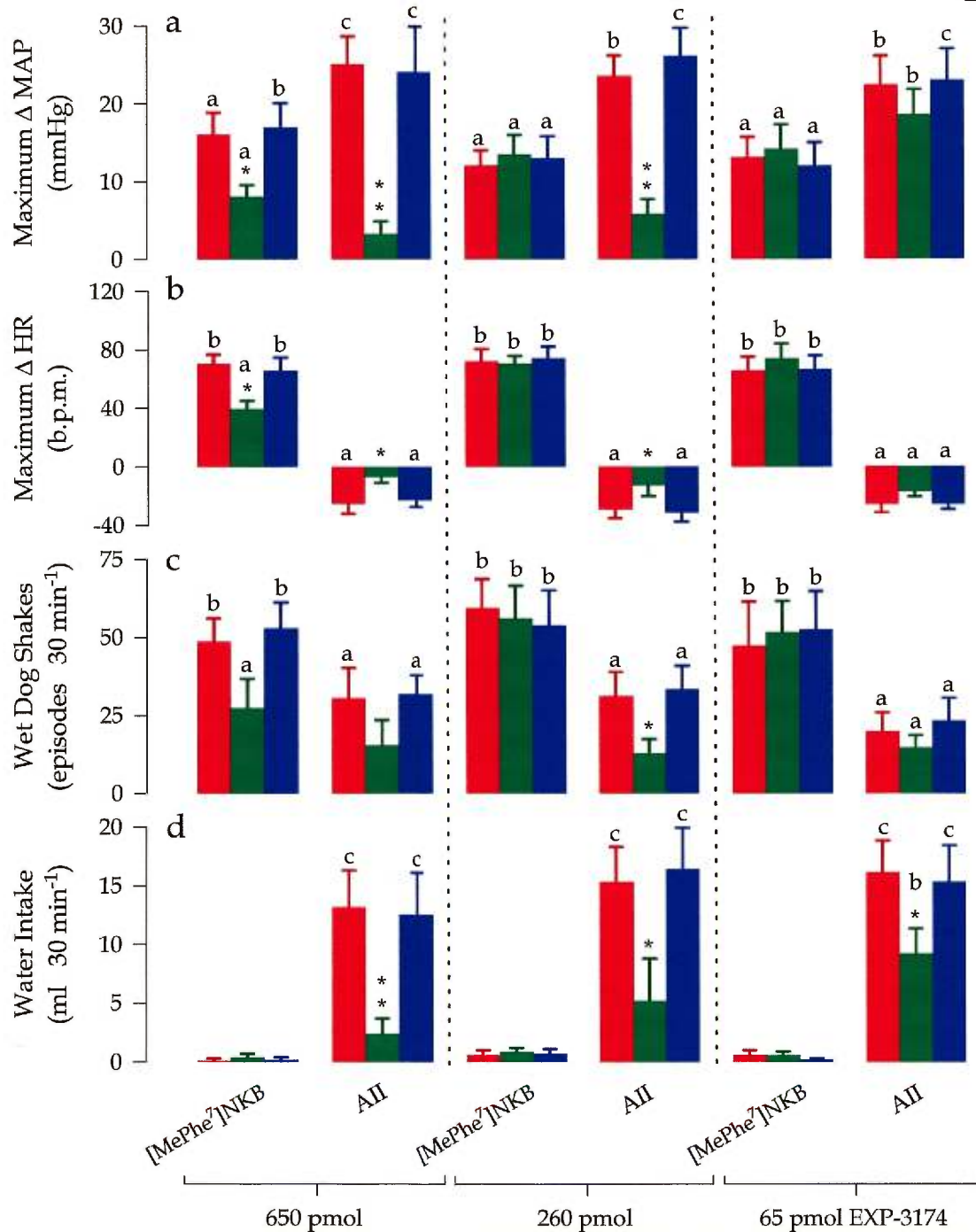
**Figure 1.** Time course of (a) mean arterial blood pressure (MAP) and (b) heart rate (HR) changes evoked by i.c.v. injections of 25 pmol substance P (●), neurokinin A (■), [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B (▲) and angiotensin II (▼) in conscious freely moving rat. Cardiovascular effects mediated by the vehicle (CSF) are also shown (◆). Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of results from 8 rats for each peptide. Statistical comparison to the vehicle for the period of 1-10 min following i.c.v. injection of peptides is indicated by <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; <sup>c</sup> $P < 0.001$ .





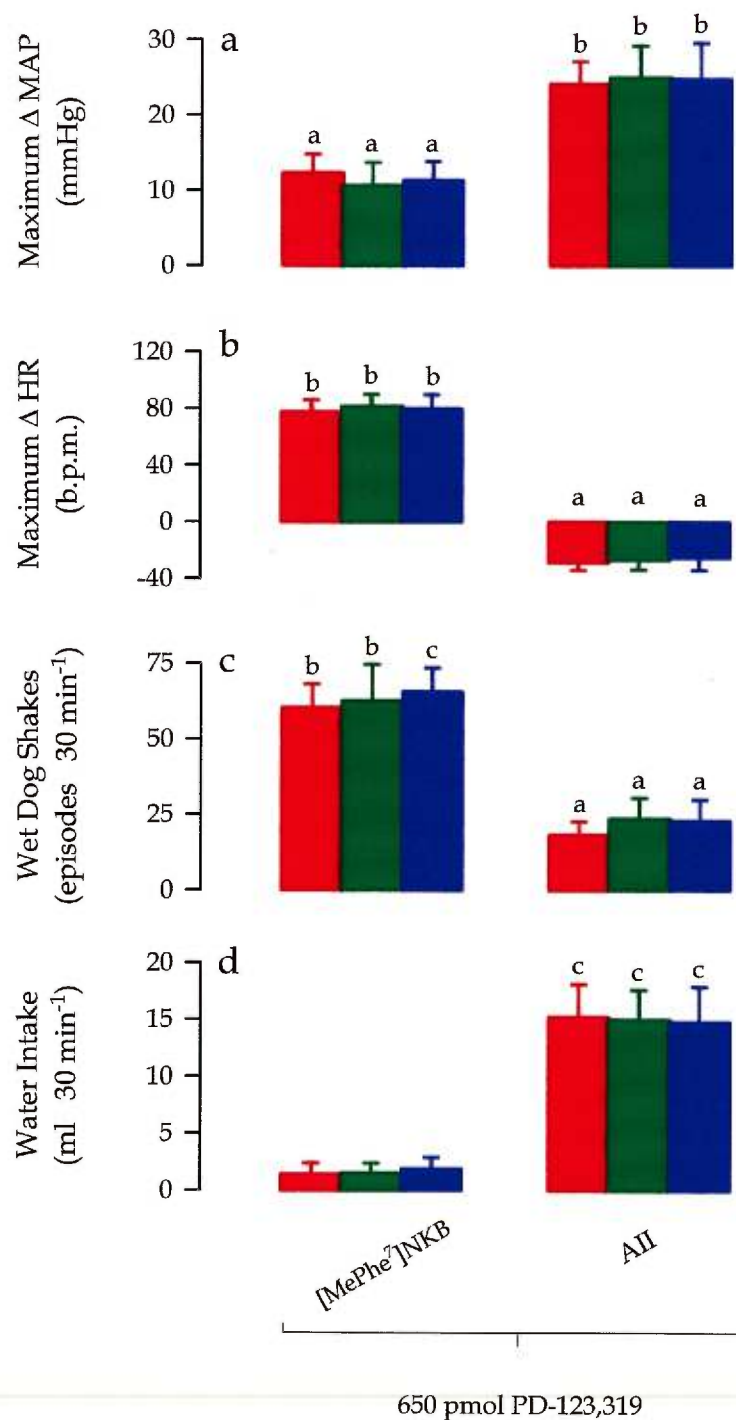
**Figure 2.** Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol substance P (SP), neurokinin A (NKA), [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B ([MePhe<sup>7</sup>]NKB) and angiotensin II (AII) were measured on three consecutive days in conscious rats.

**Figure 2.** Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol substance P (SP), neurokinin A (NKA), [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B ([MePhe<sup>7</sup>]NKB) and angiotensin II (AII) were measured on three consecutive days in conscious rats. Agonists were injected i.c.v. alone on day 1 (red columns) or 5 min after the prior i.c.v. injection of losartan (65 pmol, 260 pmol or 650 pmol) on day 2 (green columns). On day 3 (blue columns), agonists were readministered alone to assess the reversibility of the blockade. Shown are maximal increases in (a) mean arterial blood pressure (MAP) and (b) heart rate (HR) measured at 3-5 min post-injection. Total wet dog shake episodes (c) and water intake (d) were measured for a period of 30 min. Maximal CSF values are:  $\Delta$ MAP =  $4.0 \pm 3.2$  mmHg;  $\Delta$ HR =  $7.8 \pm 5.0$  b.p.m.; wet dog shake =  $5.9 \pm 4.5$  episodes  $\times 30$  min<sup>-1</sup>; water intake =  $0.2 \pm 0.1$  ml  $\times 30$  min<sup>-1</sup>;  $n = 8$ . Each value represents the mean  $\pm$  s.e.mean of results from 8 rats for each agonist. Statistical comparison to the agonist alone on day 1 is indicated by \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  and to the vehicle is indicated by <sup>a</sup>  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>c</sup>  $P < 0.001$ .



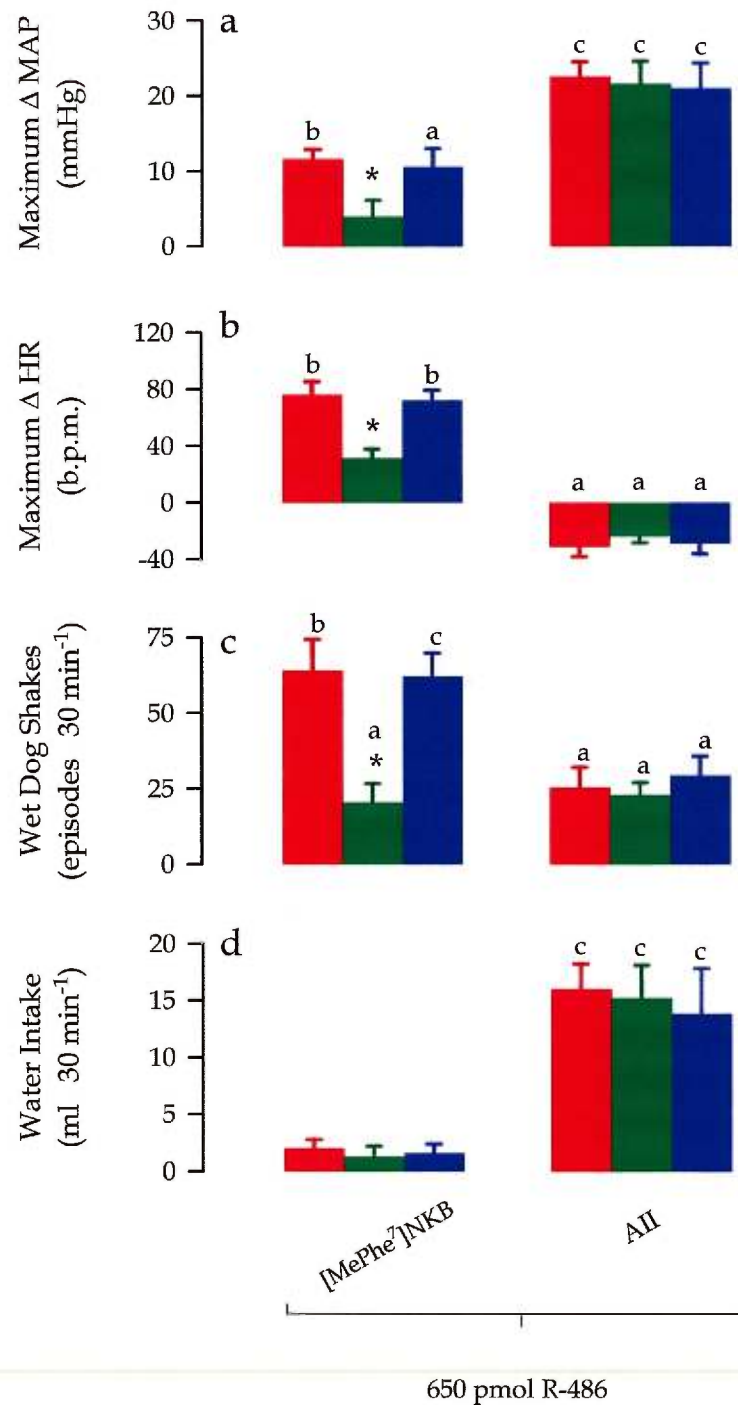
**Figure 3.** Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B ([MePhe<sup>7</sup>]NKB) and angiotensin II (AII) were measured on three consecutive days in conscious rats.

**Figure 3.** Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B ([MePhe<sup>7</sup>]NKB) and angiotensin II (AII) were measured on three consecutive days in conscious rats. Agonists were injected i.c.v. alone on day 1 (red columns) or 5 min after the prior i.c.v. injection of EXP 3174 (65 pmol, 650 pmol or 6.5 nmol) on day 2 (green columns). On day 3 (blue columns), agonists were readministered alone to assess the reversibility of the blockade. Shown are maximal increases in (a) mean arterial blood pressure (MAP) and (b) heart rate (HR) measured at 3-5 min post-injection. Total wet dog shake episodes (c) and water intake (d) were measured for a period of 30 min. Maximal CSF values are:  $\Delta\text{MAP} = 5.9 \pm 4.1$  mmHg;  $\Delta\text{HR} = 11.4 \pm 8.3$  b.p.m.; wet dog shake =  $7.0 \pm 4.8$  episodes  $\times 30$  min<sup>-1</sup>; water intake =  $1.5 \pm 1.3$  ml  $\times 30$  min<sup>-1</sup>;  $n = 8$ . Each value represents the mean  $\pm$  s.e.mean of results from 8 rats for each agonist. Statistical comparison to the agonist alone on day 1 is indicated by \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  and to the vehicle is indicated by<sup>a</sup>  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>c</sup>  $P < 0.001$ .



**Figure 4.** Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B ([MePhe<sup>7</sup>]NKB) and angiotensin II (AII) were measured on three consecutive days in conscious rats.

**Figure 4.** Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B ([MePhe<sup>7</sup>]NKB) and angiotensin II (AII) were measured on three consecutive days in conscious rats. Agonists were injected i.c.v. alone on day 1 (red columns) or 5 min after the prior i.c.v. injection of PD 123,319 (650 pmol) on day 2 (green columns). On day 3 (blue columns), agonists were readministered alone. Shown are maximal increases in (a) mean arterial blood pressure (MAP) and (b) heart rate (HR) measured at 3-5 min post-injection. Total wet dog shake episodes (c) and water intake (d) were measured for a period of 30 min. Maximal CSF values are:  $\Delta\text{MAP} = 4.2 \pm 2.7$  mmHg;  $\Delta\text{HR} = 13.2 \pm 9.0$  b.p.m.; wet dog shake =  $8.3 \pm 6.1$  episodes  $\times 30$  min<sup>-1</sup>; water intake =  $1.2 \pm 0.5$  ml  $\times 30$  min<sup>-1</sup>;  $n = 8$ . Each value represents the mean  $\pm$  s.e.mean of results from 8 rats for each agonist. No statistical difference was observed in the presence of PD 123,319. Statistical comparison to the vehicle is indicated by<sup>a</sup>  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>c</sup>  $P < 0.001$ .



**Figure 5.** Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B ([MePhe<sup>7</sup>]NKB) and angiotensin II (AII) were measured on three consecutive days in conscious rats.

**Figure 5.** Cardiovascular and behavioural effects of 25 pmol [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin B ([MePhe<sup>7</sup>]NKB) and angiotensin II (AII) were measured on three consecutive days in conscious rats. Agonists were injected i.c.v. alone on day 1 (red columns) or 5 min after the prior i.c.v. injection of R 486 (650 pmol) on day 2 (green columns). On day 3 (blue columns), agonists were readministered alone. Shown are maximal increases in (a) mean arterial blood pressure (MAP) and (b) heart rate (HR) measured at 3-5 min post-injection. Total wet dog shake episodes (c) and water intake (d) were measured for a period of 30 min. Maximal CSF values are:  $\Delta$ MAP =  $1.3 \pm 1.4$  mmHg;  $\Delta$ HR =  $9.0 \pm 6.7$  b.p.m.; wet dog shake =  $7.1 \pm 6.2$  episodes  $\times 30$  min<sup>-1</sup>; water intake =  $0.4 \pm 0.4$  ml  $\times 30$  min<sup>-1</sup>;  $n = 8$ . Each value represents the mean  $\pm$  s.e.mean of results from 8 rats for each agonist. Statistical comparison to the agonist alone on day 1 is indicated by \*  $P < 0.05$  and to the vehicle is indicated by <sup>a</sup>  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>c</sup>  $P < 0.001$ .



## Discussion

### *Losartan, a putative ligand for the NK<sub>3</sub> tachykinin receptor*

Our results are in agreement with earlier binding studies showing an interaction between losartan and EXP 3174 and tachykinin NK<sub>3</sub> receptors (Chrétien et al., 1994). Losartan blocks cardiovascular and behavioural responses mediated by central activation of AT<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptors in the conscious rat. However, losartan did not modify the central cardiovascular response to SP or NKA. The moderate affinity of losartan toward NK<sub>3</sub> receptors can be interpreted to some extent on the basis of amino acid sequence similarities between AT<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> mammalian receptors. In fact, Ji et al. (1994) have recently determined the structural requirement for the specific binding of losartan to the AT<sub>1</sub> receptor subtype. Using mutant receptors with point mutations of residues susceptible to influence the binding of losartan to AT<sub>1</sub> receptors, they showed that the two most important amino acids for the latter binding were a valine residue at the 6th position in transmembrane region III (TM-III<sup>6</sup>) and an alanine residue at the TM-IV<sup>4</sup> position of the AT<sub>1</sub> receptor. Interestingly, both these amino acids can be found on the NK<sub>3</sub> receptor (valine<sup>118</sup> at the TM-III<sup>12</sup> position and alanine<sup>153</sup> at the TM-IV<sup>4</sup> position) and are absent at the same position in both NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> tachykinin receptors (Nakanishi, 1991). Moreover, in another study using AT<sub>1</sub> receptor chimeric constructs, the binding of eleven non-peptide AT<sub>1</sub> receptor antagonists was impaired by all of the chimeric exchanges involving the lower part of TM-VI and TM-VII, while these substitutions did not affect AII binding (Schambye et al., 1994). However, in NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors, non-peptide antagonist binding is affected by mutations located spatially around the top of TM-VI. Substitutions in this area of the receptor, which severely impaired or eliminated the binding of non-peptide antagonists, had no effect on the binding of natural peptide ligands (Fong et al., 1992; Zoffmann et al., 1993; Gether et al., 1993; Fong & Strader, 1994).

Another non-specific inhibitory effect of losartan has been reported on the bovine brain calcium/calmodulin-dependent 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. In this model, losartan was found to be four times more potent than EXP 3174 at inhibiting the enzyme (Ishizaki & Ohtawa, 1994). Moreover, losartan was shown to possess high

affinity for non-angiotensin binding sites in rat liver homogenates (Widdowson et al. 1993) and in the rat central nervous system (Paré et al., 1993). Even though losartan does not exhibit any intrinsic activity at 650 pmol, a higher dose (6.5 nmol) produced convulsion-like behaviours in 4 out of 7 rats. This behaviour is similar to what is observed with high doses of the NK<sub>3</sub> receptor agonist [MePhe<sup>7</sup>]NKB (6.5 nmol i.c.v.) (personal observation). It remains to be established whether high doses of losartan could exhibit a NK<sub>3</sub> agonistic-like activity. These side effects are not correlated with AT<sub>1</sub> or NK<sub>3</sub> receptor antagonism since the dose of EXP 3174 (6.5 nmol) which blocks both AT<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptors, or that of R 486 (6.5 nmol in Picard et al., 1994) which blocks NK<sub>3</sub> receptors exclusively, failed to cause convulsive effects. Since EXP 3174 (650 pmol) displays no antagonist activity at the NK<sub>3</sub> receptor, except at very high doses (6.5 nmol), this suggests that losartan has a greater affinity than its active metabolite at the NK<sub>3</sub> receptor site. Finally, central cardiovascular and behavioural effects of AII appear to be mediated solely by AT<sub>1</sub> receptors since losartan and EXP 3174, but not PD 123,319 block AII-mediated responses.

Although losartan is unstable *in vivo* and is largely converted to EXP 3174 when administered orally (Siegl, 1993), its potential interaction with central NK<sub>3</sub> receptors cannot be completely ruled out and further experiments are required to determine whether the antihypertensive effect of this compound can be partly related to its interaction with the NK<sub>3</sub> receptor. Nevertheless, the structure of losartan can provide useful information for the future development of a novel class of non-peptide NK<sub>3</sub> receptor antagonist. This would not be a precedent since losartan was synthesized using S 8307, S 8308 and other analogs of the benzyimidazoles as chemical leads (Duncia et al., 1992). Indeed, the discovery of losartan followed the observation that several simple benzyimidazoles are weak AII receptor antagonists (Duncia et al., 1992).

---

*Lack of interaction between tachykinins and angiotensin in supraspinal cardiovascular regulation*

As expected, the NK<sub>3</sub> peptide antagonist, R 486, is effective against [MePhe<sup>7</sup>]NKB but not against AII-mediated responses. It is therefore unlikely that AII acts through the release of an NK<sub>3</sub> endogenous ligand. Likewise, central cardiovascular and wet dog shake effects of [MePhe<sup>7</sup>]NKB are probably not due to the central release of AII since losartan and EXP 3174 blocked the effects of AII at doses that did not block [MePhe<sup>7</sup>]NKB-mediated effects.

With the use of selective antagonists, we have previously reported that central SP-mediated responses in this paradigm are due primarily to NK<sub>1</sub> receptor activation and to some extent to NK<sub>2</sub> receptor activation (Picard et al., 1994). Conversely, NKA activates mainly central NK<sub>2</sub> receptors, but under NK<sub>2</sub> receptor blockade a minor NK<sub>1</sub> receptor component is unmasked (Picard et al., 1994). Furthermore, when injected i.c.v., neither SP nor NKA seem to release AII since losartan is unable to affect these tachykinin-induced responses. This is in agreement with earlier studies demonstrating fundamental differences in the mechanism by which SP and AII influence cardiovascular and autonomic functions (Unger et al. 1981; 1985). It is conceivable that AII and SP are involved in hemodynamic adjustment to specific physiological states, such as dehydration inducing thirst and volume expansion, in the case of AII, or arousal following the central processing of pain (Foreman & Blair, 1988), stress (Herd, 1991) or fight or flight response (Unger et al., 1981), in the case of SP.

NK<sub>3</sub> receptor activation exhibits strong similarities with AT<sub>1</sub> receptor activation in the induction of vasopressin release in the circulation (Unger et al., 1981; Harland et al., 1988; Nakayama et al., 1992). Additionally, NK<sub>3</sub> receptor agonists are known to promote the wet dog shake behaviour (Elliott and Iversen, 1986; Stoessl et al., 1988; Itoi et al., 1992) which may influence the drinking behaviour (Walsh et al., 1992). However, these peptides seem to play parallel, but opposite roles in volume regulation. NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptor activation has been associated with reduced salt and water intake (Fitzsimons & Evered, 1978; Massi et al., 1988; 1991; Epstein, 1991; Walsh et al., 1992) whereas central AII stimulates thirst and sodium appetite (Wright & Harding, 1992). It

is therefore reasonable to suggest a common pathway of action by these peptides where AII is the main neurotransmitter in water balance regulation, whereas the endogenous NK<sub>3</sub> agonist (NKB) represents a negative modulator of this angiotensinergic pathway (Massi et al., 1991; Epstein, 1991). Thus, one would expect that treatment with a NK<sub>3</sub> receptor antagonist has a facilitatory action on the angiotensinergic pathway favouring volume expansion. However, R 486 had no effect on the cardiovascular changes or water intake induced by AII, suggesting that AII is not endogenously inhibited by the natural NK<sub>3</sub> agonist, NKB, under resting conditions. One can imagine a particular physiologic state where endogenous NKB would be released to inhibit the body fluid volume expansion mediated by AII.

#### *Supraspinal site of action of tachykinins and AII*

Immunohistochemical studies have provided evidence for the presence of distinct populations of neurones expressing NKB and AII in various regions of the rat central autonomic network implicated in cardiovascular and water balance regulation (Marksteiner et al., 1992; Bunnemann et al., 1993). Moreover, the NK<sub>3</sub> receptor was found in moderate to high density in the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus (Beaujouan et al., 1986; Bergström et al., 1987; Mantyh et al., 1989; Mussap and Burcher, 1990). The forebrain cell bodies containing AT<sub>1</sub> receptors were distributed in the paraventricular, periventricular, suprachiasmatic and supraoptic nuclei, the organum vasculosum lamina terminalis, the median eminence, the median preoptic area and the subfornical organ (Wamsley et al., 1990; Bunnemann et al., 1993; Phillips et al., 1993; Wright & Harding, 1994). These nuclei constitute the likely i.c.v. site of action of [MePhe<sup>7</sup>]NKB and AII since they are circumventricular organs or closely apposed to the lateral ventricular walls in addition to being intimately associated with cardiovascular and body fluid regulation. On the other hand, although the central wet dog shake pathway is still poorly characterized, this behaviour could result from activation of functionally active NK<sub>3</sub> receptors in the medial habenula (Norris et al., 1993) or in the striatum (Keegan et al., 1992; Humpel & Saria, 1993) of the rat.

### *Conclusion*

This study provides functional evidence that losartan and its active metabolite EXP 3174 interact with central NK<sub>3</sub> receptor in the rat. Losartan has a potency 10 fold greater than EXP 3174 in inhibiting NK<sub>3</sub> receptor-mediated effects and could represent a chemical lead toward the development of a new class of non-peptide NK<sub>3</sub> receptor antagonist.

Moreover, the cardiovascular and water intake responses induced by central injection of AII are probably mediated by AT<sub>1</sub> receptors and could be dissociated from the cardiovascular and behavioural responses produced by tachykinin agonists acting on NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors.

### **Acknowledgements**

We are grateful to Dr Domenico Regoli, Sherbrooke University, Dept. of pharmacology, who generously provided R 486 and [MePhe<sup>7</sup>]NKB. This study was supported by the Kidney Foundation of Canada and a grant in aid (MT-8925) from the Medical Research Council of Canada to R.C. P.P. holds studentships from The Heart and Stroke Foundation of Canada and Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche.

### **References**

- Advenier, C., Rouissi, N., Nguyen, Q.T., Emonds-alt, X., Breliere, J.-C., Neliat, G., Naline, E. et Regoli, D., Neurokinin A (NK<sub>2</sub>) receptor revisited with SR 48968, a potent non-peptide antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184: 1418-1424, 1992.
- Bains, J.S., Potyok, A. et Ferguson, A.V., Angiotensin II actions in paraventricular nucleus: functional evidence for neurotransmitter role in efferents originating in subfornical organ, *Brain Res.*, 599: 223-229, 1992.
- Beaujouan, J.C., Torrens, Y., Saffroy, M. et Glowinski, J., Quantitative autoradiographic analysis of the distribution of binding sites for [<sup>125</sup>I]Bolton hunter derivatives of eledoisin and substance P in the rat brain. *Neurosci.*, 18: 857-875, 1986.

Bergström, L., Torrens, Y., Saffroy, M., Beaujouan, J.C., Lavielle, S., Chassaing, G., Morgat, J.L., Glowinski, J. et Marquet, A., [<sup>3</sup>H]Neurokinin B and [<sup>125</sup>I]-Bolton hunter eledoisin label identical tachykinin binding sites in the rat brain. *J. Neurochem.*, 48: 125-133, 1987.

Bunnemann, B., Fuxe, K. et Ganten, D., The renin-angiotensin system in the brain: an update 1993. *Reg. Pept.*, 46: 487-509, 1993.

Chrétien, L., Guillemette, G. et Regoli, D., Non peptide angiotensin receptor antagonists bind to tachykinin NK<sub>3</sub> receptors of rat and guinea pig brain, *Eur. J. Pharmacol.*, 256: 73-78, 1994.

Ciccocioppo, R., Panocka, I., Pompei, P., De Caro, G. et Massi, M., Selective agonists at NK-3 tachykinin receptors inhibit alcohol intake in sardinian alcohol-preferring rats. *Brain Res. Bull.*, 33: 71-77, 1994.

Cooney, A.S. et Fitzsimons, J.T., The effect of the putative AT<sub>2</sub> agonist, *p*-aminophenylalanine<sup>6</sup> angiotensin II, on thirst and sodium appetite in rats. *Exp. Physiol.*, 78: 767-774, 1993.

Drapeau, G., Rouissi, N., Nantel, F., Rhaleb, N.-E., Tousignant, C. et Regoli, D., Antagonists for the neurokinin NK-3 receptor evaluated in selective receptor systems. *Regul. Peptides*, 31: 125-135, 1990.

Duncia, J.V., Carini, D.J., Chiu, A.T., Johnson, A.L., Price, W.A., Wong, P.C., Wexler, R.R. et Timmermans, P.B.M.W.M., The discovery of DuP 753, a potent, orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *Med. Res. Rev.*, 12: 149-191, 1992.

Elliott, P.J. et Iversen, S.D., Behavioural effects of tachykinins and related peptides. *Brain Res.*, 381: 68-76, 1986.

Emonds-Alt, X., Bichon, D., Ducoux, J.P., Heaulme, M., Miloux, B., Poncelet, M., Proietto, V., Van Broeck, D., Vilain, P., Neliat, G., Soubrié, P., Le Fur, G. et Brelrière, J.C., SR 142801, the first non-peptide antagonist of the tachykinin NK3 receptor. *Life Sci.*, 56: PL27-PL32, 1995.

Epstein, A.N., Neurohormonal control of salt intake in the rat. *Brain Res. Bull.*, 27: 315-320, 1991.

Fitzsimons, J.T. et Evered, M.D., Eledoisin, substance P and related peptides: intracranial dipsogens in the pigeon and antidipsogens in the rat. *Brain Res.*, 150: 533-542, 1978.

Fong, T.M., Huang, R.-R.C. et Strader, C.D., Localization of agonist and antagonist binding domains of the human neurokinin-1 receptor. *J. Biol. Chem.*, 267: 25664-25667, 1992.

Fong, T.M. et Strader, C.D., Functional mapping of the ligand binding sites of G-protein coupled receptors. *Med. Res. Rev.*, 14: 387-399, 1994.

Foreman, R.D. et Blair, R.W., Central organization of sympathetic cardiovascular response to pain. *Ann. Rev. Physiol.*, 50: 607-622, 1988.

Fregly, M.J. et Rowland, N.J., Effects of a non peptide angiotensin II receptor antagonist, DuP 753, on angiotensin-related water intake in rats. *Brain Res. Bull.*, 27: 97-100, 1991.

Garret, C., Carruette, A., Fardin, V., Moussaoui, S., Peyronel, J.-F., Blanchard, J.-C. et Laduron, P.M., Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 10208-10212, 1991.

Gehlert, D.R., Gackenheim, S.L., Reel, J.K., Lin, H.-S. et Steinberg, M.I., Non-peptide angiotensin II receptor antagonists discriminate subtypes of <sup>125</sup>I-angiotensin II binding sites in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 187: 123-126, 1990.

Gether, U., Yokota, Y., Emonds-Alt, X., Breliere, J.-C., Lowe III, J.A., Snider, R.M., Nakanishi, S. et Schwartz, T.W., Two nonpeptide tachykinin antagonists act through epitopes on corresponding segments of the NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 6194-6198, 1993.

Grupp, L.A. et Harding, S., The reduction in alcohol drinking by peripherally injected angiotensin II is selectively mediated by the AT<sub>1</sub> receptor subtype. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 47: 385-392, 1994.

Gyurko, R., Wielbo, D. et Phillips, M.I., Antisense inhibition of AT<sub>1</sub> receptor mRNA and angiotensinogen mRNA in the brain of spontaneously hypertensive rats reduces hypertension of neurogenic origin. *Regul. Pept.*, 49: 167-174, 1993.

Harland, D., Gardiner, S.M. et Bennett, T., Cardiovascular and dipsogenic effects of angiotensin II administered i.c.v. in Long-Evans and Brattleboro rats. *Brain Res.*, 455: 58-64, 1988.

Helke, C.J., Krause, J.E., Mantyh, P.W., Couture, R. et Bannon, M.J., Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms. *FASEB J.*, 4: 1606-1615, 1990.

Herd, J.A., Cardiovascular response to stress. *Physiol. Rev.*, 71: 305-331, 1991.

Humpel, C. et Saria, A., Intranigral injection of selective neurokinin-1 and neurokinin-3 but not neurokinin-2 receptor agonists biphasically modulate striatal dopamine metabolism but not striatal preprotachykinin-A mRNA in the rat. *Neurosci. Lett.*, 157: 223-226, 1993.

- Improta, G. et Broccardo, M., Inhibitory role on gastric secretion of a central NK-3 tachykinin receptor agonist, senktide. *Peptides* 12: 1433-1434, 1991.
- Ishizaki, H. et Ohtawa, M., Inhibitory effect of the nonpeptide angiotensin II receptor antagonist losartan and its active metabolite, E-3174, on cAMP phosphodiesterase: additional action of the antagonists. *Biochem. Pharmacol.*, 48: 201-204, 1994.
- Itoi, K., Tschöpe, C., Jost, N. Culman, J., Lebrun, C., Stauss, B. et Unger, Th., Identification of the central tachykinin receptor subclass involved in substance P-induced cardiovascular and behavioral responses in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 219: 435-444, 1992.
- Ji, H., Leung, M., Zhang, Y., Catt, K.J. et Sandberg, K., Differential structural requirements for specific binding of nonpeptide and peptide antagonists to the AT<sub>1</sub> angiotensin receptor. *J. Biol. Chem.*, 269: 16533-16536, 1994.
- Keegan, K.D., Woodruff, G.N. et Pinnock, R.D., The selective NK<sub>3</sub> receptor agonist senktide excites a subpopulation of dopamine-sensitive neurones in the rat substantia nigra pars compacta *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, 105: 3-5, 1992.
- Kirby, R.F., Thunhorst, R.L. et Johnson, A.K., Effects of a non-peptide angiotensin receptor antagonist on drinking and blood pressure responses to centrally administered angiotensins in the rat. *Brain Res.*, 576: 348-350, 1992.
- Li, Z., Bains, J.S. et Ferguson, A.V., Functional evidence that the angiotensin antagonist losartan crosses the blood-brain barrier in the rat. *Brain Res. Bull.*, 30: 33-39, 1993.
- Maggi, C.A., Patacchini, R., Rovero, P. et Giachetti, A., Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J. Auton. Pharmacol.*, 13: 23-93, 1993.
- Mantyh, P.W., Gates, T., Mantyh, C.R. et Maggio, J.E., Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. *J. Neurosci.*, 9: 258-279, 1989.
- Marksteiner, J., Sperk, G. et Krause, J.E., Distribution of neurons expressing neurokinin B in the rat brain: Immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *J. Comp. Neurol.*, 317: 341-356, 1992.
- Massi, M., De Caro, G., Perfumi, M. et Venturi, F., Mapping of brain sites sensitive to the antidipsogenic effect of tachykinins. *Pept.*, 9: 347-356, 1988.
- Massi, M., Polidori, C., Perfumi, M., Gentili, L. et De Caro, G., Tachykinin receptor subtypes involved in central effects of tachykinins on water and salt intake. *Brain Res. Bull.*, 26: 155-160, 1991.



McLean, S., Ganong, A., Seymour, P.A., Snider, R.M., Desai, M.C., Rosen, T., Bryce, D.K., Longo, K.P., Reynolds, L.S., Robinson, G., Schmidt, A.W., Siok, C. et Heym, J., Pharmacology of CP-99,994; a nonpeptide antagonist of the tachykinin neurokinin-1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 267: 472-479, 1993.

Mussap, C.J. et Burcher, E., [<sup>125</sup>I]-Bolton-Hunter Scyliorhinin II: a novel, selective radioligand for the tachykinin NK<sub>3</sub> receptor in rat brain. *Peptides*, 11: 827-836, 1990.

Nagashima, A., Takano, Y., Tateishi, K., Matsuoka, Y., Hamaoka, T. et Kamiya, H., Central pressor actions of neurokinin B: increases in neurokinin B contents in discrete nuclei in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.*, 499: 198-203, 1989.

Nakanishi, S., Mammalian tachykinin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14: 123-136, 1991.

Nakayama, Y., Takano, Y., Saito, R. et Kamiya, H., Central pressor actions of tachykinin NK-3 receptor in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res.*, 595: 339-342, 1992.

Norris, S.K., Boden, P.R. et Woodruff, G.N., Agonists selective for tachykinin NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptors excite subpopulations of neurons in the rat medial habenula nucleus in vitro. *Eur. J. Pharmacol.*, 234: 223-228, 1993.

Otsuka, M. et Yoshioka, K., Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.*, 73: 229-308, 1993.

Palmer, A.A., Steele, M.K., Shackelford, R.L. et Ganong, W.F., Intravenous losartan inhibits the increase in plasma luteinizing hormone and water intake produced by intraventricular angiotensin II. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 205: 263-266, 1994.

Paré, M.-C., Maltais, S. et Escher, E., The neurogenic origin of hypertension in SHR may be mediated by angiotensin II through a receptor different from AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>. *Regul. Pept.*, 47: 81-86, 1993.

Phillips, M.I., Shen, L., Richards, E.M. et Raizada, M.K., Immunohistochemical mapping of angiotensin AT<sub>1</sub> receptors in the brain. *Regul. Pept.*, 44: 95-107, 1993.

Picard, P., Regoli, D. et Couture, R., Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered tachykinins in the rat: characterization of receptors with selective antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, 112: 240-249, 1994.

Sakai, R.R., He, P.F., Yang, X.D., Ma, L.Y., Guo, Y.F., Reilly, J.J., Moga, C.N. et Fluharty, S.J., Intracerebroventricular administration of AT<sub>1</sub> receptor antisense oligonucleotides inhibits the behavioral actions of angiotensin II. *J. Neurochem.*, 62: 2053-2056, 1994.

Schambye, H.T., Hjorth, S.A., Bergsma, D.J., Sathe, G. et Schwartz, T.W., Differentiation between binding sites for angiotensin II and nonpeptide antagonists on the angiotensin II type 1 receptors. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 7046-7050, 1994.

Siegl, P.K.S., Discovery of losartan, the first specific non-peptide angiotensin II receptor antagonist. *J. Hypertension*, 11, Suppl. 3: S19-S22, 1993

Snider, R.M., Constantine, J.W., Lowe III, J.A., Longo, K.P., Lebel, W.S., Woody, H.A., Drozda, S.E., Desai, M.C., Vinick, F.J., Spencer, R.W. et Hess, H.-J., A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK<sub>1</sub>) receptor. *Science*, 251: 435-437, 1991.

Song, K., Zhuo, J. et Mendelsohn, F.A.O., Access of peripherally administered DuP 753 to rat brain angiotensin II receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 104: 771-772, 1991.

Stephenson, K.N. et Steele, K.M., Brain angiotensin II receptor subtypes and the control of luteinizing hormone and prolactin secretion in female rats. *J. Neuroendocrinol.*, 4: 441-447, 1992.

Stoessl, A.J., Dourish, C.T. et Iversen, S.D., The NK-3 tachykinin receptor agonist senktide elicits 5-HT-mediated behaviour following central or peripheral administration in mice and rats. *Br. J. Pharmacol.*, 94: 285-287, 1988.

Takano, Y., Nagashima, A., Hagio, T., Tateishi, K. et Kamiya, H., Role of central tachykinin peptides in cardiovascular regulation in rats. *Brain Res.*, 528: 231-237, 1990.

Timmermans, P.B.M.W.M., Wong, P.C., Chiu A.T., Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.A.M. et Smith, R.D., Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.*, 45: 205-251, 1993.

Toney, G.M., et Porter, J.P., Functional role of brain AT1 and AT2 receptors in the central angiotensin II pressor response. *Brain Res.*, 603: 57-63, 1993a.

Toney, G.M. et Porter, J.P., Functional roles of brain AT1 and AT2 receptors in the central angiotensin II pressor response in conscious young spontaneously hypertensive rats. *Develop. Brain Res.*, 71: 193-199, 1993b.

Tsutsumi, K. et Saavedra, J.M., Quantitative autoradiography reveals different angiotensin II receptor subtypes in selected rat brain nuclei. *J. Neurochem.*, 56: 348-351, 1991.

---

Unger, Th., Rascher, W., Schuster, C., Pavlovitch, R., Schömig, A., Dietz, R. et Ganten, D., Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II: role of the sympathetic nervous system and vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.*, 71: 33-42, 1981.

- Unger, Th., Becker, H., Petty, M., Demmert, G., Schneider, B., Ganten, D. et Lang, R.E., Differential effects of central angiotensin II and substance P on sympathetic nerve activity in conscious rats, Implications for cardiovascular adaptation to behavioral responses. *Circ. Res.*, 56: 563-575, 1985.
- Walsh, D.M., Elliot, P.J. et Hagan, R.M., Role of NK-2 receptors in the antidipsogenic activity of neurokinins in the mouse. *Gen. Pharmacol.*, 23: 231-233, 1992.
- Wamsley, J.K., Herblin, W.F., Alburges, M.E. et Hunt, M., Evidence for the presence of angiotensin II-type 1 receptors in brain. *Brain Res. Bull.*, 25: 397-400, 1990.
- Watling, K.J., Nonpeptide antagonists herald new era in tachykinin research. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13: 266-269, 1992.
- Widdop, R.E., Gardiner, S.M. et Bennett, T., Effects of angiotensin II AT<sub>1</sub>- or AT<sub>2</sub>-receptor antagonists on drinking evoked by angiotensin II or water deprivation in rats. *Brain Res.*, 648: 46-52, 1994.
- Widdowson, P.S., Renouard, A. et Vilaine, J.-P., Binding of [<sup>3</sup>H]angiotensin II and [<sup>3</sup>H]DuP 753 (losartan) to rat liver homogenates reveals multiple sites. Relationship to AT<sub>1a</sub>- and AT<sub>1b</sub>-type angiotensin receptors and novel nonangiotensin binding sites. *Peptides*, 14: 829-837, 1993.
- Wong, P.C., Price, W.A., Chiu, A.T., Duncia, J.V., Carini, D.J., Wexler, R.R., Johnson, A.L. et Timmermans, P.B.M.W.M., Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VIII. Characterization of functional antagonism displayed by DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 252: 719-725, 1990a.
- Wong, P.C., Price, W.A., Chiu, A.T., Duncia, J.V., Carini, D.J., Wexler, R.R., Johnson, A.L. et Timmermans, P.B.M.W.M., Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP 3174: an active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 255: 211-217, 1990b.
- Wright, J.W. et Harding, J.W., Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioural responses. *Brain Res. Rev.*, 17: 227-262, 1992.
- Wright, J.W. et Harding, J.W., Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci. Biobehavioral Rev.*, 18: 21-53, 1994.
- Zoffmann, S., Gether, U. et Schwartz, T.W., Conserved His<sup>VI-17</sup> of the NK-1 receptor is involved in binding of non-peptide antagonists but not substance P. *FEBS Lett.*, 336: 506-510, 1993.

## CHAPITRE 7 - DISCUSSION

### 1. Actions supraspinales des tachykinines

Dans les minutes suivant l'injection i.c.v. des tachykinines, on observe des ajustements cardiovasculaires et comportementaux importants chez le rat éveillé non-restraint. Selon la dose et la nature de la tachykinine administrée, ces effets peuvent durer pendant des périodes de 10 min à quelques heures. Les réponses cardiovasculaires et comportementales des tachykinines sont sujettes au phénomène de la tachyphylaxie. Ainsi, nos études ont toutes été effectuées avec des injections espacées par des intervalles de 24 heures pour éviter ce phénomène de désensibilisation (voir chapitre 3, figure 1). A doses équimolaires, l'ordre de puissance des tachykinines et agonistes pour évoquer de telles réponses chez le rat Wistar est : NPK > NP $\gamma$  > SP > NKA > senktide = [MePhe<sup>7</sup>]NKB > NKB. A l'exception du NPK et du NP $\gamma$ , qui ont des effets seuils à la dose de 10 pmol, les autres tachykinines et analogues n'agissent qu'à des doses de 25 pmol et plus. La stabilité métabolique des formes allongées de la NKA (NPK et NP $\gamma$ ) pourrait expliquer leur puissance relative par rapport aux autres tachykinines (Takeda et Krause, 1989). De plus, même si les effets cardiovasculaires induits par l'administration i.c.v. de chacune des tachykinines ou analogues sont qualitativement similaires (augmentations de la PA et de la FC), ils n'entraînent pas pour autant un patron de réponses comportementales commun. A cet égard, on distingue deux grands patrons de réponses comportementales : les tachykinines SP, NKA, NPK et NP $\gamma$  entraînent principalement des comportements de locomotion (redressement, enfouissement, locomotion générale), de toilettage (débarbouillage, grattement de la tête) et d'attention (reniflement), tandis que le senktide, le [MePhe<sup>7</sup>]NKB et la NKB causent principalement des secousses corporelles et dans une plus faible mesure augmente l'activité de locomotion, de toilettage et d'attention. Par ailleurs, les réponses cardiovasculaires associées à ces deux divisions de la transmission tachykinergique centrale passe par des mécanismes bien différents. En effet, les réponses pressives de la SP et de la NKA (récepteurs NK-1 et NK-2) sont essentiellement secondaires à une activation du système nerveux sympathique alors

que la NKB et le senktide (agonistes NK-3) augmentent la pression artérielle via une relâche de vasopressine hypothalamo-hypophysaire et à moindre degré par l'activation du système nerveux sympathique (Takano et coll., 1990; 1993). Bien que, de fortes doses de [MePhe<sup>7</sup>]NKB (6,5 nmol) provoquent d'intenses convulsions chez le rat éveillé, des doses équimolaires de SP ou de NKA ne font que prolongées la durée d'action des réponses observées aux doses plus faibles. A la lumière des résultats avec les agonistes, on peut proposer l'existence de deux grandes voies neuronales dans le SNC du rat : l'une étant sensible aux tachykinines issues de la transcription du gène PPT-A (SP, NKA, NP $\gamma$  et NPK) et l'autre à la NKB qui est transcrite du gène PPT-B. La caractérisation pharmacologique des récepteurs permettra de mieux définir cette première classification de la transmission tachykinergique centrale.

Mêmes si les réponses initiales au [MePhe<sup>7</sup>]NKB étaient très reproductibles pendant les études rapportées dans ce manuscrit, des tests plus récents ont démontrés des effets divergents lors de l'utilisation d'une nouvelle source de ce peptide synthétique. En effet, nous avons récemment testé cet agoniste à partir d'une nouvelle source pharmaceutique et devons conclure que le [MePhe<sup>7</sup>]NKB de cette nouvelle source provoque majoritairement une réponse bradycardiaque faible avec un effet presseur faible accompagné de comportements similaires à ceux obtenus avec la source originale. Le passage de la faible réponse chronotrope positive obtenue originalement vers la faible chute de FC suivie 15 à 20 minutes plus tard d'une tachycardie latente demeure très difficile à interpréter. Plusieurs facteurs liés à l'expérimentateur, la source des drogues, sa dilution, sa contamination possible, l'atmosphère de travail, l'heure, l'environnement, le cycle hormonal ou la santé de l'animal peuvent affecter tout un groupe expérimental sans en affecter un autre. Eric Cellier, un autre étudiant du laboratoire du Dr Réjean Couture, caractérise présentement ces nouveaux effets des agonistes du récepteur NK-3 chez le rat. La bradycardie pourrait résulter d'une diminution de l'activité sympathique des fibres cardiaques car un prétraitement intravéneux au propranolol réduit cette baisse de fréquence cardiaque d'environ 60% alors que l'atropine ou le naloxone n'ont aucun effet sur cette variable. D'autre part, alors que le propranolol et le naloxone n'ont aucun effet sur la réponse

comportementale au senktide, l'atropine diminue partiellement le comportement de bâillement et augmente d'environ 50% les secousses corporelles. Ces derniers résultats suggèrent l'implication d'une composante cholinergique dans les effets comportementaux de l'agoniste du récepteur NK-3.

Malgré cette inconsistance au niveau des effets cardiovasculaires du [MePhe<sup>7</sup>]NKB, les résultats obtenus aux chapitres 3, 5 et 6 demeurent tout à fait valides car, dans les deux cas, l'antagoniste sélectif pour le récepteur NK-3 bloque sélectivement les effets du [MePhe<sup>7</sup>]NKB alors que les autres antagonistes (sélectifs pour les récepteurs NK-1 et NK-2) demeurent impuissants contre les réponses à cet agoniste. Par conséquent, même si l'effet agonistique du [MePhe<sup>7</sup>]NKB ne semble plus correspondre tout à fait à ce que nous observions auparavant, les conclusions tirées aux chapitres 3 et 5 demeurent valides, en ce sens, que les réponses originales étaient bel et bien induites suivant l'activation du récepteur NK-3. Des études sont présentement en cours, visant à mieux caractériser le récepteur NK-3 central dans la perspective des nouveaux effets obtenus avec la nouvelle source du [MePhe<sup>7</sup>]NKB.

L'importance des tachykinines endogènes dans la régulation cardiovasculaire et comportementale centrale chez le rat représente une autre région grise dans notre compréhension de ces peptides dans le SNC du rat. L'impuissance des antagonistes des tachykinines à induire des effets cardiovasculaires ou comportementaux directs suggère que cette famille de peptides n'est pas impliquée toniquement dans la régulation cardiovasculaire ou comportementale chez le rat éveillé dans des conditions basales. Toutefois, ces résultats ne permettent pas pour autant d'évaluer l'action cardiovasculaire et comportementale tonique des tachykinines dans des situations de stress et de fuite chez ces animaux. En effet, tel que discuté au premier chapitre, ces peptides semblent impliqués dans la réaction de défense chez le rat (Unger et coll., 1988). Même si certaines études ont démontré une relâche de SP dans plusieurs régions du SNC du rat suivant l'application d'un stress (Bannon et Roth, 1983; Bannon et coll., 1986; Takayama et coll., 1986; Seigel et coll., 1987; Rosén et al., 1992), nos connaissances sur cet aspect de la régulation centrale des tachykinines demeurent très restreintes. Une modification dans la relâche ou dans la dégradation des tachykinines pourrait

expliquer ces altérations des niveaux de tachykinines dans le SNC du rat<sup>1</sup>. A l'aide des nouveaux antagonistes non-peptidiques des tachykinines, il devient maintenant possible de confirmer cette hypothèse quant au rôle des tachykinines dans les structures supraspinales du SNC chez le rat. De plus, des techniques nouvelles de microdialyse nous permettant de mesurer avec précision la relâche de neurotransmetteurs *in vivo* représentent un autre outil essentiel pour mieux comprendre le rôle physiologique des tachykinines dans l'intégration de la réaction de défense. De par sa grande multiplicité de neurotransmetteurs et par la complexité inhérente des circuits neuronaux impliqués, ce domaine d'étude demeure excessivement complexe et par conséquent doit être approché avec beaucoup de prudence.

## 2. Pharmacologie supraspinale des tachykinines

Contrairement aux effets spinaux des tachykinines qui semblent dériver essentiellement de l'activation du récepteur NK-1, les trois récepteurs des tachykinines semblent participer au contrôle cardiovasculaire et comportemental de ces peptides au niveau supraspinal. Cette affirmation découle des observations suivantes :

1. Tous les agonistes naturels induisent des réponses cardiovasculaires et comportementales après administration i.c.v.
2. Les antagonistes des récepteurs NK-1 ((±)-CP-96,345, RP-67,580), NK-2 (SR-48,968; R-396) et NK-3 (R-486, R-487, R-820) bloquent sélectivement les effets centraux des agonistes des récepteur NK-1 (SP et NPK), NK-2 (NKA et NPY) et NK-3 (NKB, [MePhe<sup>7</sup>]NKB et senktide), respectivement.

En effet, les antagonistes des récepteurs NK-1 et NK-2 abaissent d'environ 40-50% les réponses à la SP et à la NKA, respectivement (chapitres 2 et 3). Ce n'est qu'avec

---

<sup>1</sup> Les modifications rapides des taux de tachykinines suivant l'application d'un stress élimine la possibilité qu'une altération dans la synthèse de ces peptides en soit responsable.



la combinaison d'antagonistes pour les récepteurs NK-1 et NK-2 que l'on est parvenu à abolir complètement les réponses de la SP et de la NKA (chapitre 3). Cette observation intéressante suggère que la SP active principalement le récepteur NK-1, mais qu'une action mineure sur le récepteur NK-2 est démasquée lorsque le récepteur NK-1 est occupé par un antagoniste sélectif. Inversement, en plus d'activer le récepteur NK-2, la NKA peut aussi stimuler le récepteur NK-1 lorsque le récepteur NK-2 est bloqué. Ces observations ne sont toutefois pas surprenantes car ces agonistes naturels ne sont pas très sélectifs sur des préparations contenant les trois sites de liaison (Guard et Watson, 1991). Curieusement, seuls les comportements sont sensibles aux antagonistes des récepteurs NK-1 et NK-2. Alors que l'antagoniste NK-1 bloque sélectivement le débarbouillage induit par la SP, le SR-48,968 bloque le débarbouillage et le toilettage des membres inférieurs induits par la NKA. Cette distinction pharmacologique disparaît lorsque l'on administre la combinaison d'antagonistes SR-48,968 et RP-67,580 comme prétraitement. En effet ce mélange d'antagonistes bloque les deux comportements autant pour la SP que pour la NKA. Cette hypothèse d'activation bi-réceptorielle par la SP et la NKA a été proposée par l'équipe de Unger (Culman et coll., 1993). Selon eux les faibles différences entre les effets comportementaux de la SP et de la NKA constituent une évidence de cette dualité réceptorielle. De plus leur capacité hétérogène à provoquer une désensibilisation supporte l'hypothèse de la présence fonctionnelle de ces deux types de récepteurs. En effet, la SP désensibilise beaucoup plus efficacement que la NKA<sup>2</sup>, ce qui est conforme avec le nombre de sites de phosphorylation beaucoup plus important sur le récepteur NK-1 que sur le récepteur NK-2 (voir chapitre 1, section 4i (b)) et avec des études de désensibilisation pour les récepteurs NK-1 et NK-2 *in vitro* (Nakanishi, 1991).

L'importante distribution des récepteurs NK-1 dans le SNC du rat (Dam et coll., 1990c; Maeno et coll., 1993; Nakaya et coll., 1994) suggère un rôle majeur pour les agonistes naturels du récepteur NK-1 (tel que la SP) dans plusieurs fonctions du SNC chez le rat (voir chapitre 1, section 5i). Dans cette étude, avec l'utilisation

---

<sup>2</sup> Cette observation s'applique autant pour l'auto-désensibilisation que pour la tachyphylaxie croisée (Culman et coll., 1993)



d'antagonistes non peptidiques ( $\pm$ )-CP-96,345, RP-67,580 et de leurs énantiomères inactifs<sup>3</sup> ( $\pm$ )-CP-96,344 et RP-68,651) nous apportons une solide confirmation pharmacologique de la participation centrale du récepteur NK-1 dans le contrôle cardiovasculaire et comportemental chez le rat. Tout récemment, l'équipe de Unger a confirmé nos résultats avec l'utilisation de l'antagoniste RP-67,580 et son énantiomère inactif (Culman et coll., 1995). Toutefois, selon eux, la seule dose qui bloque efficacement les réponses centrales à la SP est 100 pmol alors que nous avons utilisé 6.5 nmol du même antagoniste sans difficulté. Cette équipe montre que les doses de 2.5 nmol et plus ont un effet potentiateur sur les réponses cardiovasculaires centrales de la SP. Nous n'avons pas pu reproduire leurs résultats après plusieurs essais. Dans nos études, la dose de 6.5 nmol réduit significativement (environ 50%) les réponses centrales à la SP alors que la dose de 100 pmol ne bloque pas les effets de la SP. Cette divergence concernant la dose de l'antagoniste à utiliser demande toujours à être résolue.

L'originalité de notre étude réside très certainement dans la démonstration de sites fonctionnels NK-2 dans le SNC du rat malgré la faible quantité de récepteurs NK-2 qui a été rapportée par immunohistochimie et par des études de liaisons (Dam et coll., 1990; Quirion et coll., 1991; Guard et coll., 1993; Dam et Quirion, 1994). La sensibilité des effets de la NKA à l'antagoniste R-396 et sa résistance aux antagonistes MEN-10,207 et MEN-10,376, confère à ce récepteur NK-2 une compatibilité pharmacologique avec le sous-type NK-2B (chapitre 2). Ce sous-type correspond au récepteur NK-2 retrouvé en périphérie chez le rat (voir chapitre 1, section 4i(a)).

Les effets du NPK sont insensibles aux antagonistes SR-48,968 et R-487 et presque complètement abolis (80-90%) par le ( $\pm$ )-CP-96,345 ou le RP-67,580, suggérant que ce peptide est un meilleur agoniste pour le récepteur NK-1 que la SP dans le SNC du rat (Prat et coll., 1994; chapitre 5). Pour sa part, le NP $\gamma$  semble agir principalement via l'activation du récepteur NK-2 et possiblement via l'activation d'un autre site

---

<sup>3</sup> De fortes doses de ces énantiomères n'affectaient pas les réponses cardiovasculaires à la SP (voir figure 6, chapitre 5).

toujours non-identifié qui ne correspond pas aux récepteurs NK-1 ou NK-3 (chapitre 4). Les évidences suivantes nous ont permis d'émettre une telle affirmation :

1. Tout en demeurant insensibles aux antagonistes des récepteurs NK-1 (RP-67,580) et NK-3 (R-820), les effets i.c.v. du  $\text{NP}\gamma$  sont réduits d'environ 50% par l'antagoniste SR-48,968, sélectif pour le récepteur NK-2.
2. Un traitement combiné avec les antagonistes NK-1 (RP-67,580) et NK-2 (SR-48,968) ou avec les antagonistes NK-1, NK-2 et NK-3 (RP-67,580, SR-48,968 et R-820) ne réduit pas davantage les réponses au  $\text{NP}\gamma$  central lorsque comparé au traitement avec l'antagoniste NK-2 seul.
3. Une désensibilisation des récepteurs NK-1 et NK-2 centraux réduit la réponse i.c.v. du  $\text{NP}\gamma$  d'une façon similaire à celle d'un traitement avec l'antagoniste NK-2 (SR-48,968) où des effets résiduels significatifs persistent.

Le récepteur NK-3 a aussi été mis en évidence dans notre modèle expérimental. En effet, les réponses cardiovasculaires et comportementales aux agonistes du récepteur NK-3 ( $[\text{MePhe}^7]\text{NKB}$  et *senktide*) et à la NKB sont bloquées par les antagonistes du même récepteur (R-487, R-820) et demeurent inchangées par des antagonistes des deux autres récepteurs (RP-67,580 et/ou SR-48,968). Tout comme pour le récepteur NK-2, il existe très peu d'études sur le récepteur NK-3 dans notre modèle expérimental. Les seules études utilisant des antagonistes sélectifs pour les récepteurs NK-2 et NK-3 au niveau central chez le rat éveillé sont issues de notre laboratoire.

Il est clair que les agonistes naturels SP, NKA et NKB interagissent préférentiellement avec les récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3, respectivement, toutefois, en plus d'interagir avec les récepteurs NK-1 et/ou NK-2, plusieurs évidences suggèrent que la forme allongée de la NKA ( $\text{NP}\gamma$ ), pourrait en plus interagir avec un nouveau site de liaison différent des récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3 (Takeda et Krause, 1989).

### 3. Sites d'action des tachykinines

La présence de SP, de NKA et de NKB, des ARMm PPT-A et PPT-B ainsi que des récepteurs NK-1 et NK-3 ont été rapportées dans une grande variété de noyaux du SNC du rat dont l'hypothalamus (Warden et Young, 1988; Harlen et coll., 1989; Dam et coll., 1990a, b; Marksteiner et coll., 1992; Merchenthaler et coll., 1992; Larsen et coll., 1992; Lucas et coll., 1992; Maeno et coll., 1993; Marchand et coll., 1993; Nakaya et coll., 1994; Lantos et coll., 1995; voir chapitre 1, section 5i). Malgré la controverse initiale des premières études sur la distribution du récepteur NK-2 dans le SNC du rat, il apparaît clair aujourd'hui que ce récepteur est bien présent dans ce tissu bien que sa présence soit extrêmement faible et difficile à détecter comparativement aux récepteurs NK-1 et NK-3 (Dam et Quirion, 1994). L'hippocampe du rat serait la région contenant la plus grande densité de récepteur NK-2.

L'initiation rapide de la réponse après l'injection i.c.v. des tachykinines et de ses analogues suggère un site d'action à proximité du site d'injection soit probablement dans des structures périventriculaires (dont l'hypothalamus). Saija et coll. (1989) ont déterminé la distribution de [ $^3\text{H}$ ]-SP, [ $^{125}\text{I}$ ]-NKA ou [ $^3\text{H}$ ]-élédoisine dans différentes régions du cerveau après administration i.c.v. Les trois régions les plus marquées par ces trois ligands étaient l'hypothalamus, le striatum et l'hippocampe où le maximum de marquage était atteint dans les 2 à 5 minutes post-administration. Toutefois les patrons de distribution varient selon le ligand et ainsi, la [ $^3\text{H}$ ]-SP marquait préférentiellement dans l'ordre, l'hypothalamus, l'hippocampe, le striatum, et la région bulbaire. Pour sa part, la [ $^{125}\text{I}$ ]-NKA marquait préférentiellement la région hypothalamique, toutefois toutes les régions analysées atteignaient un maximum de marquage 2 min suivant l'injection i.c.v. du ligand. Finalement le ligand [ $^3\text{H}$ ]-élédoisine s'imprégnait d'une façon privilégiée aux régions de l'hippocampe, de l'hypothalamus, du striatum et de l'amygdale du SNC du rat. Si on interprète comme étant importantes les régions qui démontrent une augmentation de marquage entre les périodes de 2 à 5 min, on peut retenir : l'hypothalamus, l'amygdale, le cortex frontal et la région bulbaire. Quoiqu'il en soit, une action en périphérie est très improbable car l'administration i.v. de SP, de NKA, de NPK ou de [MePhe<sup>7</sup>]NKB provoque une baisse

de la PA (Couture et coll., 1989; Décarie et Couture, 1992). De plus, on peut aussi exclure une action spinale car des doses de 6.5 nmol de SP, sont requises pour induire des augmentations de 10-15 mmHg (Hasséssian et coll., 1988) (voir chapitre 5). En fait, les portions antérieures (HA) et ventromédiane (HVM) de l'hypothalamus pourraient bien représenter les principaux sites d'action de la SP car une application locale du peptide produit des effets cardiovasculaires et comportementaux similaires à ceux observés lors d'administrations i.c.v. (Itoi et coll., 1991; 1994). Une application similaire de SP dans l'aire préoptique médiane (aPO) induit des réponses comportementales de reniflement et de redressement plus importantes que lors d'une application intra-HA. De plus, les autres réponses comportementales et hémodynamiques apparaissent plus tard dans ce noyau (aPO) par rapport à l'application de SP dans l'HA (Itoi et coll., 1994), suggérant que la réponse intégrée suivant l'administration i.c.v. de SP résulterait d'une activation simultanée de plusieurs noyau différents. Puisque les réponses hypothalamiques de la SP sont inférieures aux effets i.c.v. de la SP, des sites extrahypothalamiques semblent impliqués. Malgré la grande quantité de SP retrouvée dans l'aire tegmentaire ventrale (aTV), sa proximité au mur périventriculaire et son rôle bien connu dans la régulation comportementale, il est peu probable que ce site soit impliqué dans les effets comportementaux de la SP. En effet, même si plusieurs équipes ont démontré une activation locomotrice suivant l'application intra-aTV de SP (Stinus et coll., 1978; Deutch et coll., 1985; Kalivas et coll., 1985; Takano et coll., 1985), l'étude du groupe de Unger qui utilise des doses de SP beaucoup inférieures<sup>4</sup> (550 pmol), qui s'approchent des doses que nous utilisons par la voie i.c.v. (25 pmol), n'observe pas d'effets comportementaux ou cardiovasculaires lorsque la SP est appliquée localement dans cette région du SNC du rat (Itoi et coll., 1994).

---

<sup>4</sup> Itoi et coll. (1994) ont utilisé des doses 10 fois inférieures aux études précédentes, soit 550 pmol.

#### 4. Le losartan, un ligand pour le récepteur NK-3

Le sixième chapitre démontre une interaction fonctionnelle du losartan et dans une plus faible mesure, de son métabolite EXP-3174, avec le récepteur NK-3 des tachykinines, confirmant ainsi des études de liaisons effectuées dans le laboratoire de Regoli (Chrétien et coll., 1994). En effet, en plus d'inhiber les réponses centrales à l'AII, le losartan bloque aussi les réponses cardiovasculaires et comportementales i.c.v. de [MePhe<sup>7</sup>]NKB sans pour autant affecter les réponses i.c.v. de la SP ou de la NKA. Cette affinité modérée du losartan pour le récepteur NK-3 peut s'expliquer par des similitudes moléculaires entre les récepteurs NK-3 et AT-1 du mammifère. Les exigences moléculaires permettant la liaison entre le losartan et le récepteur AT-1 ont été récemment décrites par Ji et coll. (1994) en utilisant des formes mutées du récepteur. Des mutations ponctuelles au niveau d'une valine dans la troisième région transmembranaire (TM III) ou d'une alanine dans la région TM IV sur le récepteur AT-1 a suffisamment déstabilisé la structure quaternaire du récepteur AT-1 exprimé sur des cellules COS pour réduire la liaison du losartan avec ce récepteur. Il est intéressant de noter que l'on retrouve ces acides aminés dans le récepteur NK-3 (Val<sup>118</sup> dans la région TM III et Ala<sup>153</sup> dans la région TM IV) alors que ces résidus sont absents dans les récepteurs NK-1 et NK-2 (Nakanishi, 1991). De plus, d'autres études utilisant des formes tronquées du récepteurs AT-1, ont révélé une importance relative des régions basses des segments TM VI et TM VII pour établir la liaison entre les antagonistes non peptidiques pour le récepteur AT-1, alors que ces substitutions n'affectent pas l'interaction entre l'AII et ce récepteur (Schambye et coll., 1994). Toutefois, c'est la région haute du segment TM VI qui semble importante dans la liaison des antagonistes non peptidiques pour les récepteurs NK-1 et NK-2. Des mutations dans cette région du récepteur ont réduit considérablement ou même aboli la liaison avec les antagonistes non peptidiques alors qu'elles n'ont pas affecté la liaison avec l'agoniste naturel (Fong et coll., 1992; Zoffmann et coll., 1993; Gether et coll., 1993; Fong et Strader, 1994).

5. Absence d'interaction entre les tachykinines et l'AII dans la régulation cardiovasculaire supraspinale

Il n'est pas surprenant de voir que l'antagoniste peptidique R 486 réduit efficacement les effets du [MePhe<sup>7</sup>]NKB sans pour autant affecter ceux de l'AII. Ces résultats suggèrent que l'AII n'active pas une voie tachykinergique (libérant de la NKB) pour ainsi produire ses effets cardiovasculaires et comportementaux. Inversement, les effets cardiovasculaires et le comportement de secousse corporelle produits par l'administration i.c.v. de [MePhe<sup>7</sup>]NKB ne semblent pas être reliés à l'activation d'une voie libérant de l'AII car le losartan et son métabolite, le EXP-3174, n'affectaient pas les réponses au [MePhe<sup>7</sup>]NKB à des doses qui pourtant bloquaient les effets de l'AII. Par ailleurs, le SP et la NKA demeurent insensibles à l'action du losartan ou du EXP-3174 à des doses qui bloquent l'AII, éliminant ainsi la possibilité d'une interaction entre les voies de transmission tachykinergiques et AII-ergiques dans le contrôle cardiovasculaire et comportemental au niveau supraspinal. Unger et coll. (1981; 1985) avaient déjà démontré des différences fondamentales entre les mécanismes centraux par lesquels l'AII et la SP agissent sur la régulation cardiovasculaire et sur la fonction autonome. Il est possible que ces deux neuropeptides contrôlent les fonctions autonomes dans des états physiologiques différents. Ainsi, alors que l'AII semble impliquée dans le contrôle de la soif et dans le rétablissement du volume liquidien dans des états de déshydratation, les tachykinines ont été associées à l'état d'éveil suivant la transmission nociceptive (Foreman et Blair, 1988), le stress (Herd, 1991) et la réaction de défense (Unger et coll., 1981).

Si l'on compare les effets i.c.v. de l'AII avec ceux du [MePhe<sup>7</sup>]NKB, on remarque cependant des similitudes et des distinctions saisissantes : les deux neuromédiateurs induisent une relâche de vasopressine en circulation (Unger et coll., 1981; Harland et coll., 1988; Nakayama et coll., 1992), les agonistes du récepteurs NK-3 inhibent la soif alors que l'AII est pro-dipsogénique. D'une façon générale, ces peptides semblent avoir des rôles parallèles mais opposés dans le contrôle des volumes liquidiens. En effet, alors que l'activation des récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3 réduisent l'appétit sodé et la soif (Fitzsimons et Evered, 1978; Massi et coll., 1988; 1991; Epstein, 1991; Walsh et

coll., 1992), l'AII, pour sa part, stimule l'appétit du sel et stimule la soif (Wright et Harding, 1992).

## 6. Conclusions générales

L'utilisation d'agonistes naturels et sélectifs des tachykinines et d'antagonistes sélectifs pour chacun des trois récepteurs nous ont permis de mettre en évidence la présence fonctionnelle des récepteurs NK-1, NK-2B et NK-3 dans les mécanismes centraux de régulation cardiovasculaire et comportemental chez le rat éveillé en plus de proposer l'existence d'un autre site de liaison sélectif pour le  $\text{NP}\gamma$  dans le même modèle expérimental. Ce dernier site pourrait bien représenter un nouveau récepteur, sélectif pour le  $\text{NP}\gamma$ , qui a déjà été proposé par une autre équipe grâce à des études de liaison (Takeda et Krause, 1991). Nous sommes toutefois les premiers à réunir les évidences menant à la suggestion de sa présence fonctionnelle.

Les agonistes naturels SP, NKA, NKB, NPK et  $\text{NP}\gamma$  agissent via l'activation de récepteurs ou de combinaisons de récepteurs qui leurs sont propres; ainsi, la modulation des fonctions cardiovasculaires et comportementales par cette famille de peptides au niveau supraspinal constitue un système de régulation excessivement complexe (voir figure 7, chapitre 5). Cette étude nous a donc permis de démêler la pharmacologie de cette modulation fine exercée par les tachykinines sur les paramètres cardiovasculaires et comportementaux chez l'animal éveillé et même de permettre une dissociation pharmacologique des effets des tachykinines avec ceux de l'AII dans ce modèle expérimental. Du même coup, nous avons caractérisé dans le SNC du rat éveillé une série d'antagonistes sélectifs pour les récepteurs NK-1 (RP-67,580), NK-2 (SR-48,968, R-396, MEN-10,376) et NK-3 (R-486, R-487 et R-820) où nous avons pu mettre en évidence leur propriétés pharmacologiques in vivo dans le SNC du rat (sélectivité, spécificité, toxicité ou pas, durée d'action). Ces études ont démontré, par ailleurs, que le losartan est un antagoniste faible du récepteur NK-3 central du rat et pourrait représenter une nouvelle avenue permettant la synthèse d'une nouvelle classe d'antagonistes non peptidiques pour ce récepteur.

L'ensemble de ces résultats apportent des nouvelles connaissances pharmacologiques et physiologiques sur les tachykinines et leurs récepteurs dans le SNC. La facette pharmacologique de cette étude servira de schéma directeur pour toutes les études à venir dans le SNC du rat éveillé. Les développements pharmacologiques à retenir sont : 1) la démonstration d'une présence fonctionnelle forte du récepteur NK-2 dans le SNC du rat malgré les études anatomiques controversées, 2) la proposition d'un site récepteuriel sélectif pour le  $\text{NP}\gamma$ , et 3) l'interaction fonctionnelle entre le losartan et le récepteur NK-3 central du rat. Evidemment, plusieurs questions demeurent sans réponses : Quel sont les sites précis impliqués dans l'initiation des réponses i.c.v. des tachykinines? A quoi correspond le site de liaison du  $\text{NP}\gamma$ ? s'agit-il d'un récepteur classique à sept domaines transmembranaires, ou d'une autre entité protéique?



---

**REFERENCES**

---

---

**A**

---

- Adams, P.R., Brown, D.A. et Constanti, A., Pharmacological inhibition of the M-current. *J. Physiol.*, 332: 223-262, 1982.
- Advenier, C., Rouissi, N., Nguyen, Q.T., Emonds-Alt, X., Brelière, J.-C., Neliat, G., Naline, E. et Regoli, D., Neurokinin A (NK<sub>2</sub>) receptor revisited with SR 48968, a potent non-peptide antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184: 1418-1424, 1992.
- Aimi, Y., Fujimura, M., Vincent, S.R. et Kimura, H., Localization of NADPH diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 306: 282-292, 1991.
- Akagi, H., Otsuka, M. et Yanagisawa, M., Identification by high-performance liquid chromatography of immunoreactive substance P released from isolated rat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, 20: 259-263, 1980.
- Akasu, T. et Tokimasa, T., Potassium currents in submucous neurones of guinea-pig caecum and their synaptic modification. *J. Physiol.*, 416: 571-588, 1989.
- Akesson, T.R. et Micevych, P.E., Estrogen concentration by substance P-immunoreactive neurons in the medial basal hypothalamus of the female rat. *J. Neurosci. Res.*, 19: 412-419, 1988.
- Aliakbari, J., Sreedenhahn, S.P., Turck, C.W. et Goetzl, E.J., Selective localization of vasoactive intestinal polypeptide and SP in human eosinophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 148: 1440-1445, 1987.
- Allen, G.V. et Cechetto, D.F., Functional and anatomical organization of cardiovascular pressor and depressor sites in the lateral hypothalamic area. 1. Descending projections. *J. Comp. Neurol.*, 315: 313-332, 1992.
- Anastasi, A., Erspamer, V. et Endean, R., Structure of uperolein a physalaemin-like undecapeptide occurring in the skin of *Uperoleia rugosa* and *Uperoleia marmorata*. *Experimental*, 31: 394-395, 1975.
- Anastasi, A. et Falconieri-Erspamer, G., Occurrence of phyllomedusin a physalaemin-like decapeptide in the skin of *Phyllomedusa bicolor*. *Experimental*, 26: 866-867, 1970.
- Anastasi, A., Montecucchi, P., Erspamer, V. et Visser, J., Amino acid composition and sequence of kassinin, a tachykinin dodecapeptide from the skin of the african frog *Kassina senegalensis*. *Experimental*, 33: 857-858, 1977.
- Anderson, K.D. et Reiner, A., Extensive co-occurrence of substance P and dynorphin in striatal projection neurons: an evolutionarily conserved feature of basal ganglia organisation. *J. Comp. Neurol.*, 295: 339-369, 1990.

- Appell, K.C., Barb, B.E., Goswami, R., Hall, P.L., Lawrence, K.B., Logan, M.E., Przyklek-Elling, R., Tomczuk, B.E., Venepalli, B.R. et Yanni, J.M., Imidazo[4,5-b]quinoxaline cyanines as neurokinin antagonists. *J. Med. Chem.*, 34: 1751-1753, 1991.
- Appell, K.C., Fragale, B.J., Loscig, J., Singh, S. et Tomczuk, B.E., Antagonists that demonstrate species differences in neurokinin 1 receptors. *Mol. Pharmacol.*, 41: 772-778, 1992.
- Arai, H et Emson, P.C., Regional distribution of neuropeptide K and other tachykinins (neurokinin A, Neurokinin B and substance P) in rat central nervous system. *Brain Res.*, 399: 240-249, 1986.
- Arai, H., Emson, P.C. et Carrasco, L.H., Huntington's disease: changes in tachykinin content in post mortem brains. *Ann. Neurol.*, 22: 587-594, 1987.
- Arenas, E., Alberch, J., Perez-Navarro, E., Solsona, C. et Marsal, J., Neurokinin receptors differentially mediate endogenous acetylcholine release evoked by tachykinins in the neostriatum. *J. Neurosci.*, 11: 2332-2338, 1991.

---

## B

---

- Bachwich, D., Merchant, J. et Brand, J., Identification of a cis-regulatory element mediating somatostatin inhibition of epidermal growth factor-stimulated gastrin gene transcription. *Molec. Endocrinol.*, 6: 1775-1784, 1992.
- Badgery-Parker, T., Zeng, X.-P., Lavielle, S. et Burcher, E., A novel, selective radioligand, [<sup>125</sup>I]-[Lys<sup>5</sup>, Tyr(I)<sup>7</sup>, MeLeu<sup>9</sup>, Nle<sup>10</sup>]-NKA(4-10), for the NK-2 receptor. *Regul. Pept.*, 46: 455-457, 1993.
- Bannon, M.J., Elliott, P.J., Alpert, J.E., Goedert, M., Iversen, S.D. et Iversen, L.L., Role of endogenous substance P in stress-induced activation of mesocortical dopamine neurons. *Nature Lond.*, 306: 791-792, 1983.
- Bannon, M.J., Haverstick, D.M., Shibata, K. et Poosch, M.S., Preprotachykinin gene expression in the forebrain: regulation by dopamine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 632: 31-7, 1991.
- Barber, R.P., Vaughn, J.E., Slemmon, P.M., Salvaterra, P.M., Roberts, E. and Leeman, S.E., The origin, distribution and synaptic relationship of substance P axons in rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 184: 331-351, 1979.
- Barja, F. et Mathison, R., Adrenergic and peptidergic (substance P and vasoactive intestinal polypeptide) innervation of the rat portal vein. *Blood Vessels*, 19: 263-272, 1982.
- Baron, S.A., Jaffe, B.M. et Gintzler, A.R., Release of substance P from the enteric nervous system: direct quantitation and characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 227: 365-368, 1983.
- Bartfai, T., Iverfeldt, K., Fisone, G. et Serfözö, P., Regulation of the release of coexisting neurotransmitters. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 28: 285-310, 1988.
- Barthó, L. et Holzer, P., Search for a physiological role of substance P in gastrointestinal motility. *Neuroscience*, 16: 1-32, 1985.

- Baruch, P., Artaud, F., Godeheu, G., Barbeito, L., Glowinski, J. et Chéramy, A., Substance P and neurokinin A regulate by different mechanisms dopamine release from dendrites and nerve terminals of the nigrostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience*, 25: 889-898, 1988.
- Battaglia, G. et Rustioni, A., Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J. Comp. Neurol.*, 277: 302-312, 1988.
- Beach, T.G. et McGeer, E.G., The distribution of substance P in the primate basal ganglia: an immunohistochemical study of baboon and human brain. *Neuroscience*, 13: 29-52, 1984.
- Beach, T.G., Tago, H. et McGeer, E.G., Light microscopic evidence for a substance P-containing innervation of the human nucleus of Meynert. *Brain Res.*, 408: 251-257, 1987.
- Beaujouan, J.C., Torrens, Y., Saffroy, M. et Glowinski, J., Quantitative autoradiographic analysis of the distribution of binding sites for [<sup>125</sup>I]bolton hunter derivatives of eledoisin and substance P in the rat brain. *Neuroscience*, 18: 857-875, 1986.
- Beaujouan, J.C., Torrens, Y., Viger, A. et Glowinski, J., A new type of tachykinin binding site in the rat brain characterized by specific binding of a labeled eledoisin derivative. *Mol. Pharmacol.*, 26: 248-254, 1984.
- Beding-Barenkow, B. et Brodin, E., Neurokinin A, neurokinin B and neuropeptide K in the rabbit iris: a study comparing different extraction methods. *Regul. Pept.*, 25: 199-206, 1989.
- Benovic, J.L., Bouvier, M., Caron, M.G. et Lefkowitz, R.J., Regulation of adenylyl cyclase-coupled-adrenergic receptors. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 4: 405-428, 1988.
- Beresford, I.J.M., Birch, P.J., Hagan, R.M. et Ireland, S.J., Investigation into species variants of tachykinin NK<sub>1</sub> receptor by use of non-peptide antagonist, CP-96,345. *Br. J. Pharmacol.*, 104: 292-293, 1991.
- Beresford, I.J.M., Ireland, S.J., Stables, J. et Hagan, R.M., Ontogeny and characterization of <sup>125</sup>I-bolton hunter-eledoisin binding sites in rat spinal cord by quantitative autoradiography. *Neuroscience*, 46: 225-232, 1992.
- Beresford, I.J.M., Sheldrick, R.L.G., Ball, D.I., Turpin, M.P., Walsh, D.M., Hawcock, A.B., Coleman, R.A., Hagan, R.M. et Tyers, M.B., GR 159897, a potent non-peptide antagonist at tachykinin NK<sub>2</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 272: 241-248, 1995.
- Berget, S., Moore, C. et Sharp, P., Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 3171-3175, 1977.
- Bergmann, J., Bienert, M., Niedrich, H., Mehlis, B. et Oheme, P., Ueber den einfluss der kettenlänge bei C-terminalensequenzen der substanz P in vergleich mit analogen physalaemin- und eledoisin-peptiden auf die wirksamkeit am meerschweinschen-ileum. *Experientia*, 30: 401-403, 1974.
- Bergstrom, L., Torrens, Y., Saffroy, M., Beaujouan, J.C., Lavielle, S., Chassaing, G., Morgat, J.L., Glowinski, J. et Marquet, A., <sup>3</sup>H-Neurokinin B and <sup>125</sup>I-Bolton Hunter eledoisin label identical tachykinin binding sites in the rat brain. *J. Neurochem.*, 48: 125-133, 1987.

- Bernardi, L., Bosisio, G., Chillemi, F., DeCaro, G., DeCastiglione, R., Erspamer, V., Glaesser, A. et Goffredo, O., Synthetic peptides related to eledoisin. *Experientia*, 21: 695-697, 1965.
- Bernardi, L., Bosisio, G., Chillemi, F., DeCaro, G., DeCastiglione, R., Erspamer, V. et Goffredo, O., Synthetic peptides related to eledoisin. Physalaemin-like peptides. *Experientia* 22: 29-31, 1968.
- Bertaccini, G., Active polypeptides of non-mammalian origin. *Pharmacol. Rev.*, 28: 127-177, 1976.
- Birch, P.J., Beresford, I.J.M., Bowers, J.S., Hagan, R.M., Harrison, S.M. et Rogers, H., Lack of effect of a selective NK-2 receptor antagonist in acute nociceptive tests. *Neuropeptides*, 24: 219, 1993.
- Birch, P.J., Beresford, I.J.M., Rogers, H., Hagan, R.M., Bailey, F., Hayes, A.G., Harrison, S.M. et Ireland, S.J., Profile of activity of the peptide NK-1 receptor antagonist, GR82334, in acute nociceptive tests. *Br. J. Pharmacol.*, 105: 134P, 1992.
- Bird, G.S., Takemura, H., Thastrup, O., Putney, J.W., Jr. et Menniti, F.S., Mechanism of activated  $Ca^{2+}$  entry in the rat pancreatoma cell line, AR4-2J. *Cell Calcium*, 13: 49-58, 1991.
- Björklund, A., Hökfelt, T. et Owman, C., (Editeurs), *Handbook of chemical neuroanatomy. The peripheral nervous system*. New York, Elsevier, 1988, vol. 6.
- Björkroth, U., Rosell, S., Xu, J.C. et Folkers, K., Pharmacological characteristics of four related substance P antagonists. *Acta Physiol. Scand.*, 116: 167-173, 1982.
- Bley, K.R. et Tsien, R.W., Inhibition of  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  channels in sympathetic neurons by neuropeptides and other ganglionic transmitters. *Neuron*, 4: 379-391, 1990.
- Bloom, F.E., *The neurosciences*, Eds. Schmidt, F. et Worden, F., MIT Press, Cambridge, Angleterre, pp. 51-58, 1979.
- Bolam, J.P., Ingham, C.A., Izzo, P.M., Levei, A.I., Rye, B.D., Smith, A.D. et Wainer, B.H., Substance P-containing terminals in synaptic contact with cholinergic neurons in the neostriatum and basal forebrain: a double immunocytochemical study in the rat. *Brain Res.*, 397: 279-289, 1986.
- Bonner, T.I., Affolter, H.-U., Young, A.C. and Young III, W.S., A cDNA encoding the precursor of the rat neuropeptide neurokinin B. *Mol. Brain Res.*, 2: 243-249, 1987.
- Bowker, R.M., Westlund, K.N., Sullivan, M.C. et Coulter, J.D., A combined retrograde transport and immunocytochemical staining method for demonstrating the origins of serotonergic projections. *J. Histochem. Cytochem.*, 30, 805-810, 1982.
- Bowker, R.M., Westlund, K.M., Sullivan, M.C., Wilbert, J.F. et Coulter, J.D., Descending serotonergic, peptidergic and cholinergic pathways from the raphe nuclei: a multiple transmitter complex. *Brain Res.*, 288: 33-48, 1983.
- Brene, S., Lindefors, N., Herrera-Marschitz, M. et Persson H, Differential regulation of preprotachykinin-A mRNA expression in striatum by excitation of hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 5: 839-845, 1993.

- Brimijoin, S., Lundberg, J.M., Brodin, E., Hökfelt, T. et Nilsson, G., Axonal transport of substance P in the vagus and siliac nerves of the guinea pig. *Brain Res.*, 191: 443-457, 1980.
- Bristow, D.R., Curtis, N.R., Suman-Chauhan, N., Watling, K.J. et Williams, B.J., Effects of tachykinins on inositol phospholipids hydrolysis in slices of hamster urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.*, 90: 211-217, 1987.
- Brodin, E., Lindfors, N., Dalsgaard, C.J., Theodorsson-Norheim, E. et Rosell, S., Tachykinin multiplicity in rat central nervous system as studied using antisera raised against SP and NKA. *Regul. Pept.*, 13: 253-272, 1986.
- Brown, D.A. et Adams, P.R., Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K<sup>+</sup> current in a vertebrate neurone. *Nature*, 283: 673-676, 1980.
- Brown, D.A. et Higashida, H., Inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol mimic bradykinin effects on mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid cells. *J. Physiol.*, 397: 185-207, 1988.
- Brownstein, M.J., Mroz, E.A., Kizer, J.S., Palkovits, M. et Leeman, S.E., Regional distribution of substance P in the brain of the rat. *Brain Res.*, 116: 299-305, 1976.
- Brownstein, M.J., Mroz, E.A., Tappaz, M.L., et Leeman, S.E., On the origin of substance P and glutamic acid decarboxylase (GAD) in the substantia nigra. *Brain Res.*, 135: 315-323, 1977.
- Buck, S.H., Burcher, E., Shults, C.W., Lovenberg, W. et O'Donohue, T.L., Novel pharmacology of substance K-binding sites: a third type of tachykinin receptor. *Science Wash. DC*, 226: 987-989, 1984.
- Buck, S.H., Fanger, B.O. et VanGiersbergen, P.L.M., Pharmacological and biochemical evidence for multiple types of tachykinin NK<sub>2</sub> receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 632: 112-115, 1991
- Buck, S.H., Harbeson, S.L., Hassmann, C.F., III, Shatzer, S.A., Rouissi, N., Nantel, F. et VanGiersbergen P.L.M., [Leu<sup>9</sup>ψ(CH<sub>2</sub>NH)Leu<sup>10</sup>]-neurokinin A(4-10) (MDL 28,564) distinguishes tissue tachykinin peptide receptors. *Life Sci.*, 47, PL37-PL41, 1990.
- Buck, S.H., Helke, C.J., Burcher, E., Shultz, C.W. et O'Donohue, T.L., Pharmacologic characterization and autoradiographic distribution of binding sites for iodinated tachykinins in rat central nervous system. *Peptide*, 7: 1109-1120, 1986.
- Bucsics, A., Saria, A. et Lembeck, F., Substance P in the adrenal gland: origin and species distribution. *Neuropeptides*, 1: 329-341, 1981.
- Buell, G., Schulz, M.F., Arkinstall, S.J., Maury, K., Missotten, M., Adami, N., Talabot, F. et Kawashima, E., Molecular characterization, expression and localization of human neurokinin-3 receptor. *FEBS Lett.*, 299: 90-95, 1992.
- Bunermann, B., Fuxe, K. et Ganten, D., The renin-angiotensin system in the brain: an update 1993. *Reg. Pept.*, 46: 487-509, 1993.
- Burcher, E., Buck, S.H., Lovenberg, W. et O'Donohue, T.L., Characterization and autoradiographic localization of multiple tachykinin binding sites in gastrointestinal tract and bladder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236: 819-831, 1986.

Burcher, E. et Mussap, C.J., Neuropeptide  $\gamma$ -preferring subtypes of NK-2 receptors in rat fundus and dog urinary bladder. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 17: 805, 1991.

Bury, R.W. et Mashford, M.L., Biological activity of C-terminal partial sequence of substance P. *J. Med. Chem.*, 19: 854-856, 1976.

---

## C

---

Caeser, M., Seabrook, G.R. et Kemp, J.A., Block of voltage-dependent sodium currents by the substance P receptor antagonist ( $\pm$ )-CP-96,345 in neurones cultured from rat cortex. *Br. J. Pharmacol.*, 109: 918-924, 1993.

Cameron, A.A., Leah, J.D. et Snow, P.J., The coexistence of neuropeptides in feline sensory neurons. *Neuroscience*, 27: 969-979, 1988.

Campbell, K. et Björklund, A., Neurotransmitter-related gene expression in intrastriatal striatal transplants .3. Regulation by host cortical and dopaminergic afferents. *Mol. Brain. Res.*, 29: 273-284, 1995.

Carruette, A., Moussaoui, S.M., Champion, A., Cottez, D., Goniot, P. et Garret, C., Comparison in different tissue preparations of the in vitro pharmacological profile of RP 67580, a new non-peptide substance P antagonist. *Neuropeptides*, 23: 245-250, 1992.

Carter, M.S. et Krause, J.E., Structure, expression and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K and neuropeptide  $\gamma$ . *J. Neurosci.*, 10: 1203-1214, 1990.

Cascieri, M.A. et Liang, T., Binding of [ $^{125}$ I]Bolton-Hunter conjugated eledoisin to rat brain cortex membranes - evidence for two classes of tachykinin receptors in the mammalian nervous system. *Life Sci.*, 35: 179-184, 1984.

Cascieri, M.A., Ber, E., Fong, T.M., Sadowski, S., Bansal, A., Swain, S., Seward, E., Frances, B., Burns, D. et Strader, C.D., Characterization of the binding of a potent, selective, radioiodinated antagonist to the human neurokinin 1 receptor. *Mol. Pharmacol.*, 42: 458-465, 1992a

Cascieri, M.A., Chicchi, G.G. et Liang, T., Demonstration of two distinct tachykinin receptors in rat brain cortex. *J. Biol. Chem.*, 260: 1501-1507, 1985.

Cascieri, M.A., Huang, R.R., Fong, T.M., Cheung, A.H., Sadowski, S., Ber, E. et Strader, C.D., Determination of the amino acid residues in substance P conferring selectivity and specificity for the neurokinin receptors. *Mol. Pharmacol.*, 41: 1096-1099, 1992b.

Celander, O. et Folkow, B., The nature and the distribution of afferent fibers provided with the axon reflex arrangement. *Acta Physiol. Scand.*, 29: 359-370, 1953.

Cervero, F. et Laird, J.M.A., One pain or many pains? A new look at pain mechanisms. *NIPS*, 6: 268-273, 1991.

- Chahl, L.A., Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Pharmacol. Ther.*, 37: 275-300, 1988.
- Champagne, D.E. et Ribeiro, J.M., Sialokinin I et II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes egypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 138-142, 1994.
- Chan-Palay, V., Jonsson, G. et Palay, S.L., Serotonin and substance P coexist in neurons of the rat's central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 1582-1586, 1978.
- Chan-Palay, V. et Palay, S.L., Ultrastructural identification of substance P cells and their processes in rat sensory ganglia and their terminals in the spinal cord by immunocytochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 4050-4054, 1977.
- Chang, M.M., Leeman, S.E. et Niall, H.D., Amino acid sequence of substance P. *Nature Lond.*, 232: 86-87, 1971.
- Chao, H.M. et McEwen, B.S., Glucocorticoid regulation of neuropeptide mRNAs in the rat striatum. *Molec. Brain Res.*, 9: 307-311, 1991.
- Charlton, C.G. et Helke, C.J., Substance P-containing medullary projections to the intermediolateral cell column: Identification with retrogradely transported rhodamin labeled latex microspheres and immunocytochemistry. *Brain Res.*, 418: 245-254, 1987.
- Chassaing, G., Lavielle, S., Loeuillet, D., Robillard, P., Carruette, A., Garret, C., Beaujouan, J.-C., Saffroy, M., Petitet, F., Torrens, Y. et Glowinski, J., Selective agonists of NK-2 binding sites highly active on rat portal vein (NK-3 bioassay). *Neuropeptides*, 19: 91-95, 1991.
- Chassaing, G., Lavielle, S., Brunissen, A., Carruette, A., Garret, C., Petitet, F., Saffroy, M., Beaujouan, J.-C., Torrens, Y. et Glowinski, J., [Pro<sup>9</sup>]SP and [pGlu<sup>6</sup>,Pro<sup>9</sup>]SP(6-11) interact with two different receptors in the guinea-pig ileum as demonstrated with new SP antagonists. *Neuropeptides*. 23: 73-79, 1992.
- Cheeseman, H.J., Pinnock, R.D. et Henderson, G., Substance P excitation of rat locus coeruleus neurones. *Eur. J. Pharmacol.*, 94: 93-99, 1983.
- Chiba, T. et Masuko, S., Coexistence of varying combination of neuropeptides with 5-hydroxytryptamine in neurons of the raphe pallidus et obscurus projecting to the spinal cord. *Neurosci. Res.*, 7: 13-23, 1989.
- Chow, L., Gelinas, R., Broker, T. et Roberts, R., An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*, 12: 1-8, 1977.
- Chrétien, L., Guillemette, G. et Regoli, D., Non peptide angiotensin receptor antagonists bind to tachykinin NK<sub>3</sub> receptors of the rat and guinea pig brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 256: 73-78, 1994.
- Ciccocioppo, R., Polidori, C., Pompei, P., DeCaro, G. et Massi, M., Inhibition of isotonic sodium chloride intake in the rat by selective tachykinin agonists. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 47: 609-615, 1994.
- Clark, S.P., Lewis, C.D. et Felsenfeld, G., Properties of BGPI, a poly(dG)-binding protein from chicken erythrocytes. *Nucleic acids Res.*, 18: 5119-5126, 1990.



- Clerc, F.F., Foucault, F., Ridoux-Silly, L. et Fardin, V., Affinity and stability of some substance P agonists in rat and guinea-pig: a comparative study in central and peripheral tissues. *Neuropeptides*, 22: 14, 1992.
- Clevens, R.A. et Beal, M.F., Substance P-like immunoreactivity in brains with pathological features of parkinson's and alzheimer's diseases. *Brain Res.*, 486: 387-390, 1989.
- Conlon, J.M., Deacon, C.F., O'toole, L. et Thim, L., Scyliorhinin I and II: two novel tachykinins from dogfish gut. *FEBS Lett.*, 200: 116, 1986.
- Conlon, J.M. et Thim, L., Isolation of the tachykinin des[Ser<sup>1</sup>Pro<sup>2</sup>]scyliorhinin II from the intestine of the ray, *Torpedo marmorata*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71: 383-388, 1988.
- Conlon, J.M., Katsoulis, S., Schmidt, W.E. et Thim, L., [Arg<sup>3</sup>]substance P and neurokinin A from chicken small intestine. *Regul. Pept.*, 20: 171-180, 1988.
- Conlon, J.M., O'Harte, F., Peter, R.E. et Kah, O., Carassin: a tachykinin that is structurally related to neuropeptide-gamma of the goldfish. *J. Neurochem.*, 56: 1432-1436, 1991.
- Constantine, J.W., Lebel, W.S., Woody, H.A., Benoit, P.A., Wolfgang, E.A. et Knight, D.R., Cardiovascular effects of CP-96,345, a non-peptide blocker of tachykinin NK<sub>1</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 252: 275-282, 1994.
- Cooper, P.E., Fernstrom, M.H., Rorstad, O.P., Leeman, S.E. et Martin, B.J., The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res.*, 218: 219-232, 1981.
- Couture, R., Boucher, S., Picard, P. et Regoli, D., Receptor characterization of the spinal action of neurokinins in nociception: a three receptor hypothesis. *Regul. Pept.*, 46: 426-429, 1993.
- Couture, R. et Cuello, A.C., Studies on the trigeminal antidromic vasodilatation and plasma extravasation in the rat. *J. Physiol. Lond.*, 346: 273-285, 1984.
- Couture, R., Escher, E. et Regoli, D., Effects of substance P analogues in the rat tail-flick test. *Eur. J. Pharmacol.*, 134: 355-359, 1987.
- Couture, R., Laneuville, D., Guimond, C., Drapeau, G. et Regoli, D., Characterization of the peripheral action of neurokinins and neurokinin receptor selective agonists on the rat cardiovascular system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 94: 675-684, 1989.
- Couture, R. et Regoli, D., Inactivation of substance P and its C-terminal fragments in rat plasma and its inhibition by captopril. *Can. J. Pharmacol. Physiol.*, 59: 621-625, 1981.
- Couture, R. et Regoli, D., Mini review: smooth muscle pharmacology of substance P. *Pharmacology*, 24: 1-25, 1982.
- Coyle, J.T., Price, D.L. et DeLong, M.R., Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science Wash. DC*, 219: 1184-1190, 1983.
- Crawley, J.N., Olschowka, J.A., Diz, D.I. et Jacobowitz, D.M., Behavioral investigation of the coexistence of substance P, corticotropin releasing factor, and acetylcholinesterase in lateral



- dorsal tegmental neurons projecting to the medial frontal cortex of the rat. *Peptides*, 6: 891-901, 1985.
- Cremins, J.D., Michel, J., Farah, J.M. et Krause, J.E., Characterization of substance P-like immunoreactivity and tachykinin-encoding mRNAs in rat medullary thyroid carcinoma cell lines. *J. Neurochem.*, 58: 817-825, 1992.
- Crossman, D.C., Dashwood, M.R., Davies, G.J., Larkin, S., Maseri, A., Spyer, K.M. et Yacoub, M., Coronary vasodilation in vivo by substance P and calcitonin gene-related peptide-(CGRP)-binding sites in human coronary artery. *J. Physiol. Lond.*, 407: 15P, 1988.
- Cruz, C.J. et Beckstead, R.M., Quantitative radioimmunocytochemical evidence that haloperidol and SCH 23390 induce opposite changes in substance P level of rat substantia nigra. *Brain Res.*, 457: 29-43, 1988.
- Cruz, C.J. et Beakstead, R.M., Nigrostriatal dopamine neurons are required to maintain basal levels of substance P in rat substantia nigra. *Neuroscience*, 30: 331-338, 1989.
- Cuello, A.C., Emson, P.C., Paxinos, G. et Jessell, T., Substance P containing and cholinergic projections from the habenula. *Brain Res.*, 149: 413-429, 1978.
- Cuello, A.C., Jessell, T.M., Kanazawa, I. et Iversen, L.L., Substance P: localization in synaptic vesicles in rat central nervous system. *J. Neurochem.*, 29: 747-751, 1977.
- Cuello, A.C. et Kanazawa, I., The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 178: 129-156, 1978.
- Cuello, A.C. et McQueen, D.S., Substance P: a carotid body peptide. *Neurosci. Lett.*, 17: 215-219, 1980.
- Cuello, A.C., Preistley, J.V. et Matthews, M.R., Localization of substance P in neuronal pathways. dans : *Substance P in the nervous system*. Eds. Porter, R. et O'Connor, M., Ciba found. Symp. 91 Pitman, Londres, Angleterre, p.55-83, 1982.

---

## D

---

- Dale, H., Pharmacology and nerve-endings. *Proc. R. Soc. Med.*, 28: 319-332, 1935.
- Dalsgaard, C.-J., The sensory system. dans : *Handbook of chemical neuroanatomy. The peripheral nervous system*. Eds. Björklund, A., Hökfelt, T. et Owman, C., Elsevier, New York, vol. 6, pp. 599-636, 1988.
- Dam, T.-V., Escher, E. et Quirion, R., Evidence for the existence of three classes of neurokinin receptors in the brain. Differential ontogeny of neurokinin-1, neurokinin-2 and neurokinin-3 binding sites in rat cerebral cortex. *Brain Res.*, 453: 372-376, 1988.
- Dam, T.-V., Escher, E. et Quirion, R., Visualization of neurokinin-3 receptor sites in rat brain using the highly selective ligand [<sup>3</sup>H]senktide. *Brain Res.*, 506: 175-179, 1990c.

- Dam, T.-V., Martinelli, B. et Quirion, R., Autoradiographic distribution of brain neurokinin-1/substance P receptors using a highly selective ligand [ $^3\text{H}$ ]-[Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-substance P. *Brain Res.*, 531: 333-337, 1990b.
- Dam, T.-V., Takeda, Y., Krause, J.E., Escher, E. et Quirion, R.,  $\gamma$ -Preprotachykinin-(72-92)-peptide amide: an endogenous preprotachykinin I gene-derived peptide that preferentially binds to neurokinin-2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 246-250, 1990a.
- Dampney, R.A.L., Czachurski, J., Dembowski, K., Goodchild, A.K., et Seller, H., Afferent connections and spinal projections of the vasopressor region in the rostral ventrolateral medulla of the cat. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 20: 73-86, 1987.
- Davis, B.M., Krause, J.E., McKelvy, J.F. et Cabot, J.B., Effects of spinal lesions on substance P levels in the rat sympathetic preganglionic cell column: evidence for local spinal regulation. *Neuroscience*, 13: 1311-1326, 1984.
- Deacon, C.F., Agoston, D.V., Nau, R. et Conlon, J.M., Conversion of neuropeptide K to neurokinin A and vesicular colocalization of neurokinin A and substance P in neurons of the guinea pig small intestine. *J. Neurochem.*, 48: 141-146, 1987.
- Deal, M.J., Hagan, R.M., Ireland, S.J., Jordan, C.C., McElroy, A.B., Porter, B., Ross, B.C., Stephens-Smith, M. et Ward, P., Conformationally constrained tachykinin analogues: potent and highly selective NK-2 receptor agonists. *J. Med. Chem.*, 35: 4195-4204, 1992.
- DeBiasi, S. et Rustioni, A., Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 7820-7824, 1988.
- Décarie, A. et Couture, R., Characterization of the peripheral action of neuropeptide K on the rat cardiovascular system. *Eur. J. Pharmacol.*, 213: 125-131, 1992.
- DeCaro, G., Massi, M. et Micossi, L.G., Antidipsogenic effect of intracranial injections of substance P in rats. *J. Physiol.*, 279: 133-140, 1978.
- DeCaro, G., Micossi, L.G. et Piccinin, G., Antidipsogenic effect of intraventricular administration of eledoisin to rats. *Pharmacol. Res. Commun.*, 9: 489-500, 1977.
- DeKoninck, Y. et Henry, J.L., Substance P-mediated slow excitatory synaptic potential elicited in dorsal horn neurons in vivo by noxious stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 11344-11348, 1991.
- DeLanerolle, N.C. et Lamotte, C.C., The human spinal cord: substance P and methionine-enkephalin immunoreactivity. *J. Neurosci.*, 2: 1369-1386, 1982.
- DelRio, J., Naranjo, J.R., Yang, H.-Y. T. et Costa, E., Substance P-induced release of Met<sup>5</sup>-enkephalin from striatal and periaqueductal gray slices. *Brain Res.*, 279: 121-126, 1983.
- Denton, D., *The hunger for salt*. New York, Springer-Verlag, 1982.
- Desai, M.C., Lefkowitz, S.L., Thadeio, P.F., Longo, K.P. et Snider, K.M., Discovery of a potent substance P antagonist: recognition of the key molecular determinant. *J. Med. Chem.*, 35: 4911-4913, 1992.

- Devillier, P., Advenier, C., Drapeau, G., Marsac, J. et Regoli, D., Comparison of the effects of epithelial removal and of an enkephalinase inhibitor on the neurokinin-induced contractions of guinea-pig isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.*, 94: 675-684, 1988.
- Devillier, P., Drapeau, G., Renoux, M. et Regoli, D., Role of the N-terminal arginine in the histamine releasing activity of substance P, bradykinin and related peptides. *Eur. J. Pharmacol.*, 168: 53-60, 1989.
- Devillier, P., Renoux, M., Giroud, J.P. et Regoli, D., Peptides and histamine release from rat peripheral mast cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 117: 89-96, 1985.
- Difiglia, M., Aronin, N. et Leeman, S.E., Immunoreactive substance P in the substantia nigra of the monkey: light and electron microscopic localization. *Brain Res.*, 233: 381-388, 1982b.
- Difiglia, M., Aronin, N. et Leeman, S.E., Light microscopic and ultrastructural localization of immunoreactive substance P in the dorsal horn of monkey spinal cord. *Neuroscience*, 7: 1127-1139, 1982a.
- Dion, S., D'Orléans-Juste, P., Drapeau, G., Rhaleb, N.E., Rouissi, N., Tousignant, S. et Regoli, D., Characterization of neurokinin receptors in various isolated organs by the use of selective agonists. *Life Sci.*, 41: 2269-2278, 1987.
- Dion, S., Rouissi, N., Nantel, F., Jukic, D., Rhaleb, N.E., Tousignant, C., Telemaque, S., Drapeau, G., Regoli, D., Naline, E., Advenier, C., Rovero, P. et Maggi, C.A., Structure activity study of neurokinins: antagonists for the neurokinin-2 receptor. *Pharmacology*, 41: 184-194, 1990.
- D'Orléans-Juste, P., Dion, S., Drapeau, G. et Regoli, D., Different receptors are involved in the endothelium-mediated relaxation and the smooth muscle contraction of the rabbit pulmonary artery in response to substance P and related neurokinins. *Eur. J. Pharmacol.*, 125: 37-44, 1986.
- D'Orléans-Juste, P., Dion, S., Mizrahi, J. et Regoli, D., Effects of peptides and non peptides on isolated arterial smooth muscles: role of endothelium. *Eur. J. Pharmacol.*, 114: 9-21, 1985.
- Dougherty, P.M., Palacek, J., Paleckova, V., Sorkin, L.S. et Willis, W.D., The role of NMDA, non-NMDA, and NK<sub>1</sub> receptor in the excitation of spinothalamic tract neurons in anesthetized monkeys. *J. Physiol.*, 459: 209P, 1993.
- Dougherty, P.M. et Willis, W.D., Enhancement of spinothalamic neuron responses to chemical and mechanical stimuli following combined microiontophoretic application of N-methyl-D-Aspartate acid and substance P. *Pain*, 47: 85-93, 1991.
- Douglas, W.W., Feldberg, W., Paton, W.D.M. et Schachter, M.S., Distribution of histamine and substance P in the wall of dogs digestive track. *J. Physiol. Lond.*, 115: 163-176, 1951.
- Douglas, F.L., Palkovits, M. et Brownstein, M.J., Regional distribution of substance P-like immunoreactivity in the lower brain stem of the rat. *Brain Res.*, 245: 736-738, 1982.
- Drapeau, G., D'Orléans-Juste, P., Dion, S., Rhaleb, N.E., Rouissi, N.E. et Regoli, D., Selective agonists for substance P and neurokinin receptors. *Neuropeptides*, 10: 43-54, 1987.

- Drapeau, G., Rouissi, N., Nantel, F., Rhaleb, N.-E., Tousignant, C. et Regoli, D., Antagonist for the neurokinin NK-3 receptor evaluated in selective receptor systems. *Regul. Pept.*, 31: 125-135, 1990.
- Duckles, S.P. et Buck, S.H., Substance P in the cerebral vasculature: depletion by capsaicin suggests a sensory role. *Brain Res.*, 245: 171-174, 1982.
- Duggan, A.W., Hope, P.J., Jarrott, B., Schaible, H.G. et Fleetwood-Walker, S.M., Release, spread and persistence of immunoreactive neurokinin A in the dorsal horn of the cat following noxious cutaneous stimulation. Studies with antibody microprobes. *Neuroscience*, 35: 195-202, 1990.
- Duggan, A.W., Morton, C.R., Zhao, Z.Q. et Hendry, I.A., Noxious heating of the skin releases immunoreactive substance P in the substantia gelatinosa of the cat: a study with antibody microprobes. *Brain Res.*, 403: 345-349, 1987.
- Duggan, A.W. et Weihe, E., Central transmission of impulses in nociceptors: events in the superficial dorsal horn, dans : *Toward a new Pharmacotherapy of pain: Beyond morphine.* Eds. Bausbaum, A. et Besson, J.M., Wiley, New York, pp. 35-67, 1991.
- Dun, N.J. et Minota, S., Effects of substance P on neurones of the inferior mesenteric ganglia of the guinea-pig. *J. Physiol.*, 321: 259-271, 1981.
- Duncia, J.V., Carini, D.J., Chiu, A.T., Johnson, A.L., Price, W.A., Wong, P.C., Wexler, R.R. et Timmermans, P.B.M.W.M., The discovery of DuP 753, a potent, orally active nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. *Med. Res. Rev.*, 12: 149-191, 1992.
- Dunlap, K. et Fischback, G.D., Neurotransmitter decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurons. *J. Physiol. Lond.*, 317: 519-535, 1981.
- Dunner, H. et Pernow, B., Circulatory study on substance P in man. *Acta Physiol. Scand.*, 49: 261-266, 1960.

---

## E

---

- Eipper, B.A., Stoffers, D.A. et Mains R.E., The biosynthesis of neuropeptides: peptide  $\alpha$ -amidation. *Ann. Rev. Neurosci.*, 15: 57-85, 1992.
- Elliott, P.J., Mason, G.S., Stephens-Smith, M. et Hagan, R.M., Behavioural and biochemical responses following activation of midbrain dopamine pathways by receptor selective neurokinin agonists. *Neuropeptides*, 19: 119-126, 1991.
- Elliott, P.J., Nemeroff, C.B. et Kilts, C.D., Evidence for a tonic facilitatory influence of substance P on dopamine release in the nucleus accumbens. *Brain Res.*, 385: 379-382, 1986.
- Elmslie, K.S., Calcium current modulation in frog sympathetic neurones: multiple neurotransmitters and G proteins. *J. Physiol.*, 451: 229-246, 1992.

- Emonds-Alt, X., Advenier, C., Vilain, P., Goulaouic, P., Proietto, V., VanBroeck, D., Naline, E., Neliat, G., LeFur, G. et Brelière, J.C., Pharmacological profile of SR 48968, a potent non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK<sub>2</sub>) receptor. *Neuropeptides*, 22: 21, 1992.
- Emonds-Alt, X., Bichon, D., Ducoux, J.P., Heaulme, M., Miloux, B., Poncelet, M., Proietto, V., VanBroeck, D., Vilain, P., Neliat, G., Soubrié, P., LeFur, G. et Brelière, J.C., SR 142801, the first potent non-peptide antagonist of the NK<sub>3</sub> receptor. *Life Sci.*, 56: PL27-PL32, 1995.
- Emonds-Alt, X., Doutremepuich, J.D., Heaulme, M., Neliat, G., Santicci, V., Steinberg, R., Vilain, P., Bichon, D., Ducoux, J.P., Proietto, V., VanBroeck, D., Soubrie, P., LeFur, G. et Brelière, J.C., *In vitro* and *in vivo* biological activities of SR 140333, a novel potent non-peptide tachykinin NK-1 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, 250: 403-413, 1993a.
- Emonds-Alt, X., Doutremepuich, J.D., Jung, M., Proietto, E., Santucci, V., VanBroek, D., Vilain, P., Soubrie, P., LeFur, G. et Brelière, J.C., SR 140333, a non-peptide antagonist of substance P (NK<sub>1</sub>) receptor. *Neuropeptides*, 24: 231-239, 1993b.
- Endo, S., Yokosawa, H. et Ishii, S., Involvement of endopeptidase 24.11 in degradation of substance P by glioma cells. *Neuropeptides*, 14: 177-184, 1989a.
- Endo, S., Yokosawa, H. et Ishii, S., Degradation of substance P by neuronal and glial cells. *Neuropeptides*, 14: 31-37, 1989b.
- Engberg, G., Svensson, T.H., Rosell, S. et Folkers, K., A synthetic peptide as an antagonist of substance P. *Nature Lond.*, 293: 222-223, 1981.
- Epstein, A.N., Neurohormonal control of salt intake in therat. *Brain Res. Bull.*, 27: 315-320, 1991.
- Erspamer, V., Biogenic amines and active polypeptides of amphibian skin. *Annu. Rev. Pharmacol.* 11: 327-350, 1971.
- Erspamer, V., The tachykinin peptide family, *Trends Neurosci.*, 4: 267-269, 1981
- Erspamer, V. et Anastasi, A., Structure and pharmacological actions of eledoisin, the active undecapeptide of the posterior salivary glands of *Eledone*. *Experientia*, 18: 58-59, 1962.
- Erspamer, V., Anastasi, A., Bertaccini, G. et Cei, J.M., Structure and pharmacological actions of physalaemin, the main active polypeptide of the skin of *Physalaemus fuscumaculatus*. *Experientia*, 20: 489-490, 1964.
- Erspamer, V., Falconieri-Erspamer, G. et Linari, G., Occurrence of tachykinins (physalaemin or substance P-like peptides) in the amphibian skin and their actions on smooth muscle preparations. dans : *Substance P*. Eds. Von Euler, U.S. et Pernow, B., Raven Press, New York, pp. 67-74, 1977.
- Erspamer, V., et Melchiorri, P., Active polypeptides: from amphibian skin to gastrointestinal tract and brain of mammals. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1: 391-395, 1980.

---

**F**

---

- Fardin, V., Carruette, A., Menager, J., Bock, M., Flamand, O., Foucault, F., Heuillet, E., Moussaoui, S.M., Tabart, M., Peyronel, J.F. et Garret, C., *In vitro* pharmacological profile of RPR 100893, a novel non peptide antagonist of the human NK-1 receptor. *Neuropeptides*, 26: 34S, 1994.
- Fardin, V., Foucault, F., Bock, M.D. et Garret, C., Binding profile of RP 67,580, a new nonpeptide SP antagonist: comparison with CP 96,345, *Br. J. Pharmacol.*, 1992a.
- Fardin, V., Vaissade, F., Jolly, A., Flamand, O. et Garret, C., Distribution and characterization of tachykinin binding in bronchopulmonary tract of rat and guinea-pig. *Regul. Pept., Suppl.* 1: S54, 1992b.
- Fardin, V. et Garret, C., Species differences between [<sup>3</sup>H] substance P binding in rat and guinea-pig shown by the use of peptide agonists and antagonists. *Eur. J. Pharmacol.*, 20: 1231-1234, 1991.
- Fishbach, G.D., Dunlap, K., Mudge, A. et Leeman, S., Peptide and amine transmitter effect on embryonic chick sensory neurons in vitro. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 28: 175-188, 1981.
- Fitzsimons, J.T. et Evered, M.D., Eledoisin, substance P and related peptides: intracranial dipsogens in the pigeon and antidipsogens in the rat. *Brain Res.*, 150: 533-542, 1978.
- Fitzgerald, M., Wall, P.D., Goedert, M. et Emson, P.C., Nerve growth factor counteracts the neurophysiological and neurochemical effects of chronic sciatic nerve section. *Brain Res.*, 332: 131-141, 1985.
- Flood, J.F., Baker, M.L., Hernandez, E.M. et Morley, J.E., Modulation of memory retention by neuropeptide K. *Brain Res.*, 520: 284-290, 1990.
- Floor, E., Grad, O. et Leeman, S.E., Synaptic vesicles containing substance P purified by chromatography on controlled pore glass. *Neuroscience*, 7: 1647-1655, 1982.
- Folkers, K., Feng, D.M., Asano, N., Håkanson, R., Weisenfeld-Hallin, Z. et Leander, S., Spantide II, an effective tachykinin antagonist having high potency and negligible neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 4833-4835, 1990.
- Folkers, K., Håkanson, R., Hörig, J., Xu, J.C. et Leander, S. Biological evaluation of substance P antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, 83: 449-456, 1984.
- Folkers, K., Hörig, J., Rampold, G., Lane, P., Rosell, S. et Björkroth, U., Desing and synthesis of effective antagonists of substance P. *Acta Chem. Scand.*, B 36: 389-395, 1982.
- Folkers, K., Hörig, J., Rosell, S. et Björkroth, U., Chemical desing of antagonists of substance P. *Acta Physiol. Scand.*, 111: 505-506, 1981.
- Fong, T.M., Anderson, S., Yu, H., Huang, R.R.C. et Strader, C.D., Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin 1 receptor. *Mol. Pharmacol.*, 41: 24-30, 1992a.

- Fong, T.M., Huang, R.-R.C. et Strader, C.D., Localization of agonist and antagonist binding domains of the human neurokinin-1 receptor. *J. Biol. Chem.*, 267: 25664-25667, 1992c.
- Fong, T.M. et Strader, C.D., Functional mapping of the ligand binding sites of G-protein coupled receptors. *Med. Res. Rev.*, 14: 387-399, 1994.
- Fong, T.M., Yu, H., Huang, R.R.C. et Strader, C.D., The extracellular domain SP receptor (NK-1) receptor comprises part of the ligand binding site. *Biophys. J.*, 62: 59-60, 1992b.
- Foreman, R.D. et Blair, R.W., Central organization of sympathetic cardiovascular response to pain. *Ann. Rev. Physiol.*, 50: 607-622, 1988.
- Fosbraey, P., Featherstone, R.L. et Morton, I.K.M., Comparison of potency of substance P and related peptides on [<sup>3</sup>H]-acetylcholine release, and contractile actions, in the guinea-pig ileum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 326: 111-115, 1984.
- Franz, J., Boissonnas, R.A. et Strümer, E., Pharmacological properties of substance P isolated in an apparently pure state. *Proc. Sci. Soc. Bosnia Herzegovina* 1: 99-100, 1961.
- Frederickson, R.C.A., Burgis, V., Harrell, C.E. et Edwards, J.D., Dual actions of substance P on nociception: possible role of endogenous opioids. *Science Wash. DC*, 199: 1359-1362, 1978.
- Freedman, J., Post, C., Kahrstrom, J., Ohlen, A., Mollenholt, P., Owman, C., Alari, L. et Hökfelt, T., Vasoconstrictor effects in spinal cord of substance P antagonist [DArg<sup>1</sup>,DTrp<sup>7,9</sup>,Leu<sup>11</sup>]substance P (spantide) and somatostatin and interaction with thyrotropin-releasing hormone. *Neuroscience*, 27: 267-278, 1988.
- Fregly, M.J. et Rowland, N.J., Effects of a non peptide angiotensin II receptor antagonist, DuP 753, on angiotensin-related water intake in rats. *Brain Res. Bull.*, 27: 97-100, 1991.
- Fujii, T., Murai, M., Morimoto, H., Maeda, Y., Yamaoka, M., Hagiwara, D., Miyake, H., Ikari, N. et Matsuo, M., Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK-1 receptor antagonist, FK888. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 785-789, 1992.
- Furness, J.B., Costa, M. et Keast, J.R., Choline acetyltransferase- and peptide immunoreactivity of submucous neurons in the small intestine of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.*, 237: 329-336, 1984.
- Furness, J.B., Elliott, J.M., Murphy, R., Costa, M. et Chalmers, J.P., Baroreceptor reflexes in conscious guinea-pigs are unaffected by depletion of cardiovascular substance P nerves. *Neurosci. Lett.*, 32: 285-290, 1982.
- Furness, J.B., Llewellyn-Smith, I.J., Bornstein, J.C. et Costa, M., Chemical neuroanatomy and the analysis of neuronal circuitry in the enteric nervous system. dans : *Handbook of chemical neuroanatomy. The peripheral nervous system*. Eds. Björklund, A., Hökfelt, T. et Owman, C., Elsevier, New York, vol. 6, pp. 161-218, 1988.
- Furness, J.B., Papka, R.E., Della, N.G., Costa, M. et Eskay, R.L., Substance P-like immunoreactivity in nerves associated with the vascular system of guinea-pigs. *Neuroscience*, 7: 447-459, 1982.

---

**G**

---

- Gaddum, J.H., Tryptamine receptors. *J. Physiol. Lond.*, 119: 363-368, 1953.
- Gaddum, J.H. et Schild, H.O., Depressor substances in extracts of intestine. *J. Physiol. Lond.*, 83: 1-14, 1935.
- Gamse, R., Molnar, A. et Lembeck, F., Substance P release from spinal cord slices by capsaicin. *Life Sci.*, 25: 629-636, 1979.
- Gao, X.-P., Rubinstein, I., Neutral endopeptidase modulates substance P-induced vasodilation in vivo. *J. Appl. Physiol.*, 78: 562-568, 1995.
- Garret, C., Carruette, A., Fardin, V., Moussaoui, S., Peyronel, J.F., Blanchard, J.C. et Laduron, P.M., Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 10208-10212, 1991.
- Garret, C., Carruette, A., Fardin, V., Moussaoui, S., Peyronel, J.F., Blanchard, J.C. et Laduron, P.M., RP 67,580 a potent and selective nonpeptide SP antagonist. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 314: 199-204, 1992.
- Gelsema, A.J., Roe, M.J. et Calaresu, F.R., Neurally mediated cardiovascular responses to stimulation of cell bodies in the hypothalamus of the rat. *Brain Res.*, 482: 67-77, 1989.
- Gerard, N.P., Eddy, R.L., Shows, T.B. et Gerard, C., The human neurokinin A (substance K) receptor. *J. Biol. Chem.*, 265: 20455-20462, 1990.
- Gerard, N.P., Garraway, L.A., Eddy, R.L., Shows, T.B., Iijima, T.B., Paquet, J.L. et Gerard, C., Human substance P receptor (NK-1). Organization of the gene, chromosome localization and functional expression of cDNA clones. *Biochemistry*, 30: 10640-10646, 1991.
- Gerfen, C.R., Substance P (neurokinin-1) receptor mRNA is selectively expressed in cholinergic neurons in the striatum and basal forebrain. *Brain Res.*, 556: 165-170, 1991.
- Gether, U., Emonds-Alt, X., Brelière, J.C., Fujii, T., Hagiwara, D., Pradier, L., Garret, C., Johansen, T.E. et Schwartz, T.W., Evidence for a common molecular mode of action for chemically distinct nonpeptide antagonists at the neurokinin-1 (substance P) receptor. *Mol. Pharmacol.*, 45, 500-508, 1994.
- Gether, U., Johansen, T.E. et Schwartz, T.W., Chimeric NK<sub>1</sub> (substance P)/NK<sub>3</sub> (neurokinin B) receptors. Identification of domains determining the binding specificity of tachykinin agonists. *J. Biol. Chem.*, 268: 7893-7898, 1993c.
- Gether, U., Johansen, T.E., Snider, R.M., Lowe, J.A., Nakanishi, S. et Schwartz, T.W., Different binding epitopes on the NK<sub>1</sub> receptor for substance P and a non-peptide antagonist. *Nature Lond.*, 362: 345-348, 1993a.
- Gether, U., Lowe, III, J.A. et Schwartz, T.W., Tachykinin non-peptide antagonists: binding domain and molecular mode of action. *Biochem. Soc. Trans.*, 23: 96-102, 1995.



- Gether, U., Yokota, Y., Emonds-Alt, X., Brelière, J.C., Lowe, J.A., III, Snider, R.M., Nakanishi, S. et Schwartz, T.W., Two nonpeptide tachykinin antagonists act through epitopes on corresponding segments of the NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 6194-6199, 1993b.
- Gilbey, M.P., McKenna, K.E. et Schramm, L.P., Effects of substance P on sympathetic preganglionic neurons. *Neurosci. Lett.*, 41: 157-159, 1983.
- Gilchrist, C.A., Morrison, C. et Harmar, A.J., Regulation of preprotachykinin gene expression by nerve growth factor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 632: 391-393, 1991.
- Gillis, R.A., Helke, C.J., Hamilton, B.L., Norman, W.P. et Jacobowitz, D.M., Evidence that substance P is a neurotransmitter of baro- and chemoreceptors afferents in nucleus tractus solitarius. *Brain Res.*, 181: 476-481, 1980.
- Gitter, B.D., Waters, D.C., Bruns, R.F., Mason, N.R., Nixon, J.A. et Howbert, J.J., Species difference in affinities of non-peptide antagonists for substance P receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 197: 237-238, 1991.
- Gorbulev, V., Akhundova, A.A., Luzius, H. et Fahrenholz, F., Molecular cloning of substance P cDNA from guinea-pig uterus. *Biochem. Biophys. Acta*, 113: 199-202, 1992.
- Graham, A., Hopkins, B., Powell, S.J., Danks, P. et Briggs, I., Isolation and characterization of the human lung NK-2 receptor gene, using rapid amplification of the cDNA ends. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177: 8-16, 1991.
- Grigg, J.J., Koyano, K., Nakajima, S. et Nakajima, Y., Peptide-induced reduction in calcium currents in rat nucleus basalis and locus ceruleus neurons. *Biophys. J.*, 59: 83a, 1991.
- Grupp, L.A. et Harding, S., The reduction in alcohol drinking by peripherally injected angiotensin II is selectively mediated by the AT<sub>1</sub> receptor subtype. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 47: 385-392, 1994.
- Guard, S., Boyle, S.J., Tang, K.-W., Watling, K.J., McKnight, A.T. et Woodruff, G.N., The interaction of the NK<sub>1</sub> receptor antagonist CP-96,345 with L-type calcium channels and its functional consequences. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 385-391, 1993.
- Guard, S., Watling, K.J. et Watson, S.P., Neurokinin<sub>3</sub>-receptors, are linked to inositol hydrolysis in the guinea-pig ileum longitudinal muscle-myenteric plexus preparation. *Br. J. Pharmacol.*, 94: 148-154, 1988.
- Guard, S. et Watson, S.P., Evidence for neurokinin-3 receptor-mediated tachykinin release in the guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.*, 144: 409-412, 1987.
- Guard, S. et Watson, S.P., Tachykinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. *Neurochem. Int.*, 18: 149-165, 1991.
- Guard, S., Watson, S.P., Maggio, J.E., Too, H.P. et Watling, K.J., Pharmacological analysis of [<sup>3</sup>H]-senktide binding to NK<sub>3</sub> tachykinin receptors in guinea-pig ileum longitudinal muscle-myenteric plexus and cerebral cortex membranes. *Br. J. Pharmacol.*, 99: 767-773, 1990.

Gutowski, S., Smrcka, A., Nowak, L., Wu, D., Simon, M. et Sternweis, P.C., Antibodies to the  $\alpha_q$  subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein  $\alpha$  subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones. *J. Biol.Chem.*, 266: 20519-20524, 1991.

Guyenet, P.G. et Aghajanian, G.K., Excitation of neurons in the nucleus locus coeruleus by substance P and related peptides. *Brain Res.*, 136: 178-184, 1977.

---

## H

---

Hagan, R.M., Tachykinin receptor antagonists. *Neuropeptides*, 22: 27, 1992.

Hagan, R.M., Beresford, I.J., Elliot, P.J., Ball, D.I., Sheldrick, R.L., Pritchard, J.M., McElroy, A.B. et Ward, P., NK-2 antagonists and the role of NK-2 receptors. *Regul. Pept.*, 42: S8, 1992.

Hagio, T., Takano, Y., Nagashima, A., Nakayama, Y., Tateishi, K. et Yamika, H., The central pressor actions of a novel tachykinin peptide,  $\gamma$ -preprotachykinin-(72-92)-peptide amine. *Eur. J. Pharmacol.*, 192: 173-176, 1991.

Hagiwara, D., Miyake, H., Morimoto, H., Murai, M., Fujii, T. et Matsuo, J., Studies on neurokinin antagonists. 2. Desing and structure-activity relationships of novel tripeptide substance P antagonist N<sup>α</sup>[N<sup>α</sup>-(N<sup>α</sup>-acetyl-L-threonyl)-N<sup>1</sup>-formyl-D-tryptophyl]-N-methyl-N-(phenylmethyl)-L-Phenylalaninamide and its related compounds. *J. Med. Chem.*, 35: 3184-3191, 1992a.

Hagiwara, D., Miyake, H., Morimoto, H., Murai, M., Fujii, T. et Matsuo, J., Studies on neurokinin antagonists. 1. The desing of novel tripeptides possessing glutaminy-D-tryptophyl-phenylalanine sequence as substance P antagonists. *J. Med. Chem.*, 35: 2015-2025, 1992b.

Häkanson, R., Hörig, J. et Leander, S., The mechanism of action of a substance P antagonist, (DPro<sup>2</sup>,DTrp<sup>7,9</sup>)-SP. *Br. J. Pharmacol.*, 77: 697-700, 1982.

Hall, M.E., Miley, F.B. et Stewart, J.M., Cardiovascular effects of substance P peptides in the nucleus of the solitary tract. *Brain Res.*, 497: 280-290, 1989.

Halliday, G.M., Li, Y.W., Joh, T.H., Cotton, R.G.H., Howe, P.R.C., Geffen, L.B. et Blessing, W.W., Distribution of substance P-like immunoreactive neurons in the human medulla oblongata: co-localization with monoamine-synthesizing neurons. *Synapse*, 2: 353-370, 1988.

Hanani, M. et Burnstock, G., The actions of substance P and serotonin on myenteric neurons in tissue culture. *Brain Res.*, 358: 276-281, 1985.

Hanley, M.R., Sandberg, B.E.B., Lee, C.M., Iversen, L.L., Brundish, D.E. et Wade, R., Specific binding of <sup>3</sup>H-substance P to rat brain membranes. *Nature Lond.*, 286: 810-812, 1980.

Hansen, P.E. et Morgan, B.A., United States Patent 4, 472: 305, 1984.

Handwerker, H.O. et Kobal, G., Psychophysiology of experimentally induced pain. *Physiol. Rev.*, 73: 639-671, 1993.

- Hanessian, S. et Ronan, B., Design and synthesis of a prototype model antagonist of tachykinin NK-2 receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4: 1397-1400, 1994.
- Harada, Y., Takahashi, T., Kuno, M., Nakayama, K., Masu, Y. et Nakanishi, S., Expression of two different tachykinin receptors in xenopus oocytes by exogenous mRNAs. *J. Neurosci.*, 7: 3265-3276, 1987.
- Harbeson, S.L., Buck, S.H., Hassmann, III, C.F. et Shatzer, S.A., Synthesis and biological activity of [ $\psi$ (CH<sub>2</sub>NH)] analogs of neurokinin A (4-10). dans : *Peptides, chemistry, structure and biology*. Eds. Rivier, J. et Marshall, G.R., ESCOM, Leiden, Pays-Bas, pp. 180-181, 1990.
- Harlan, R.E., Garcia, M.M. et Krause, J.E., Cellular localization of substance P-and neurokinin A-encoding preprotachykinin mRNA in the female rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 287: 179-212, 1989.
- Harland, D., Gardiner, S.M. et Bennett, T., Cardiovascular and dipsogenic effects of angiotensin II administered i.c.v. in Long-Evans and Brattleboro rats. *Brain Res.*, 455: 58-64, 1988.
- Harmar, A.J., Hyde, V. et Chapman, K., Identification and cDNA sequence of  $\delta$ -preprotachykinin, a fourth splicing variant of the rat substance P precursor. *FEBS Lett.*, 275: 22-24, 1990.
- Harmar, A. et Keen, P., Synthesis and central and peripheral axonal transport of substance P in a dorsal root ganglion-nerve preparation *in vitro*. *Brain Res.*, 231: 379-385, 1982.
- Harmar, A., Schofield, J.G. et Keen, P., Cycloheximide-sensitive synthesis of substance P by isolated dorsal root ganglia. *Nature Lond.*, 284: 267-269, 1980.
- Harmar, A., Schofield, J.G. et Keen, P., Substance P biosynthesis in dorsal root ganglia: an immunochemical study of [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>3</sup>H]proline incorporation *in vitro*. *Neuroscience* 6: 1917-1922, 1981.
- Harmar, A.J., Armstrong, A., Pascall, J.C., Chapman, K., Rosie, R., Curtis, A., Going, J., Edwards, R.W. et Fink, G., cDNA sequence of human  $\beta$ -preprotachykinin, the common precursor to substance P and neurokinin A. *FEBS Lett.*, 208: 67-72, 1986.
- Hart, R.P., Shadiack, A.M. et Jonakait, G.M., Substance P gene expression is regulated by interleukin-1 in cultured sympathetic ganglia. *J. Neurosci. Res.*, 29: 282-291, 1991.
- Hassessian, H. et Couture, R., Cardiovascular responses induced by intrathecal substance P in the conscious freely moving rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 13: 594-602, 1989.
- Hassessian, Couture, R. et DeChamplain, J., Sympathoadrenal mechanisms underlying cardiovascular responses to intrathecal substance P in conscious rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 15: 736-744, 1990.
- Hassessian, H., Drapeau, G. et Couture, R., Spinal actions of neurokinins producing cardiovascular responses in the conscious freely moving rat: evidence for a NK-1 receptor mechanism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 338: 649-654, 1988.
- Hayashi, M. et Oshima, K., Neuropeptides in cerebral cortex of macaque monkey (*Macaca fuscata*): regional distribution and ontogeny. *Brain Res.*, 364: 360-368, 1986.

- Helke, C.J., Chultz, C.W., Chase, T.N. et O'Donohue, T.L., Autoradiographic localization of substance P receptors in rat medulla: effect of vagotomy and nodose ganglionectomy. *Neuroscience*, 12: 215-223, 1984.
- Helke, C.J., Dimicco, J.A., Jacobowitz, D.M. et Kopin, I.J., Effect of capsaicin administration to neonatal rats on the substance P of discrete CNS regions. *Brain. Res.*, 222: 428-431, 1981.
- Helke, C.J. et Eskay, R.L., Capsaicin reduces substance P immunoreactivity in the lateral nucleus of the solitary tract and nodose ganglion. *Peptide*, 6, Suppl. 1: 121-126, 1985.
- Helke, C.J. et Hill, K.M., Immunohistochemical study of neuropeptides in vagal and glossopharyngeal afferent neurons in the rat. *Neuroscience*, 26: 539-551, 1988.
- Helke, C.J., Krause, J.E., Mantyh, P.W., Couture, R. et Bannon, M.J., Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors and regulatory mechanisms. *FASEB J.*, 4: 1606-1615, 1990.
- Helke, C.J., Neil, J.J., Massari, V.J. et Loewy, A.D., Substance P neurons project from the ventral medulla to the intermediolateral cell column and ventral horn in the rat. *Brain Res.*, 243: 147-152, 1982.
- Helke, C.J. et Niederer, A.J., Studies on the coexistence of substance P with other putative transmitters in the nodose and petrosal ganglia. *Synapse* 5: 144-151, 1990.
- Helke, C.J., O'Donohue, T.L. et Jacobowitz, D.M., Substance P as a baro- and chemoreceptor afferent neurotransmitter: immunocytochemical and neurochemical evidence in the rat. *Peptides*, 1: 1-9, 1980.
- Hendry, S.H.C., Jones, E.G. et Burnstein, N., Activity-dependent regulation of tachykinin-like immunoreactivity in neurons of monkey visual cortex. *J. Neurosci.*, 8: 1225-1238, 1988.
- Henry, J.L., Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. *Brain Res.*, 114: 439-451, 1976.
- Henry, J.L., Discussions of nomenclature for tachykinin and tachykinin receptors. dans : *Substance P and neurokinins*. Eds. Henry, J.L., Couture, R., Cuello, A.C., Pelletier, G., Quirion, R. et Regoli, D., Springer-Verlag, New York, p. xvii-xviii, 1987.
- Henry, J.L., Krnjevic, K. et Morris, M.E., Substance P and spinal neurones. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 53: 423-432, 1975.
- Herd, J.A., Cardiovascular response to stress. *Physiol. Rev.*, 71: 305-331, 1991.
- Herman, J.P., Guillonneau, D., Dantzer, R., Scatton, B., Semerdjian-Rouquier, L. et LeMoal, M., Differential effects of inescapable footshocks and of stimuli previously paired with inescapable footshocks on dopamine turnover in cortical and limbic areas of the rat. *Life Sci.*, 30: 2207-2214, 1982.
- Hershey, A.D. et Krause, J.E., Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. *Science*, 247: 958-962, 1990.

- Higashida, H. et Brown, D.A., Two polyphosphatidylinositide metabolites control two K<sup>+</sup> currents in a neuronal cell. *Nature*, 323: 333-335, 1986.
- Hill, R.G., Current perspectives on pain. *Sci. Prog. Ox.*, 70: 95-107, 1986.
- Hill, R.G., Role of receptors in nociception, dans : *The tachykinin receptors*. Eds. Buck, S.H., Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 471-498, 1994.
- Hille, B., G protein-coupled mechanisms and nervous signalling. *Neuron*, 9: 187-195, 1992.
- Hilton, S.M. et Redfern, W.S., A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat. *J. Physiol. Lond.*, 378: 213-228, 1986.
- Hirschmann, R., Nicolau, K.C., Pietranico, S., Salvino, J., Leahy, E.M., Sprengeler, P.A., Furst, G., Smith, A.B., Strader, C., Cascieri, M.A., Caldelore, M.R., Donaldson, C., Vale, W. et Maechler, L., Nonpeptidyl peptidomimetics with a  $\beta$ -D-glucose scaffolding. A partial somatostatin agonist bearing a close structural relationship to a potent, selective substance P antagonist. *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 9217-9218, 1992.
- Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Luft, R., Nilsson, G. et Arimura, A., Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience*, 1: 131-136, 1976.
- Hökfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, Ä., Lundberg, J.M. et Schultzberg, M., Peptidergic neurones. *Nature Lond.*, 284: 515-521, 1980.
- Hökfelt, T., Kellerth, J.O., Nilsson, G. et Pernow, B., Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Res.*, 100: 235-252, 1975a.
- Hökfelt, T., Kellerth, J.-O., Nilsson, G. et Pernow, B., Substance P: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science Wash. DC*, 190: 889-890, 1975b.
- Hökfelt, T., Ljungdahl, Ä., Steinbusch, H., Verhofstad, A., Nilsson, G., Brodin, E., Pernow, B. et Goldstein, M., Immunohistochemical evidence of substance P-like immunoreactivity in some 5-hydroxytryptamine-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 3: 517-538, 1978.
- Hökfelt, T., Vincent, S., Dalsgaard, C.J., Skirboll, L., Johansson, O., Schultzberg, M., Lundberg, J.M., Rosell, S., Pernow, B. and Jancsó, G., Distribution of substance P in brain and periphery and its possible role as a cotransmitter. dans : *Substance P in the nervous system*. Eds. Porter, R. et O'Connor, M., Ciba Found. Symp., 91, Pitman, Londres, pp. 84-106, 1982.
- Holz, G.G., IV, Dunlap, K. et Kream, R.M., Characterization of the electrically evoked release of substance P from dorsal root ganglion neurons: methods and dihydropyridine sensitivity. *J. Neurosci.*, 8: 463-471, 1988.
- Holz, G.G., IV, Kream, R.M., Spiegel, A. et Dunlap, K., G proteins couple  $\alpha$ -adrenergic and GABA<sub>b</sub> receptors to inhibition of peptide secretion from peripheral sensory neurons. *J. Neurosci.*, 9: 657-666, 1989.

- Holzer, P., Capsaicin: cellular targets mechanisms of action and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.*, 43: 144-201, 1991.
- Holzer, P., Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24: 739-768, 1988.
- Holzer, P. et Lippe, I.T., Substance P action on phosphoinositide in guinea-pig intestinal muscle: a possible transduction mechanism? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 329: 50-55, 1985.
- Holzer-Petsche, U., Lembeck, F. et Seitz, H., Contractile effects of substance P and neurokinin A on the rat stomach in vivo and in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, 90: 273-279, 1987.
- Hooper, N.M. et Turner, A.J., Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl-dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) from pig brain: a re-evaluation of their role in neuropeptide metabolism. *Biochem. J.*, 241: 625-633, 1987.
- Hopkins, B., Powell, S.J., Danks, P., Briggs, I. et Graham, A., Isolation and characterization of the human NK-1 receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180: 1110-1117, 1991.
- Hosoya, Y., Sugaira, Y., Okado, N., Loewy, A.D. et Kohne, K., Descending input from the hypothalamic paraventricular nucleus to sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Exp. Brain Res.*, 85: 10-20, 1991.
- Hua, X.-Y., Theodorsson-Norheim, E., Brodin, E., Lundberg, J.M. et Hökfelt, T., Multiple tachykinins (neurokinin A, neuropeptide K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. *Regul. Pept.*, 13: 1-19, 1985.
- Huang, R.R., Cheung, A.H., Mazina, K.E., Strader, C.D. et Fong, T.M., cDNA sequence and heterologous expression of the human neurokinin-3 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184: 966-972, 1992.
- Humpel, C. et Saria, A., Intranigral injection of selective neurokinin-1 and neurokinin-3 but not neurokinin-2 receptor agonists biphasically modulate striatal dopamine metabolism but not striatal preprotachykinin-A mRNA in the rat. *Neurosci. Lett.*, 157: 223-226, 1993.
- Hurst, S.M., Stanisz, A.M., Sharkey, K.A. et Collins, S.M., Interleukin 1 beta-induced increase in substance P in rat myenteric plexus. *Gastroenterology*, 105: 1754-1760, 1993.

---

## I

---

- Innis, R.B., Amrdrade, R. et Aghajanian, G.K., Substance K excites dopaminergic and non-dopaminergic neurons in rat substantia nigra. *Brain Res.*, 335: 381-383, 1985.
- Inoue, M., Nakajima, S. et Nakajima, Y., Somatostatin induces and inward rectification in rat locus coeruleus neurones through a pertussis toxin-sensitive mechanism. *J. Physiol.*, 407: 177-198, 1988.

- Ireland, S.J., Bailey, F., Cook, A., Hagan, R.M., Jordan, C.C. et Stephens-Smith, M., Receptors mediating tachykinin-induced contractile responses in guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol.*, 103: 1463-1469, 1991.
- Ireland, S.J., Jordan, C.C., Stephens-Smith, M.L. et Ward, P., Receptors mediating the contractile response to neurokinin agonists in the guinea-pig trachea. *Regul. Pept.*, 22: 93, 1988.
- Itoi, K., Jost, N., Badoer, E., Tschöpe, C., Culman, J. et Unger, T., Localization of the substance P-induced cardiovascular responses in the rat hypothalamus. *Brain Res.*, 558: 123-126, 1991.
- Itoi, K., Jost, N., Culman, J., Tschöpe, C. et Unger, T., Further localization of cardiovascular and behavioural actions of substance P in the rat brain. *Brain Res.*, 668: 100-106, 1994.
- Iverfeldt, K., Peterson, L.-L., Brodin, E., Ögren, S.-O. et Bartfai, T., Serotonin type-2 receptor mediated regulation of substance P release in the ventral spinal cord and the effects of chronic antidepressant treatment. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 333: 1-6, 1986.
- Iverfeldt, K., Serfözö, P., Diaz-Arnesto, L. et Bartfai, T., Differential release of coexisting neurotransmitters: frequency dependence of the efflux of substance P, thyrotropin releasing hormone and [<sup>3</sup>H] serotonin from tissue slices of rat ventral spinal cord. *Acta. Physiol. Scand.*, 137: 63-71, 1989.
- Iversen, L.L., Multiple receptors for tachykinins. dans : *Tachykinin antagonists*. Eds. Hakanson, R., et Sundler, F., Elsevier, New York, p. 291-304, 1985.
- Iversen, L.L., Hanley, M.R., Snadberg, B.E.B., Lee, C.-M., Pinnock, R.D. et Watson, S.P., Substance P receptors in the nervous system and the possible receptor subtypes. dans : *Substance P in the nervous system*. Eds. Porter, R. et O'Connor, M., Ciba Found. Symp. 91, Pitman, Londres, pp. 186-205, 1982.

---

## J

---

- Jan, L.Y. et Jan, Y.N., Peptidergic transmission in sympathetic ganglia of the frog. *J. Physiol.*, 327: 219-246, 1982.
- Jancsó, G., Jancsó-Gábor, A. et Szolcsnáyi, J., Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 31: 138-151, 1967.
- Jancsó, G., Jancsó-Gábor, A. et Szolcsnáyi, J., The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 32: 32-41, 1968.
- Jancsó, G., Királi, E. et Jancsó-Gábor, A., Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature Lond.*, 270: 741-743, 1977.
- Jeftinija, S., Jeftinija, K., Liu, F., Skilling, S.R., Smullin, D.H. et Larson, A.A., Excitatory amino acids are released from rat primary afferent neurons *in vitro*. *Neurosci. Lett.*, 125, 191-194, 1991.



- Jensen, J. et Conlon, J.M., Substance-P-related and neurokinin-A-related peptides from the brain of the cod and trout. *Eur. J. Biochem.* 206: 659-664, 1992.
- Jessell, T.M., Emson, P.C., Paxinos, G. et Cuello, A.C., Topographic projections of substance P and GABA pathways in the striato- and pallido-nigral system: a biochemical and immunohistochemical study. *Brain Res.*, 152: 487-498, 1978.
- Jessell, T.M. et Iversen, L.L., Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. *Nature Lond.*, 268: 549-551, 1977.
- Jessell, T.M., Tsunoo, A., Kanazawa, I. et Otsuka, M., Substance P: depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurons. *Brain Res.*, 168: 247-259, 1979.
- Jessell, T.M., Yoshioka, K. et Jahr, C.E., Amino acid receptor-mediated transmission at primary afferent synapses in rat spinal cord. *J. Exp. Biol.*, 124: 239-258, 1986.
- Ji, H., Leung, M., Zhang, Y., Catt, K.T. et Sandberg, K., Differential structural requirements for specific binding of nonpeptide and peptide antagonists to the AT<sub>1</sub> angiotensin receptor. Identification of amino acid residues that determine binding of the antihypertensive drug losartan. *J. Biol. Chem.*, 269: 16533-16536, 1994.
- Jonakait, G.M., Schotland, S. et Hart, R.P., Effects of lymphokines on substance P in injured ganglia of the peripheral nervous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 632: 19-30, 1991.
- Jones, S.W., Muscarinic and peptidergic excitation of bull-frog sympathetic neurones. *J. Physiol.*, 366: 63-87, 1985.
- Jordan, C.C. et Oheme, P., (Editeurs) Maidstone symposium. Substance P: Metabolism and biological actions, Taylor and Francis, London, U.K., 1985.
- Jukic, D., Rouissi, N., Laprise, R., Boussougou, M. et Regoli, D., Neurokinin receptors antagonists: old and new. *Life Sci.*, 49, 1463-1469, 1991.

---

## K

---

- Kachur, J.F., Miller, R.J., Field, M. et Rivier, J., Neurohumoral control of ileal electrolyte transport. II. Neurotensin and substance P. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 220: 456-463, 1982.
- Kafetzopoulos, E., Holzhäuer, M.-S. et Huston, J.P., Substance P injected into the region of the nucleus basalis magnocellularis facilitates performance of an inhibitory avoidance task. *Psychopharmacology Berlin*, 90: 281-283, 1986.
- Kage, R., Hershey, A.D., Krause, J.E., Boyd, N.D. et Leeman, S.E., Characterization of the substance P receptor in tunicamycin-treated transfected cells using a photoaffinity analog. *Soc. Neurosci. Abst.* 17: 805, 1991.
- Kage, R., McGregor, G.P., Thim, L. et Conlon, J.M., Neuropeptide  $\gamma$ : a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from  $\gamma$ -preprotachykinin. *J. Neurochem.*, 50: 1412-1417, 1988.



- Kageyama, R., Sasai, Y. et Nakanishi, S., Molecular characterization of transcription factors that bind to the cAMP responsive region of the substance P precursor gene. cDNA cloning of a novel C/EBP-related factor. *J. Biol. Chem.*, 266: 15525-15531, 1991.
- Kalivas, P.W. et Miller, J.S., Dopamine microinjection into the nucleus accumbens: correlation between metabolism and behavior. *Biochem. Pharmacol.*, 34: 284-286, 1985.
- Kalivas, P.W. et Miller, J.S., Substance P modulation of dopamine in the nucleus accumbens. *Neurosci. Lett.*, 48: 55-59, 1984.
- Kanazawa, I., Mogaki, S., Muramoto, O. et Kuzuhara, S., On the origin of substance P-containing fibers in the entopeduncular nucleus and the substantia nigra of the rat. *Brain Res.*, 184: 481-485, 1980.
- Kanazawa, I., Ogawa, T., Kimura, S. et Munekata, E., Regional distribution of substance P, neurokinin  $\alpha$  and neurokinin  $\beta$  in rat central nervous system. *Neurosci. Res.*, 2: 111-120, 1984.
- Kangawa, K., Minamino, N., Fukuda, A. et Matsuo, H., Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 114: 533-540, 1983.
- Kangrga, K., Larew, J.S. et Randic, M., The effects of substance P and calcitonin gene-related peptide on the efflux of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn in vitro. *Neurosci. Lett.*, 108: 155-160, 1990.
- Kangrga, I. et Randic, M., Tachykinins and calcitonin gene-related peptide enhance release of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn slice. *J. Neuroscience*, 10: 2026-2038, 1990.
- Kannan, H., Hayashida, Y. et Yamashita, H., Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *Am. J. Physiol.*, 257: R1325-R1330, 1989.
- Katayama, Y. et North, R.A., Does substance P mediate slow synaptic excitation within the myenteric plexus? *Nature Lond.*, 274: 387-388, 1973.
- Katayama, Y., North, R.A. et Williams, J.T., The action of substance P on neurons of the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 206: 191-208, 1979.
- Kawagushi, Y., Hoshimaru, M., Nawa, H. and Nakanishi, S., Sequence analysis of cloned cDNA for rat substance P presursors: Existence of a third substance P precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139: 1040-1046, 1986.
- Kawai, Y., Takagi, H., Kumoi, Y., Shiosaka, S. et Tohyama, M., Nigrostriatal dopamine neurons receive substance P-ergic inputs in the substantia nigra: application of the immunoelectron microscopic mirror technique to fluorescent double-staining for transmitter-specific projections. *Brain Res.*, 401: 371-376, 1987.
- Kawano, H. et Chiba, T., Distribution of substance P immunoreactive nerve terminals within the nucleus tractus solitarius of the rat. *Neurosci. Lett.*, 45: 175-179, 1984.

- Kawano, H. et Masuko, S., The locus coeruleus is innervated by catecholaminergic neurons containing neuropeptide Y, substance P and enkephalin in the ventrolateral medulla of the rat. *Neurosci. Res., Suppl.* 16: S32, 1984.
- Kelley, A.E. et Iversen, S.D., Behavioural response to bilateral injection of substance P into the substantia nigra of the rat. *Brain Res.*, 158: 474-478, 1978.
- Kelley, A.E. et Iversen, S.D., Substance P infusion into substantia nigra of the rat: behavioural analysis and involvement of striatal dopamine. *Eur. J. Pharmacol.*, 60: 171-179, 1979.
- Kelley, A.E., Stinus, L. et Iversen, S.D., Behavioural activation induced in the rat by substance P infusion into ventral tegmental area: implication of dopaminergic A10 neurones. *Neurosci. Lett.*, 11: 335-339, 1979.
- Kenins, P., Identification of the unmyelinated sensory nerves which evoke plasma extravasation in response to antidromic stimulation. *Neurosci. Lett.*, 25: 137-141, 1981.
- Kenny, A.J., Stephenson, S.L. et Turner, A.J., Cell surface peptidases. dans : *Mammalian ectoenzymes*. Eds. Kenny, A.J. et Turner, A.J., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Pays-Bas, pp. 169-210, 1987.
- Kessler, J.A., Freidin, M.M., Kalberg, C. et Chandross, K.J., Cytokines regulate substance P expression in sympathetic neurons. *Regul. Pept.*, 46: 70-75, 1993.
- Kimura, S., Okada, M., Sugita, Y., Kanazawa, I. et Munekata, E., Novel neuropeptides, neurokinin  $\alpha$  and  $\beta$ , isolated from porcine spinal cord. *Proc. Jpn. Acad. B*, 59: 101-104, 1983.
- Kirby, R.F., Thunhorst, R.L. et Johnson, A.K., Effects of a non-peptide angiotensin receptor antagonist on drinking and blood pressure responses to centrally administered angiotensins in the rat. *Brain Res.*, 576: 348-350, 1992.
- Konishi, S., Okamoto, T. et Otsuka, M., Substance P as a neurotransmitter released from peripheral branches of primary afferent neurones producing slow synaptic excitation in autonomic ganglion cells. dans : *Substance P. Metabolism and biological actions*. Eds. Jordan, C.C. et Oehme, P., Taylor & Francis, Philadelphia, PA, pp. 121-136, 1985.
- Konishi, S. et Otsuka, M., Excitatory action of hypothalamic substance P on spinal motoneurones of newborn rats. *Nature*, 252: 734-735, 1974.
- Konishi, S. et Otsuka, M., Actions of certain polypeptides on frog spinal neurons. *Jpn. J. Pharmacol.*, 21: 685-687, 1971.
- Konishi, S., Song, S.-Y., Ogawa, T. et Kanazawa, I., Fast and slow depolarizations produced by substance P and other tachykinins in sympathetic neurons of rat prevertebral ganglia. *Neurosci. Res.*, 14: 81-95, 1992.
- Kosaka, K., Hama, K., Nagatsu, I., Wu, J.-Y. et Kosaka, T., Possible coexistence of amino acid ( $\gamma$ -aminobutyric acid), amine (dopamine) and peptide (substance P): neurons containing immunoreactivities for glutamic acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase and substance P in the hamster main olfactory bulb. *Exp. Brain Res.*, 71: 633-642, 1988.

- Kotani, H., Hoshimaru, M., Nawa, H. et Nakanishi, S., Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 7074-7078, 1986.
- Koyano, K., Velimirovic, B.M., Grigg, J.J., Nakajima, S. et Nakajima, Y., Two signal transduction mechanisms of substance P-induced depolarization in locus coeruleus neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 5: 1189-1197, 1993.
- Koyano, K., Velimirovic, B., Grigg, J.J., Nakajima, Y. et Nakajima, S., Substance P modulates two ionic currents through different transduction pathways in locus coeruleus neurons. *Biophys. J.*, 59: 391a, 1991.
- Kozawa, H., Hino, J., Minamino, N., Kangawa, K. et Matsuo, H., Isolation of four novel tachykinins from frog (*Rana catesbeiana*) brain and intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177: 588-595, 1991.
- Krause, J.E., Chirgwin, J.M., Carter, M.S., Xu, Z.S. et Hershey, A.D., Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptide substance P and neurokinin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 881-885, 1987.
- Kris, R.M., South, V., Satzman, A., Felder, S., Ricca, G.A., Jaye, M., Huebner, K., Kagan, J., Croce, C.M. et Schlessinger, J., Cloning and expression of the human substance K receptor and analysis of its role in mitogenesis. *Cell Growth Differentiation*, 2: 15-22, 1991.
- Krnjevic, K. et Morris, M.E., An excitatory action of substance P on cuneate neurons. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 52: 736-744, 1974.
- Kubota, Y., Inagaki, S. et Kito, S., Innervation of substance P neurons by catecholaminergic terminals in the neostriatum. *Brain Res.*, 375: 163-167, 1986.
- Kucharczyk, N., Thuriereau, C., Paladino, J., Morris, A.D., Bonnet, J., Canet, E., Krause, J.E., Regoli, D., Couture, R. et Fauchère, J.L., Tetrapeptide tachykinin antagonists: synthesis and modulation of the physicochemical and pharmacological properties of a new series of partially cyclic analogs. *J. Med. Chem.*, 36: 1654-1661, 1993.
- Kuypers, H.G.J.M. et Maisky, V.A., Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase from spinal cord to brain stem cell groups in the cat. *Neurosci. Lett.*, 1: 9-14, 1975.

---

## L

---

- Laird, J.M.A., Hargreaves, R.J. et Hill, R.G., Effect of RP67580, a non-peptide neurokinin-1 receptor antagonist, on facilitation of a nociceptive spinal flexion reflex in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 109: 713-718, 1993.
- Lamour, Y., Dutar, P. et Jobert, A., Effects of neuropeptides on rat cortical neurons: laminar distribution and interaction with the effect of acetylcholine. *Neuroscience*, 10: 107-117, 1983.
- Laneuville, O., Dorais, J. et Couture, R., Characterization of the effects produced by neurokinins and three agonists selective for neurokinin receptor subtypes in a spinal nociceptive reflex of the rat. *Life Sci.*, 42: 1295-1305, 1988.

- Lantz, I., Nyberg, F. et Terenius, L., Molecular heterogeneity of angiotensin converting enzyme in human cerebrospinal fluid. *Biochem. Int.*, 23: 941-948, 1991.
- Larsen, P.J., Jessop, D.S., Chowdrey, H.S., Mikkelsen, J.D. et Lightman, S.L., Osmotic regulation of substance P and neurokinin A peptide content and substance P binding sites in distinct hypothalamic nuclei of the rat. *Peptides*, 13: 705-712, 1992.
- Laüfer, R., Ewenson, A., Gilon, C., Chorev, M. et Selinger, Z., Inhibition of substance P degradation in rat brain preparations by peptide hydroxamic acids. *Eur. J. Biochem.*, 150: 135-140, 1985a.
- Laüfer, R., Gilon, C., Chorev, M. et Selinger, Z., Characterization of a neurokinin B receptor site in rat brain using a highly selective radioligand. *J. Biol. Chem.*, 261: 10257-10263, 1986a.
- Laüfer, R., Gilon, C., Chorev, M. et Selinger, Z., pGlu<sup>6</sup>,Pro<sup>9</sup>SP(6-11), a selective agonist for the substance P receptor subtype. *J. Med. Chem.*, 29: 1284-1288, 1986b.
- Laüfer, R., Wormser, U., Friedman, Z.Y., Gilon, C., Chorev, M. et Selinger, Z., Neurokinin B is a preferred agonist for a neuronal substance P receptor and its actions is antagonized by enkephalin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 7444-7448, 1985b.
- Lavielle, S., Chassaing, G., Julien, S., Marquet, A., Bergström, J., Beaujouan, J.C., Torrens, Y. et Glowinski, J., Specific recognition of SP and NKB receptors by analogues of SP substituted in position 8 and 9. *Eur. J. Pharmacol.*, 125: 461-462, 1986.
- Lavielle, S., Chassaing, G., Ploux, O., Loeuillet, D., Besseyre, J., Julien, S., Marquet, A., Convert, O., Beaujouan, J.C., Torrens, Y., Bergstrom, L., Saffroy, M. et Glowinski, J., Analysis of tachykinin binding site interaction using constrained analogues of tachykinins. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 41-49, 1988.
- Leander, S., Häkanson, R., Rosell, S., Folkers, K., Sundler, F. et Tornqvists, K., A specific substance P antagonist blocks smooth muscle contraction induced by non-cholinergic non-adrenergic nerve stimulation. *Nature Lond.*, 294: 467-469, 1981.
- Lee, C.H., Park, D., Wu, D., Rhee, S.G. et Simon, M.I., Members of the G<sub>q</sub> α subunit gene family activate phospholipase C β isoenzyme. *J. Biol. Chem.*, 267: 16044-16047, 1992.
- Lee, C.-M., Campbell, N.J., Williams, B.J. et Iversen, L.L., Multiple tachykinin binding sites in peripheral tissues and in brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 130: 209-217, 1986.
- Lee, C.-M., Campbell, N.J., Williams, B.J. et Iversen, L.L., Multiple tachykinin binding sites in rat brain and peripheral tissues. dans : Substance P and neurokinins. Eds. Henry, J.L., Couture, R., Cuello, A.C., Pelletier, G., Quirion, R. et Regoli, D., Springer Verlag, New York, pp. 44-46, 1987.
- Lee, C.-M., Iversen, L.L., Hanley, M.R. et Sandberg, B.E.B., The possible existence of multiple receptors for substance P. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 318: 281-287, 1982.
- Lee, C.-M., Sandberg, B.E.B., Hanley, M.R. et Iversen, L.L., Purification and characterization of a membrane-bound substance-P-degrading enzyme from human brain. *Eur. J. Biochem.*, 114: 315-327, 1981.

- Lee, Y., Kawai, Y., Shiosaka, S., Takami, K., Kiyama, H., Hillyard, C.J., Girgis, S., Macintyre, I., Emson, P.C. et Tohyama, M., Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like peptide in single cells of the trigeminal ganglion of the rat: immunohistochemical analysis. *Brain Res.*, 330: 194-196, 1985a.
- Lee, Y., Takami, Y., Kawai, Y., Girgis, S., Hillyard, C.J., Macintyre, I., Emson, P.C. et Tohyama, M., Distribution of calcitonin gene-related peptide in the rat peripheral nervous system with reference to its coexistence with substance P. *Neuroscience*, 15: 1227-1237, 1985b.
- Lee, C.M., Tung, W.L. et Young, J.D., Tachykinin-stimulated inositol phospholipid hydrolysis and taurine release from human astrocytoma cells. *J. Neurochem.*, 59: 406-414, 1992.
- Le Gal La Salle, G. et Ben-Ari, Y., Microiontophoretic effects of substance P on neurons of the medial amygdala and putamen of the rat. *Brain Res.*, 135: 174-179, 1977.
- Leichnetz, G.R., Watkins, L., Griffin, G., Murfin, R. et Mayer, D.J., The projection from nucleus raphe magnus and other brainstem nuclei to the spinal cord in the rat: a study using the HRP blue-reaction. *Neurosci. Lett.*, 8: 119-124, 1978.
- Lembeck, F., Zur frage der zentralen übertragung afferenter impulse. III. Mitteilung. Das vorkommen und die bedeutung des substanz P. In den dorsalen würzeln des rückenmarks. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 219: 197-213, 1953.
- Lembeck, F. et Gamse, R., Substance P in peripheral sensory processes. dans : Substance P in the nervous system. Eds. Porter, R. et O'Connor, M., Ciba Found. Symp., 91, Pitman, Londres, Angleterre, pp. 33-54, 1982.
- Lembeck, F. et Zetler, G., Substance P: a polypeptide of possible physiological significance, especially within the nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.*, 4: 159-215, 1962.
- Lembeck, F. et Zetler, G., Substance P. dans : International encyclopedia of pharmacology and therapeutics, vol. 1, Pergamon Press, Oxford, Angleterre, pp. 29-71, 1971.
- Lew, R., Geraghty, D.P., Drapeau, G., Regoli, D. et Burcher, E., Binding characteristics of [<sup>125</sup>I]Bolton-Hunter [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P, a new selective radioligand for the NK<sub>1</sub> receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 184: 97-108, 1990.
- Lewis, T., The blood vessels of the human skin and their responses. Shaw, Londres, p. 47, 1927.
- Li, Y.-Q., Rao, Z.-R. et Shi, J.W., Substance P-like immunoreactive neurons in the nucleus tractus solitarii of the rat send their axons to the nucleus accumbens. *Neurosci. Lett.*, 120: 194-196, 1990a.
- Li, Y.-Q., Rao, Z.-R. et Shi, J.W., Midbrain periaqueductal gray neurons with substance P- or enkephalin-like immunoreactivity send projection fibers to the nucleus accumbens in the rat. *Neurosci. Lett.*, 119: 269-271, 1990b.
- Li, Z., Bains, J.S. et Ferguson, A.V., Functional evidence that the angiotensin antagonist losartan crosses the blood-brain barrier in the rat. *Brain Res. Bull.*, 30: 33-39, 1993.

- Lindfors, N., Brodin, E., Theodorsson-Norheim, E. et Ungerstedt, U., Calcium-dependent potassium-stimulated release of neurokinin A and neurokinin B from rat brain regions in vitro. *Neuropeptides*, 6: 453-461, 1985.
- Lindfors, N., Brodin, E., Tossman, U., Segovia, J. et Ungerstedt, U., Tissue levels and in vivo release of tachykinin and GABA in striatum and substantia nigra of rat brain after unilateral striatal dopamine innervation. *Exp. Brain. Res.*, 74: 527-534, 1989b.
- Lindfors, N., Brodin, E. et Ungerstedt, U., Neurokinin A and substance P in striato-nigral neurons in rat brain. *Neuropeptides*, 8: 127-132, 1986b.
- Lindfors, N., Brodin, E. et Ungerstedt, U., Amphetamine facilitates the in vivo release of neurokinin A in the nucleus tractus accumbens of the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 160: 417-420, 1989a.
- Lindfors, N., Yamamoto, Y., Pantaleo, T., Lagercrantz, H., Brodin, E. et Ungerstedt, U., In vivo release of substance P in the nucleus tractus solitarii increases during hypoxia. *Neurosci. Lett.*, 69: 94-97, 1986a.
- Lindsay, R.M. et Harmar, A.J., Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature Lond.*, 337: 362-364, 1989.
- Lipscombe, D., Kongsamut, S. et Tsien, R.W.,  $\alpha$ -adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature*, 340: 639-642, 1989.
- Lisa, M., Marmo, E., Wible, J.H. et Dimicco, J.A., Injection of muscimol into posterior hypothalamus blocks stress-induced tachycardia. *Am. J. Physiol.*, 257: R246-R251, 1989.
- Lisoprawski, A., Blanc, G. et Glowinski, J., Activation by stress of the habenulo-interpeduncular substance P neurons in the rat. *Neurosci. Lett.*, 25: 47-51, 1981.
- Liu, Y.F. et Quirion, R., Presence of various carbohydrate moieties including  $\beta$ -galactose and N-acetylglucosamine residues on solubilized porcine brain neurokinin-A/substance P receptors. *J. Neurochem.*, 57: 1944-1950, 1991.
- Liu-Chen, L.-Y., Liszczak, T.M., King, J.C. et Moskowitz, M.A., Immunoelectron microscopic study of substance P-containing fibers in feline cerebral arteries. *Brain Res.*, 369: 12-20, 1986.
- Ljungdahl, A., Hökfelt, T. et Nilsson, G., Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience*, 3: 861-943, 1978a.
- Ljungdahl, A., Hökfelt, T., Nilsson, G. et Goldstein, M., Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. II. Light microscopic localization in relation to catecholamine-containing neurons. *Neuroscience*, 3: 945-967, 1978b.
- Loesch, A. et Burnstock, G., Ultrastructural localization of serotonin and SP in vascular endothelial cells of rat femoral and mesenteric arteries. *Anat. Embryol.*, 178: 137-142, 1988.

- Lopez, H.S. et Adams, P.R., A G protein mediates the inhibition of the voltage-dependent potassium M current by muscarine, LHRH, substance P and UTP in bullfrog sympathetic neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 1: 529-542, 1989.
- Lorenz, R.G., Saper, C.B., Wong, D.L., Ciaranello, R.D. et Loewy, A.D., Co-localization of substance P- and phenylethanolamine-*N*-methyltransferase-like immunoreactivity in neurons of ventrolateral medulla that project to the spinal cord: potential role in control of vasomotor tone. *Neurosci. Lett.*, 55: 255-260, 1985.
- Losay, J., Mroz, E.A., Treager, G.W., Leeman, S.E. et Gamble, W.J., Action of substance P on the coronary blood flow in the isolated dog heart. dans : *Substance P*. Eds. VonEuler, U.S. et Pernow B., Raven, New York, pp. 287-293, 1977.
- Louis, S.M., Jamieson, A., Russell, N.J.W. et Dockray, G.J., The role of substance P and calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation and vasodilatation in the rat. *Neuroscience*, 32: 581-586, 1989.
- Lucas, L.R., Hurley, D.L., Krause, J.E. et Harlan, R.E., Localization of the tachykinin neurokinin B precursor peptide in rat brain by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Neuroscience*, 51: 317-345, 1992.
- Luiten, P.G.M., TerHorst, G.J., Karst, H. et Steffens, A.B., The course of paraventricular hypothalamic efferent to autonomic structures in medulla and spinal cord. *Brain Res.*, 329: 374-378, 1985.
- Lynn, B. et Hunt, S.P., Afferent C-fibres: physiological and biochemical correlations. *Trends Neurosci.*, 7: 186-188, 1984.

---

## M

---

- MacLeod, A.M., Merchant, K.J., Cascieri, M.A., Sadowski, S., Ber, E., Swain, C.J. et Baker, R., *N*-acetyl-L-tryptophan-benzyl esters: potent substance P receptor antagonists. *J. Med. Chem.*, 36: 2044-2045, 1993.
- Maeno, H., Kiyama, H. et Tohyama, M., Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. *Mol. Brain Res.*, 18: 43-58, 1993.
- Maggi, C.A., Evidence for receptor subtypes/species variants of receptors. Dans : *The tachykinin receptors*. Eds. Buck, S.H., Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 395-470, 1994.
- Maggi, C.A., Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog. Neurobiol.*, 45: 1-98, 1995.
- Maggi, C.A., The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. *J. Auton. Pharmacol.*, 11: 173-208, 1991.
- Maggi, C.A. et Meli, A., The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.*, 19: 1-43, 1988.



- Maggi, C.A., Patacchini, R., Astolfi, M., Rovero, P., Giuliani, S. et Giachetti, A., NK-2 receptor-selective antagonist, MEN 10,376, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257: 1172-1178, 1991a.
- Maggi, C.A., Patacchini, R., Giachetti, A. et Meli, A., Tachykinin receptors in the circular muscle of the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.*, 101: 996-1000, 1990a.
- Maggi, C.A., Patacchini, R., Giuliani, S., Rovero, P., Dion, S., Regoli, D., Giachetti, A. et Meli, A., Competitive antagonists discriminate between NK<sub>2</sub> tachykinin receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.*, 100: 588-592, 1990b.
- Maggi, C.A., Patacchini, R., Quartara, L., Rovero, P. et Santicioli, P., Tachykinin receptors in the guinea-pig isolated bronchi. *Eur. J. Pharmacol.*, 197: 167-174, 1991b.
- Maggi, C.A., Patacchini, R., Rovero, P. et Giachetti, A., Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J. Auton. Pharmacol.*, 13: 23-93, 1993.
- Maggi, C.A., Patacchini, R., Santicioli, P., Giuliani, S., Turini, D., Barbanti, G., Giachetti, A. et Meli, A., Human isolated ileum: motor responses of the circular muscle to electrical field stimulation and exogenous neuropeptides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 341: 256-261, 1990c.
- Maggio, J.E. et Mantyh, P.W., History of tachykinin peptides. dans : *The tachykinin receptors*. Eds. Buck, S.H., Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 1-21, 1994.
- Maggio, J.E. et Mantyh, P.W., Gut tachykinins. dans : *Handbook of physiology. The gastrointestinal system. Neural and endocrine biology*. Am. Physiol. Soc., Bethesda, MD, pp. 661-690, 1989.
- Maggio, J.E., Sandberg, B.E.B., Bradley, C.V., Iversen, L.L., Santikan, S., Williams, B.H., Hunter, J.C. et Hanley, M.R., Substance K: a novel tachykinin in mammalian spinal cord. dans : *Substance P*. Eds. Shrabaneck P. et Powell, D., Boole, Dublin, Irlande, pp.20-21, 1983.
- Mailleux, P. et Vanderhaeghen, J.J., Delta-9-tetrahydrocannabinol regulates substance P and enkephalin mRNAs levels in the caudate-putamen. *Eur. J. Pharmacol.*, 267: R1-3, 1994.
- Mantyh, P.W., Gates, T., Mantyh, C.R. et Maggio, J.E., Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissue. *J. Neurosci.*, 9: 258-279, 1989.
- Mantyh, P.W., Hunt, S.P. et Maggio, J.E., Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography in rat brain using <sup>3</sup>H-SP as the radioligand. *Brain. Res.*, 307: 147-165, 1984a.
- Mantyh, P.W., Maggio, J.E. et Hunt, S.P., The autoradiographic distribution of kassinin and substance K binding sites is different from the distribution of substance P binding sites in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 102: 361-364, 1984b.
- Mantyh, P.W., Mantyh, C.R., Gates, T., Vigna, S.R. et Maggio, J.E., Receptor binding sites for substance P and substance K in the canine gastrointestinal tract and their possible role in inflammatory bowel disease. *Neuroscience*, 25: 817-837, 1988.



- Marchand, J.E., Hershman, K., Kumar, M.S., Thompson, M.L. et Kream, R.M., Disulfiram administration affects substance P-like immunoreactive and monoaminergic neural system in rodent brain. *J. Biol. Chem.*, 265: 264-273, 1990.
- Marksteiner, J., Sperk, G. et Krause, J.E., Distribution of neurons expressing neurokinin B in the rat brain: immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.*, 317: 341-356, 1992.
- Martin, R.F., Jordan, L.M. et Willis, W.D., Differential projections of cat medullary raphe neurons demonstrated by retrograde labelling following spinal cord lesions. *J. Comp. Neurol.*, 182: 77-88, 1978.
- Massi, M., De Caro, G., Perfumi, M. et Venturi, F., Mapping of brain sites sensitive to the antidipsogenic effects of tachykinins. *Peptides*, 9: 347-356, 1988c.
- Massi, M. et Epstein, A.N., Suppression of salt intake in the rat by neurokinin A: comparison with the effect of kassinin. *Regul. Pept.*, 24: 233-244, 1989.
- Massi, M., Gentili, L., Pompei, P., DeCaro, G. et Schulkin, J., Inhibition of salt appetite in the rat following the injection of tachykinins into the medial amygdala. *Brain Res.*, 513: 1-7, 1990.
- Massi, M., Gentili, L., Pompei, P., DeCaro, G. et Epstein, A.N., Central tachykinin injection potently suppresses the need-free salt intake of the female rat. *Brain Res.*, 584: 77-82, 1992.
- Massi, M., Perfumi, M., DeCaro, G. et Epstein, A.N., Inhibitory effect of kassinin on salt intake induced by different natriorexigenic treatments in the rat. *Brain Res.*, 440: 232-242, 1988a.
- Massi, M., Polidori, C., Gentili, L., Perfumi, M., DeCaro, G. et Maggi, C.A., The tachykinin NH<sub>2</sub>-senktide, a selective neurokinin B receptor agonist, is a very potent inhibitor of salt appetite in the rat. *Neurosci. Lett.*, 92: 341-346, 1988b.
- Massi, M., Polidori, C., Perfumi, M., Gentili, L. et DeCaro, G., Tachykinin receptor subtypes involved in the central effects of tachykinins on water and salt intake. *Brain Res. Bull.*, 26: 155-160, 1991.
- Mastrangelo, D., Mathison, R., Huggel, H.J., Dion, S., D'Orléans-Juste, P., Rhaleb, N.-E., Drapeau, G., Rovero, P. et Regoli, D., The rat isolated portal vein: a preparation sensitive to neurokinins, particularly neurokinin B. *Eur. J. Pharmacol.*, 134: 321-326, 1987.
- Masu, Y., Nakayama, K., Tamaki, H., Harada, Y., Kuno, M. et Nakanishi, S., cDNA cloning of substance K receptor through oocyte expression system. *Nature Lond.*, 329: 836-838, 1987.
- Mathison, R. et Davison, J.S., Regulation of epithelial transport in the jejunal mucosa of the guinea pig by neurokinins. *Life Sci.*, 45: 1057-1064, 1989.
- Matsas, R., Rattray, M., Kenny, A.J. et Turner, A.J., The metabolism of neuropeptides. Endopeptidase-24.11 in human synaptic membrane preparation hydrolyses substance P. *Biochem. J.*, 228: 487-492, 1985.
- Matsuto, T., Yanagisawa, M., Otsuka, M., Kanazawa, I. et Munekata, E., The excitatory action of the newly-discovered mammalian tachykinins, neurokinin  $\alpha$  and neurokinin  $\beta$ , on neurons of the isolated spinal cord of the newborn rat. *Neurosci. Res.*, 2: 105-110, 1984.

- Matthews, M.R., Connaughton, M. et Cuello, A.C., Ultrastructure and distribution of substance P-immunoreactive sensory collaterals in the guinea pig prevertebral sympathetic ganglia. *J. Comp. Neurol.*, 258: 28-51, 1987.
- Matthews, M.R., Neher, G.E. et Penner, R., Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells. *J. Physiol. Lond.*, 418: 105-130, 1989.
- Matthijs, G., Himpens, B., Peeters, T.L. et VanTrappen, G., Effects of substance P on  $[Ca^{2+}]_i$  and force in intact guinea pig ileal smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 259: C150-C160, 1990.
- McCleskey, E.W., Fox, A.P., Feldman, D.H., Cruz, L.J., Olivera, B.M., Tsien, R.W. et Yoshikami, D.,  $\omega$ -Conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 4327-4331, 1987.
- McElroy, A.B., Clegg, S.P., Deal, M.J., Ewan, G.B., Hagan, R.M., Ireland, S.J., Jordan, C.C., Porter, B., Ross, B.C., Ward, P. et Whittington, A.R., Highly potent and selective heptapeptide antagonists of the neurokinin NK-2 receptor. *J. Med. Chem.*, 35: 2582-2591, 1992.
- McFadden, D., Zinner, M.J. et Jaffe, B.M., Substance P-induced intestinal secretion of water and electrolytes. *Gut*, 27: 267-272, 1986.
- McKnight, A.T., Maguire, J.J., Williams, B.J., Foster, A.C., Tridgett, R. et Iversen, L.L., Pharmacological specificity of synthetic peptides as antagonists at tachykinin receptors. *Regul. Pept.*, 22: 127, 1988.
- McLean, S., Ganong, A.H., Seeger, T.F., Bryce, D.J., Pratt, K.G., Reynolds, L.S., Siok, C.J., Lowe, J.A., III et Heym, J., Activity and distribution of binding sites in brain of a nonpeptide substance P (NK<sub>1</sub>) receptor antagonist. *Science*, 251: 437-439, 1991.
- McLean, S., Ganong, A., Seymour, P.A., Snider, R.M., Desai, J.C., Rosen, T., Bryce, D.K., Longo, K.P., Reynolds, L.S., Robinson, G., Schmidt, A.W., Siok, C. et Heym, J., Pharmacology of CP 99994, a nonpeptide antagonist of the tachykinin neurokinin-1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 267: 472-479, 1993a.
- McLean, S., Ganong, A., Seymour, P.A., Snider, R.M., Desai, J.C., Rosen, T., Bryce, D.K., Longo, K.P., Reynolds, L.S., Robinson, G., Schmidt, A.W., Siok, C. et Heym, J., Pharmacology of CP 99994, a nonpeptide antagonist of the tachykinin neurokinin-1 receptor. *Regul. Pept.*, 46: 120, 1993b.
- McLean, S., Snider, R.M., Desai, M.C., Rosen, T., Bryce, D.K., Longo, K.P., Schmidt, A.W. et Heym, J., CP 99996: a non peptide antagonist of the tachykinin NK-1 receptor. *Regul. Pept.*, 46: 329-331, 1993c.
- Meini, S., Patacchini, R. et Maggi, C.A., Tachykinin NK<sub>1</sub> receptor subtypes in the rat urinary bladder, *Br. J. Pharmacol.*, 108: 177P, 1993.
- Meini, S., Patacchini, R. et Maggi, C.A., Tachykinin NK<sub>1</sub> receptor subtypes in the rat urinary bladder, *Br. J. Pharmacol.*, *sous presse*, 1995.
- Melchiorri, P. et Negri, L., Evolutionary aspects of amphibian peptides. dans : Evolution and tumor pathology of the neuroendocrine system. Eds. Falkmer, S., Hakanson, R. et Sundler, F., Elsevier, New York, pp. 231-244, 1984.

- Mendelson, S.C. et Quinn, J.P., Identification of potential regulatory elements within the rat preprotachykinin A promoter. *Biochem. Soc. Trans.*, 21: 372S, 1993.
- Mendez, I.M., Naus, C.C., Elisevich, K. et Flumerfelt, B.A., Normalization of striatal proenkephalin and preprotachykinin mRNA expression by fetal substantia nigra grafts. *Exp. Neurol.*, 119: 1-10, 1993.
- Merchenthaler, I., Maderdrut, J.L., O'Harte, F. et Conlon, J.M., Localization of neurokinin B in the central nervous system of the rat. *Peptides*, 13: 815-829, 1992.
- Merighi, A., Polak, J.M., Gibson, S.J., Gulbenkian, S., Valentino, K.L. et Lundberg, J.M., Ultrastructural studies on CGRP- TKs- and somatostatin-immunoreactive neurons in rat dorsal root ganglia: evidence for the colocalization of different peptides in single secretory granules. *Cell Tissue Res.*, 254: 101-109, 1988.
- Merighi, A., Polak, J.M. et Theodosis, D.T., Ultrastructural visualization of glutamate and aspartate immunoreactivities in the rat dorsal horn, with special reference to the colocalization of glutamate, substance P and calcitonin-gene related peptide. *Neuroscience*, 40: 67-80, 1991.
- Merritt, J.E. et Rink, T.J., The effect of substance P and carbachol on inositol tris- and tetrakisphosphate formation and cytosolic free calcium in rat parotid acinar cells. A correlation between inositol phosphate levels and calcium entry. *J. Biol. Chem.*, 262: 14912-14916, 1987.
- Miller, R.J., Multiple calcium channels and neuronal function. *Science Wash. DC*, 235: 46-52, 1987.
- Milner, P., Ravelic, V., Hopwood, M., Feher, E., Lincoln, J., Kirkpatrick, K.A. et Burnstock, G., Ultrastructural localization of substance P and choline acetyltransferase in endothelial cells of rat coronary artery and release of substance P and acetylcholine during hypoxia. *Experimentia*, 45: 121-125, 1989.
- Minamino, N., Kangawa, K., Fukuda, A. et Matsuo, H., Neuromedin L: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Neuropeptide*, 4: 157-166, 1984.
- Mitchell, R.H., Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochem. Biophys. Acta*, 416: 81-147, 1975.
- Mitchell, R. et Fleetwood-Walker, S., Substance P, but not TRH, modulates the 5-HT autoreceptor in ventral lumbar spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.*, 76: 119-120, 1981.
- Morilak, D.A., Morris, M. et Chalmers, J., Release of substance P in the nucleus tractus solitarius measures by in vivo microdialysis: response to stimulation of the aortic depressor nerves in rabbit. *Neurosci. Lett.*, 94: 131-137, 1988.
- Morimoto, H., Murai, M., Maeda, Y., Hagiwara, D., Miyake, H., Matsuo, M. et Fujii, T., FR 133,680: a novel tripeptide substance P antagonist with NK<sub>1</sub> receptor selectivity. *Br. J. Pharmacol.*, 106: 123-126, 1992a.
- Morimoto, H., Murai, M., Maeda, Y., Yamaoka, M., Nishikawa, M., Kiyotoh, S. et Fujii, T., FK 224, a novel cyclopeptide substance P antagonist with NK-1 and NK-2 receptor selectivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 262: 398-402, 1992b.

- Morin-Surun, M.P., Jordan, D., Champagnat, J., Spyer, K.M. et Denavit-Saubie, M., Excitatory effects of iontophoretically applied substance P on neurons in the nucleus tractus solitarius or the cat: lack of interaction with opiates and opioids. *Brain Res.*, 307: 388-392, 1984.
- Morrison, C.F., McAllister, J., Dobson, S.P., Mulderry, P.K. et Quinn, J.P., An activator element within the preprotachykinin-A promoter. *Molec. Cell. Neurosci.*, 5: 165-175, 1994.
- Munekada, E., Neurokinin A and Neurokinin B. *Comp. Biochem. Physiol.*, 98C: 171-179, 1991.
- Murakami, S., Inagaki, S., Shimada, S., Kubota, Y., Kito, S., Ogawa, N. et Takagi, H., The colocalisation of substance P- and somatostatin-like peptides in neurons of the entopeduncular neurons of the rat. *Peptides*, 10: 973-977, 1989a.
- Murakami, S., Kubota, Y., Kito, S., Shimada, S., Takagi, H., Wu, J.-Y. et Inagaki, S., The coexistence of substance P- and glutamic acid decarboxylase-immunoreactivity in entopeduncular neurons of the rat. *Brain Res.*, 485: 403-406, 1989b.
- Murase, K., Ryu, P.D. et Randic, M., Substance P augments a persistent slow inward calcium-sensitive current in voltage-clamped spinal dorsal horn neurons of the rat. *Brain Res.*, 365: 369-376, 1986.
- Murase, K., Ryu, P.D. et Randic, M., Tachykinins modulate multiple ionic conductances in voltage-clamped rat spinal dorsal horn neurons. *J. Neurophysiol.*, 61: 854-865, 1989.
- Mussap, C.J., Geraghty, D.P. et Burcher, E., Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. *J. Neurochem.*, 60: 1987-2009, 1993.

---

## N

---

- Naftchi, N.E., Maker, H., Lapin, E., Sleis, J., Lajtha, A. et Leeman, S., Acute reduction of brain substance P induced by nicotine. *Neurochem. Res.*, 13: 305-309, 1988.
- Nagashima, A., Takano, Y., Tateishi, K., Matsuoka, Y., Hamaoka, T. et Kamiya, H., Cardiovascular roles of tachykinin peptides in the nucleus tractus solitarii of rats. *Brain Res.*, 487: 392-396, 1989a.
- Nagy, J.L., Hunt, S.P., Iversen, L.L. et Emson, P.C., Biochemical and anatomical observation on the degeneration of peptide-containing primary afferent neurons after neonatal capsaicin. *Neuroscience*, 6: 1923-1934, 1981.
- Nakada, Y., Kaneko, T., Shigemoto, R., Nakanishi, S. et Mizuno, N., Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.*, 347: 249-274, 1994.
- Nakajima, Y., Nakajima, S. et Inoue, M., Pertussis toxin-insensitive G protein mediates substance P-induced inhibition of potassium channels in brain neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 3643-3647, 1988.

- Nakajima, Y. et Nakajima, S., Signal transduction mechanisms of tachykinin effects on ion channels. dans : The tachykinin receptors. Eds. Buck, S.H., Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 285-327, 1994.
- Nakajima, Y., Nakajima, S., Obata, K., Carlson, C.G. et Yamagushi, K., Dissociated cell culture of cholinergic neurons from the nucleus basalis of Meynert and other basal forebrain nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 6325-6329, 1985.
- Nakajima, Y., Tschuchida, K., Negishi, M., Ito, S. et Nakanishi, S., Direct linkage of three tachykinin receptors to stimulation of both phosphatidylinositol hydrolysis and cyclic AMP cascades in transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 267: 2437-2442, 1992.
- Nakajima, T., Yasuhara, T., Erspamer, V., Falconieri-Erspamer, G., Negri, L. et Endean, R., Physalaemin- and bombesin-like peptides in the skin of the australian leptodactylid frog *Uperoleia rugosa*. *Chem. Pharm. Bull.*, 28: 689-695, 1980.
- Nakanishi, S., Substance P precursor and kininogen: their structure, gene organization and regulation. *Physiol. Rev.*, 67: 1117-1142, 1987.
- Nakanishi, S., Mammalian tachykinin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14: 123-136, 1991.
- Nakanishi, S., Nakajima, Y. et Yokota, Y., Signal transmission and ligand binding domains of the tachykinin receptors. *Regul. Pept.*, 46: 37-42, 1993.
- Nakata, Y., Kusaka, Y., Segawa, T., Yajima, H. et Kitagawa, K., Substance P: regional distribution and specific binding to synaptic membranes in rabbit central nervous system. *Life Sci.*, 22: 259-267, 1978.
- Nakayama, Y., Takano, Y., Saito, R. et Kamiya, H., Central pressor actions of tachykinin NK-3 receptor in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res.*, 595: 339-342, 1992.
- Nantel, F., Rouissi, N., Rhaleb, N.-E., Dion, S., Drapeau, G. et Regoli, D., The rabbit jugular vein is a contractile NK-1 receptor system. *Eur. J. Pharmacol.*, 179: 457-462, 1990.
- Nantel, F., Rouissi, N., Rhaleb, N.-E., Jukic, D. et Regoli, D., Pharmacological evaluation of the angiotensin, kinin and neurokinin receptors on the rabbit vena cava. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 18: 398-405, 1991.
- Nau, R., Schäfer, G., Deacon, C.F., Cole, T., Agoston, D.V. et Conlon, J.M., Proteolytic inactivation of substance P and neurokinin A in the longitudinal muscle layer of guinea pig small intestine. *J. Neurochem.*, 47: 856-864, 1986.
- Nawa, H., Kotani, H. et Nakanishi, S., Tissue specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by early alternative RNA splicing. *Nature Lond.*, 312: 729-734, 1984.
- Neal, C.R., Jr., Swann, J.M. et Newmann, S.W., The colocalization of substance P and prodynorphin immunoreactivity in neurons of the medial preoptic area, bed nucleus of the stria terminalis and medial nucleus of the amygdala of the Syrian hamster. *Brain. Res.*, 496: 1-13, 1989.

- Neher, E., Marty, A., Fukuda, K., Kubo, T. et Numa, S., Intracellular calcium release mediated by two muscarinic receptor subtypes. *FEBS Lett.*, 240: 88-94, 1988.
- Nguyen, Q.T., Jukic, D., Chrétien, L., Gobeil, F., Boussougou, M. et Regoli, D., Two NK-3 receptor subtypes: demonstration by biological assays. *Neuropeptides*, 27: 157-161, 1994.
- Nicoll, R.A., The action of thyrotropin-releasing hormone, substance P and related peptides on frog spinal motoneurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 207, 817-824, 1978.
- Nielsen, K.H. et Blaustein, J.D., Many progesterin receptor-containing neurons in the guinea pig ventrolateral hypothalamus contain substance P: Immunocytochemical evidence. *Brain Res.*, 517: 175-181, 1990.
- Nilsson, G., Hökfelt, T. et Pernow, B., Distribution of substance P-like immuno-reactivity in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Medical Biol.*, 52: 424-427, 1974.
- Nisenbaum, L.K., Kitai, S.T., Crowley, W.R. et Gerfen, C.R., Temporal dissociation between changes in striatal enkephalin and substance P messenger RNAs following striatal dopamine depletion. *Neuroscience*, 60: 927-937, 1994.
- Norregaard, T.V. et Moskowitz, M.A., Substance P and the sensory innervation of intracranial and extracranial feline cephalic arteries. Implication for vascular pain mechanisms in man. *Brain*, 108: 517-533, 1985.
- North, R.A., Williams, J.T., Surprenant, A. et Christie, M.J.,  $\mu$  and  $\delta$  receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 5487-5491, 1987.
- Nowak, L.M. et McDonald, R.L., Substance P: ionic basis for depolarizing responses of mouse spinal cord neurons in cell culture. *J. Neuroscience*, 2: 1119-1128, 1982.
- Nyberg, F., Peptidases in human cerebrospinal fluid converting dynorphin and substance P to bioactive fragments. *Adv. Biosci.*, 65: 65-72, 1987.

---

## O

---

- Oblin, A., Danse, M.J. et Zivkovic, B., Metallopeptidase (EC 3.4.24.11) but not angiotensin converting enzyme is involved in the inactivation of substance P by synaptic membranes of the rat substantia nigra. *Life Sci.*, 44: 1467-1474, 1989.
- Ogawa, T., Kanazawa, I. et Kimura, S., Regional distribution of substance P, neurokinin  $\alpha$  and neurokinin  $\beta$  in rat spinal cord, nerve roots and dorsal root ganglia, and the effects of dorsal root section or spinal transection. *Brain Res.*, 359: 152-157, 1985.
- Ogura, A. et Takahashi, M., Differential effects of a dihydropyridine derivative to  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathways in neuronal preparations. *Brain Res.*, 301: 323-330, 1984.

- O'Harte, F., Burcher, E., Lovas, S., Smith, D.D., Vaudry, H. et Conlon, J.M., Ranakinin: a novel NK<sub>1</sub> tachykinin receptor agonist isolated with neurokinin B from the brain of the frog *Rana ridibunda*. *J. Neurochem.*, 57: 2086-2091, 1991.
- Oku, R., Saton, M. et Takagi, H., Release of substance P from the spinal dorsal horn is enhanced in polyarthritic rats. *Neurosci. Lett.*, 74: 315-319, 1987.
- Oldfield, B.J., Sheppard, A. et Nilaver, G., A study of the substance P innervation of the intermediate zone of the thoracolumbar spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 236: 127-140, 1985.
- Otsuka, M. et Konishi, S., Substance P and excitatory transmitter of primary sensory neurons. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 40: 135-143, 1976a.
- Otsuka, M. et Konishi, S., Release of substance P-like immunoreactivity from isolated spinal cord of newborn rat. *Nature Lond.*, 264: 83-84, 1976b.
- Otsuka, M. et Konishi, S., Electrophysiological and neurochemical evidence for substance P as a transmitter of primary sensory neurons, dans : Substance P. Eds. VonEuler, U.S. et Pernow, B., Raven Press, New York, pp. 207-216, 1977.
- Otsuka, M., Konishi, S. et Takahashi, T., A further study of the motoneuron depolarizing peptide extracted from dorsal roots of bovine spinal nerves. *Proc. Jpn. Acad.*, 48: 747-752, 1972.
- Otsuka, M. et Yanagisawa, M., Does substance P act as a pain transmitter? *Trends-Pharmacol. Sci.*, 8: 506-510, 1987.
- Otsuka, M. et Yoshioka, K., Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.*, 73: 229-307, 1993.
- Owen, D.G., Marsh, S.J. et Brown, D.A., M-current noise and putative M-channels in cultured rat sympathetic ganglion cells. *J. Physiol.*, 431: 269-290, 1990.

---

## P

---

- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. et Moncada, S., Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature Lond.*, 327: 524-526, 1987.
- Palmer, A.A., Steele, M.K., Shackelford, R.L. et Ganong, W.F., Intravenous losartan inhibits the increase in plasma luteinizing hormone and water intake produced by intraventricular angiotensin II. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 205: 263-266, 1994.
- Papka, R.E., Furness, J.B., Della, N.G. et Costa, M., Depletion by capsaicin of substance P-immunoreactivity and acetylcholinesterase activity from nerve fibres in the guinea-pig heart. *Neurosci. Lett.*, 27: 47-53, 1981.
- Pascual, D.W. et Bost, K.L., Substance P production by P388D1 macrophages: A possible autocrine function for this neuropeptide. *Immunology*, 71: 52-56, 1990.
- Patacchini, R., Astolfi, M., Quartara, L., Rovero, P., Giachetti, A. et Maggi, C.A., Further evidence for the existence of NK<sub>2</sub> tachykinin receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.*, 194: 91-96, 1991.



- Penny, G.R., Afsharpour, S. et Kitai, S.T., the glutamate decarboxylase-, leucine enkephalin-, methionine enkephalin- and substance P-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat and cat: evidence for partial population overlap. *Neuroscience*, 17: 1011-1045, 1986.
- Perfumi, M., Polidori, C., Massi, M. et DeCaro, G., Neurokinin A selectively inhibits water intake in the rat. *Neuropharmacol.*, 27: 909-914, 1988.
- Perney, T.M., Hirning, L.D., Leeman, S.E. et Miller, R.J., Multiple calcium channels mediate neurotransmitter release from peripheral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 6656-6659, 1986.
- Pernow, B., Studies on substance P purification, occurrence and biological actions. *Acta Physiol. Scand.*, 29 Suppl. 105: 1-90, 1953.
- Petit, F. et Glowinski, J., Stimulatory effect of substance P on the spontaneous release of newly synthesized [ $H^3$ ]dopamine from rat striatal slices: a tetrodotoxin sensitive process. *Neuropharmacol.*, 25: 1015-1021, 1986.
- Petit, F., Beaujouan, J.C., Saffroy, M., Torrens, Y., Chassaing, G., Lavielle, S., Besseyre, J., Garret, C., Caruette, A. et Glowinski, J., Further demonstration that [Pro<sup>9</sup>]-substance P is a potent and selective ligand of NK-1 tachykinin receptors. *J. Neurochem.*, 56: 879-889, 1991.
- Petit, F., Beaujouan, J.C., Saffroy, M., Torrens, Y. et Glowinski, J., The nonpeptide NK-2 antagonist SR 48968 is also a NK-3 antagonist in the guinea pig but not in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191: 180-187, 1993.
- Petit, F., Beaujouan, J.C., Saffroy, M., Torrens, Y., Lavielle, S., Chassaing, G., Loeuillet, D. et Glowinski, J., Un nouveau récepteur des tachykinines révélé par des analogues de la substance P dans l'iléon de cobaye. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 314: 229-303, 1992a.
- Petit, F., Saffroy, M., Torrens, Y., Glowinski, J., Beaujouan, J.C., Laveille, S., Chassaing, G. et Market, A., [ $H^3$ ]Pro<sup>9</sup>-SP, a new selective ligand for NK-1 binding sites. *Regul. Pept.*, 22: 147, 1988.
- Petit, F., Saffroy, M., Torrens, Y., Lavielle, S., Chassaing, G., Loeuillet, D., Glowinski, J. et Beaujouan, J.C., Possible existence of a new tachykinin receptor subtype in the guinea pig ileum. *Peptides*, 13: 383-388, 1992b.
- Pfaffinger, P., Muscarine and t-LHRH suppress M-current by activating an IAP-insensitive G-protein. *J. Neuroscience*, 8: 3343-3353, 1988.
- Phillis, J.W. et Limacher, J.J., Excitation of cortical cerebral neurons by various polypeptides. *Exp. Neurol.*, 43: 414-423, 1974.
- 
- Picard, P., Boucher, S., Regoli, D., Gitter, B.D., Howbert, J.J. et Couture, R., Use of non-peptide tachykinin receptor antagonists to substantiate the involvement of NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors in a spinal nociceptive reflex in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 232: 255-261, 1993
- Pickel, V.M., Joh, T.H. et Chan, J., Substance P in the rat nucleus accumbens: ultrastructural localization in axon terminals and their relation to dopaminergic afferents. *Brain Res.*, 444: 247-264, 1988.



- Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., Leeman, S.E. et Miller, R.J., Electron microscopic localization of substance P and enkephalin in axon terminals related to dendrites of catecholaminergic neurons. *Brain Res.*, 160: 387-400, 1979.
- Piercey, M.F., Dobry, P.J., Einspahr, F.J., Schroeder, L.A. et Masique, N., Use of substance P fragments to differentiate substance P receptors in different tissues. *Regul. Pept.*, 3: 337-349, 1982.
- Piercey, M.F., Schroeder, L.A., Folkers, K., Xu, J.C. et Hörig, J., Sensory and motor functions of spinal cord substance P. *Science Wash. DC*, 214: 1361-1363, 1981.
- Pike, R.L. et Yao, C., Increased sodium chloride appetite during pregnancy in the rat. *J. Nutr.*, 101: 169-176, 1971.
- Pinnock, R.D., Woodruff, G.N. et Turnbull, M.J., Actions of substance P, MIF, THR and related peptides in the substantia nigra, caudate nucleus and nucleus accumbens. *Neuropharmacol.*, 22: 687-697, 1983.
- Pitts, R.F., Larrabee, G. et Bronk, D.W., An analysis of hypothalamic cardiovascular control. *Am. J. Physiol.*, 134: 359-384, 1941.
- Pollard, H., Bouthenet, M.L., Moreau, J., Souil, E., Verroust, P., Ronco, P. et Schwartz, J.C., Detailed immunautoradiographic mapping of enkephalinase (EC 3.4.24.11) in rat central nervous system: comparison with enkephalins and substance P. *Neuroscience*, 30: 339-376, 1989.
- Pompei, P., Riffina, F. et McEwen, B., Preprotachykinin-A mRNA expression in discrete brain regions: An in situ hybridization study. Abstract of the 11th International Conference on the physiology of food and fluid intake. Oxford, UK, 28-30 Juillet 1993.
- Pompei, P., Tayebaty, S.J., DeCaro, G., Schulkin, J. et Massi, M., Bed nucleus of the stria terminalis: site for the antinatriorexic action of tachykinins. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 40: 977-981, 1991.
- Poosch, M.S., Goebel, D.J. et Bannon, M.J., Distribution of neurokinin receptor gene expression in the rat brain. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 17: 320.13, 1991.
- Post, C. et Paulsson, I., Antinociceptive and neurotoxic actions of substance P analogues in the rat's spinal cord after intrathecal administration. *Neurosci. Lett.*, 57: 159-164, 1985.
- Potter, D.D., Furshpan, E.J. and Landis, S.C., Multiple-transmitter status and "Dale's Principle". *Neurosci. Comment.*, 1: 1-9, 1981.
- Pourcho, R.G. et Goebel, D.J., Colocalization of substance P and  $\gamma$ -aminobutyric acid in amacrine cells of the cat retina. *Brain Res.*, 447: 164-168, 1988.
- Prabhakar, N.R., Landis, S.C., Kumar, K.G., Mullikin-Kilpatrick, D., Cherniak, N.S. et Leeman, S.E., Substance P and neurokinin A in the rat carotid body: localization, exogenous effects and changes in content in response to arterial pO<sub>2</sub>. *Brain Res.*, 481: 205-214, 1989.

- Prabhakar, N.R., Runold, M., Mitra, J., Lagercrantz, H. et Cherniak, N.S., Role of substance P in the transduction process of carotid chemoreception. dans : *Neurobiology of the control of breathing*, Eds. VonEuler, C. et Lagercrantz, H., Raven, New York, pp. 101-107, 1986.
- Prabhakar, N.R., Runold, M., Yamamoto, Y., Lagercrantz, H. et VonEuler, C., Effect of substance P antagonist on the hypoxia-induced carotid chemoreceptor activity. *Acta Physiol. Scand.* 121: 301-303, 1984.
- Prat, A., Picard, P. et Couture, R., Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered neuropeptide K in the rat: receptor characterization. *Br. J. Pharmacol.*, 112: 250-256, 1994.
- Probert, L. et Hanley, M.R., The immunocytochemical localization of "substance-P-degrading enzyme" within the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, 78: 132-137, 1987.
- Putney, J.W., Jr., Receptors and inositol phosphate-calcium signaling system. dans : *The tachykinin receptors*. Eds. Buck, S.H., Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 257-283, 1994.
- 

## Q

---

- Quartara, L., Rovero, P. et Maggi, C.A., Peptide-based tachykinin NK<sub>2</sub> receptor antagonists. *Med. Res. Rev.*, 15: 139-155, 1995.
- Quinn, J.P. et McAllister, J., The preprotachykinin A promoter interacts with a sequence specific single stranded DNA binding protein. *Nucleic Acids Res.*, 21: 1637-1641, 1993.
- Quintana, J., Wong, H. et Ascoli, M., The regulation of the binding affinity of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor by sodium ions is mediated by a highly conserved aspartate located in the second transmembrane domain of G-protein coupled receptor. *Mol. Endocrinol.*, 7: 767-775, 1993.
- Quirion, R., Multiple tachykinin receptors. *Trends Neurosci.*, 8: 183-185, 1985.
- Quirion, R. et Dam, T.-V., Multiple tachykinin receptors in guinea pig brain. High densities of substance K (neurokinin A) binding sites in the substantia nigra. *Neuropeptides*, 6: 191-204, 1985.
- Quirion, R., Dam, T.-V. et Guard, S., Selective neurokinin receptor radioligands. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 632, 137-144, 1991
- Quirion, R., Shults, C.W., Moody, T.W., Pert, C.B., Chase, T.N. et O'Donohue, T.L., Autoradiographic distribution of substance P receptors in rat central nervous system. *Nature Lond.* 303: 714-716, 1983.
- 

## R

---

- Radhakrishnan, V. et Henry, J.L., L-NAME blocks responses to NMDA, substance P and noxious cutaneous stimuli in cat dorsal horn. *NeuroReport*, 4: 323-326, 1993.

- Ralevic, V., Milner, P., Hudlicka, O., Kristel, F. et Burnstock, G., Substance P is released from the endothelium of normal and capsaicin-treated rat hind-limb vasculature, in vivo, by increased flow. *Circ. Res.*, 66: 1178-1183, 1990.
- Randrup, A. et Munkvad, I., Role of catecholamine in the amphetamine excitation response. *Nature Lond.*, 211: 540, 1986.
- Rane, S.G., Holz, G.G., IV et Dunlap, K., Dihydropyridine inhibition of neuronal calcium current and substance P release. *Pfluegers Arch.*, 409: 361-366, 1987.
- Regoli, D., Boudon, A. et Fauchère, J.-L., Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol. Rev.*, 46: 551-599, 1994a.
- Regoli, D., D'Orléans-Juste, P., Drapeau, G., Dion, S. et Escher, E., Pharmacological characterization of substance P antagonists. dans : *Tachykinin antagonists*. Eds. Hakanson, R. et Sundler, F., Elsevier, Amsterdam, pp. 277-287, 1985.
- Regoli, D., D'Orléans-Juste, P., Escher, E. et Mizrahi, J., Receptors for substance P. I. The pharmacological preparations. *Eur. J. Pharmacol.*, 97: 161-170, 1984a.
- Regoli, D., Drapeau, G., Dion, S. et Couture, R., New selective agonists for neurokinin receptors: pharmacological tools for receptor characterization. *Trends Pharmacol. Sci.*, 9: 290-295, 1988.
- Regoli, D., Drapeau, G., Dion, S., D'Orléans-Juste, P., Pharmacological receptors for substance P and neurokinins. *Life Sci.*, 40: 109-117, 1987a.
- Regoli, D., Drapeau, G., Dion, S., D'Orléans-Juste, P., Receptors for neurokinins in peripheral organs. dans : *Substance P and neurokinins*. Eds. Henry, J.L., Couture, R., Cuello, A.C., Pelletier, G., Quirion, R. et Regoli, D., Springer Verlag, New York, pp. 99-107, 1987b.
- Regoli, D., Escher, E. et Mizrahi, J., Substance P: structure activity studies and the development of antagonists. *Pharmacology*, 28: 301-320, 1984b.
- Regoli, D., Nantel, F., Tousignant, C., Jukic, D., Rouissi, N., Rhaleb, N.-E., Télémaque, S., Drapeau, G. et D'Orléans-Juste, P., Neurokinin agonists and antagonists. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 632: 170-183, 1991.
- Regoli, D., Nguyen, Q.T. et Jukic, D., Neurokinin receptor subtypes characterized by biological assays. *Life Sci.*, 54: 2035-2047, 1994b.
- Regoli, D., Rouissi, N. et D'Orléans-Juste, P., Pharmacological characterization of receptor types. dans : *The tachykinin receptors*. Eds. Buck, S.H., Humana Press, Totowa, NJ, pp. 367-393, 1994c.
- 
- Reid, M., Herrera-Marschitz, M., Hökfelt, T., Terrenius, L. et Ungerstedt, U., Differential modulation of striatal dopamine release by intranigral injection of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), dynorphin A and substance P. *Eur. J. Pharmacol.*, 147: 411-420, 1988.
- Reinecke, M., Weihe, E. et Forssmann, W.G., Substance P-immunoreactive nerve fibers in the heart. *Neurosci. Lett.*, 20: 265-269, 1980.

- Renzi, D., Evangelista, S., Mantellini, P., Santicioli, P., Maggi, C.A., Geppetti, P. et Surrentu, C., Capsaicin-induced release of neurokinin A from muscle and mucosa of gastric corpus: correlation with capsaicin-evoked release of calcitonin gene-related peptide. *Neuropeptide*, 19: 137-145, 1991.
- Renzi, D., Santicioli, P., Maggi, C.A., Surrenti, C., Pradelles, P. et Meli, A., Capsaicin-induced release of substance P-like immunoreactivity from the guinea pig stomach in vitro and in vivo. *Neurosci. Lett.*, 92: 254-258, 1988.
- Ribeiro-Da-Silva, A., Tagari, P. et Cuello, A.C., Morphological characterization of substance P-like immunoreactive glomeruli in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord and trigeminal subnucleus caudalis: a quantitative study. *J. Comp. Neurol.*, 281: 497-515, 1989.
- Ritter, J.K., Schmidt, C.J., Gibb, J.W. et Hanson, G.R., Increases of substance P-like immunoreactivity within striatal-nigral structures after subacute metamphetamine treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 229: 487-429, 1984.
- Ritter, J.K., Schmidt, C.J., Gibb, J.W. et Hanson, G.R., Dopamine mediated increases in nigral substance P-like immunoreactivity. *Biochem. Pharmacol.*, 34: 3161-3166, 1985.
- Rodriguez, R.E., Salt, T.E., Cahusa, P.M. et Hill, R.G., The behavioural effects of intrathecally administered [DPro<sup>2</sup>,DTrp<sup>7,9</sup>]substance P, an analogue with presumed antagonistic actions in the rat. *Neuropharmacol.*, 22: 173-176, 1983.
- Roques, B.P., Noble, F., Dauge, V., Fournie-Zaluski, M.C. et Beaumont A., Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 45: 87-146, 1993.
- Rosell, S. et Folkers, K., Substance P-antagonists: a new type of pharmacological tool. *Trends Pharmacol. Sci.*, 3: 211-212, 1982.
- Rouissi, N., Claing, A., Nicolau, M., Jukic, D., D'Orléans-Juste, P. et Regoli, D., Substance P (NK-1 receptor) antagonists: in vivo and in vitro activities in rats and guinea pigs. *Life Sci.*, 52: 1141-1147, 1993.
- Rovero, P., Pestellini, V., Maggi, C.A., Patacchini, R., Regoli, D. et Giachetti, A., A highly selective NK-2 tachykinin receptor antagonist containing D-tryptophan. *Eur. J. Pharmacol.*, 175: 113-115, 1990.
- Rovero, P., Pestellini, V., Patacchini, R., Giuliani, S., Santicioli, P., Maggi, C.A., Meli, A. et Giachetti, A., A potent and selective agonist for the NK-2 tachykinin receptor. *Peptide*, 10: 593-595, 1989a.
- Rovero, P., Pestellini, V., Rhaleb, N.E., Dion, S., Rouissi, N., Tousignant, C., Telemarque, S., Drapeau, G. et Regoli, D., Structure-activity studies of neurokinin A. *Neuropeptides*, 13: 263-270, 1989b.
- Rubin, B.S. et Barfield, R.J., Priming of estrous responsiveness by implants of 17 $\beta$ -estradiol in the ventromedial hypothalamic nucleus of female rats. *Endocrinology*, 106: 504-509, 1980.
- Rubin, B.S. et Barfield, R.J., Progesterone in the ventromedial hypothalamus facilitates estrous behaviour in ovariectomized, estrogen-primed rats. *Endocrinology*, 113: 797-804, 1983.

---

**S**

---

- Saffroy, M., Beaujouan, J.-C., Petitet, F., Torrens, Y. et Glowinski, J., Differential localization of  $^3\text{H}$ -[Pro $^9$ ]SP binding sites in the guinea pig and the rat brain. *Brain Res.*, 633: 317-325, 1994.
- Saffroy, M., Beaujouan, J.-C., Torrens, Y., Besseyre, J., Bergstrom, L. et Glowinski, J., Localization of tachykinin binding sites (NK1, NK2, NK3 ligands) in the rat brain. *Peptides*, 9: 227-241, 1988.
- Sakanaka, M., Inagaki, S., Shiosaka, S., Senba, E., Tagaki, H., Takatsuki, K., Kawai, Y., Iida, H., Hara, Y. et Tohyama, M., Ontogeny of substance P-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis. II. Lower brain stem. *Neuroscience*, 7: 1097-1126, 1982.
- Sakurada, T., Tan-No, K., Yamada, T., Sakurada, S., Kisara, K., Ohba, M. et Terenius, L., N-terminal substance P fragments inhibit the spirally-induced NK-1 receptor mediated behavioural responses in mice. *Life Sci.*, 47: PL109-PL113, 1990.
- Sakurada, T., Yamada, T., Tan-No, K., Manome, Y., Sakurada, S., Kisara, K. et Ohba, M., Differential effects of substance P analogs on NK-1 receptor agonists in the mouse spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 259: 205-210, 1991.
- Sale, N., Dutriez, I., Maziere, B., Ottaviani, M. et Roques, B.P., Neutral endopeptidase 24.11 in rat peripheral tissues: comparative localization by ex vivo and in vitro autoradiography. *Regul. Pept.*, 33: 209-222, 1991.
- Salin, P. et Chesselet, M.F., Paradoxical increase in striatal neuropeptide gene expression following ischemic lesions of the cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 9954-9958, 1992.
- Salter, M.W. et Henry, J.L., Responses of functionally identified neurons in the dorsal horn of the cat spinal cord to substance P, neurokinin A and physalaemin. *Neuroscience*, 43: 601-610, 1991.
- Samara, P., Cotecchia, S., Costa, T. et Lefkowitz, R.J., A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.*, 268, 4625-4636, 1993.
- Sandberg, B.E.B., Structure-activity relationships for substance P: a review. dans : Substance P: metabolism and biological actions. Eds. Jordan, C.C. et Oehme, P., Taylor & Francis, Londres, pp. 65-81, 1985.
- Sasai, Y. et Nakanishi, S., Molecular characterization of rat substance K receptor and its mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 605-702, 1989.
- Sasek, C.A., Wessendorf, M.W. et Helke, C.J., Evidence of co-existence of thyrotropin-releasing hormone, substance P and serotonin in ventral medullary neurons that project to the intermediolateral cell column in the rat. *Neuroscience*, 35: 105-119, 1990.

- Schambye, H.T., Hjorth, S.A., Bergsma, D., Sathe, G. et Schwartz, T.W., Differentiation between binding sites for angiotensin II and non peptide antagonists on the angiotensin II type 1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 7046-7050, 1994.
- Schild, H.O., pA, a new scale for for the measurement of drug antagonism. *Br. J. Pharmacol.*, 2: 189-206, 1947.
- Schild, H.O., Receptor classification with special reference to beta adrenergic receptors. dans : *Drug receptors*. Eds. Rang H.P., University Park Press, Baltimore, MD, pp. 29-36, 1973.
- Schilling, W., Bittiger, H., Brugger, F., Criscione, L., Hauser, K., Ofner, S., Olpe, H.R., Vassout, A. et Veenstra, S., Approches toward the desing and synthesis of nonpeptidic substance P antagonists. dans : *Perspectives in medical chemistry*. Eds. Teste, B., Kyburz, E., Fuhrer, W. et Giger, R., Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel, Suisse, pp. 207-220, 1993.
- Schini, V.B., Katusic, Z.S. et Vanhoutte, P.M., Neurohypophyseal peptides and tachykinin stimulate the production of cyclic GMP in cultured porcine aortic endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 255: 994-1000, 1990.
- Schmidt, A.W., McLean, S. et Heym, J., The substance P receptor antagonist CP-96,345 interacts with Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur. J. Pharmacol.*, 215: 351-352, 1992.
- Schoofs, L., Holman, G.M., Hayes, T.K., Nachman, R.J. et DeLoof, A., Locustatachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. *FEBS Lett.*, 261: 397-401, 1990a.
- Schoofs, L., Holman, G.M., Hayes, T.K., Kochansky, J.P., Nachman, R.J. et DeLoof, A., Locustatachykinin III and IV: Two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. *Regul. Pept.*, 31: 199-212, 1990b.
- Shadiack, A.M., Carlson, C.D., Ding, M., Hart, R.P. et Jonakait, G.M., Lipopolysaccharide induces substance P in sympathetic ganglia via ganglionic interleukin-1 production. *J. Neuroimmunol.*, 49: 51-58, 1994.
- Shapiro, M.S. et Hille, B., Substance P and somatostatin inhibit calcium channels in rat sympathetic neurons via different G protein pathways. *Neuron*, 10: 11-20, 1993.
- Sharp, T., Zetterström, T., Ljungberg, T. et Ungerstedt, U., A direct comparison of amphetamine-induced behaviours and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis. *Brain Res.*, 401: 322-330, 1987.
- Shen, K.-Z. et North, R.A., Substance P opens cation channels and closes potassium channels in rat locus coreuleus neurons. *Neuroscience*, 50: 345-353, 1992.
- 
- Shigemoto, R., Yokota, Y., Tsuchida, K. et Nakanishi, S., Cloning and expression of a rat neuromedin K receptor cDNA. *J. Biol. Chem.*, 265: 623-628, 1990.
- Shults, C.W., Yajima, H., Gullner, H.-G., Chase, T.N. et O'Donohue, T.L., Demonstration and distribution of kassinin-like material (substance K) in the rat cental nervous system. *J. Neurochem.*, 45: 552-558, 1985.

- Shults, C.W., Quirion, R., Chronwall, B., Chase, T.N. et O'Donohue, T.L., A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. *Peptides*, 5: 1097-1128, 1984.
- Shuttleworth, C.W.R., Murphy, R.R., Furness, J.B. et Pompolo, S., Comparison of the presence and actions of substance P and neurokinin A in guinea-pig taenia coli. *Neuropeptides*, 19: 23-34, 1991.
- Simmaco, M., Severini, C., DeBiase, D., Barra, D., Bossa, F., Roberts, J.D., Melchiorri, P. et Erspamer, V., Six novel tachykinin- and bombesin-related peptides from the skin of the Australian frog *Pseudophryne guntheri*. *Peptides*, 11: 299-304, 1990.
- Sims, S.M., Walch, J.V., Jr. et Singer, J.J., Substance P and acetylcholine both suppress the same K<sup>+</sup> current in dissociated smooth muscle cells. *Amer. J. Physiol.*, 251: C580-C587, 1986.
- Sjödin, L., Conlon, T.P., Gustavson, C. et Uddholm, K., Interaction of substance P with dispersed pancreatic acinar cells from the guinea pig. Stimulation of calcium outflux, accumulation of cyclic GMP and amylase release. *Acta Physiol. Scand.*, 109: 107-110, 1980.
- Skofitsch, G. et Jacobowitz, D.M., Calcitonin gene-related peptide coexists with substance P in capsaicin sensitive neurons and sensory ganglia of the rat. *Peptides*, 6: 747-754, 1985.
- Smrcka, A.V., Hepler, J.R., Brown, K.O. et Sternweis, P.C., Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified G<sub>q</sub>. *Science*, 251: 804-807, 1991.
- Smullin, D.H., Skilling, S.R. et Larson, A.A., Interactions between substance P, calcitonin gene-related peptide, taurine and excitatory amino acids in the spinal cord. *Pain*, 42: 93-101, 1990.
- Snider, R.M., Constantine, J.W., Lowe, J.A., III, Longo, K.P., Lebel, W.S., Woody, H.A., Drozda, S.E., Desai, M.C., Vinick, F.J., Spencer, R.W. et Hess, H.J., A potent non peptide antagonist of the substance P (NK-1) receptors. *Science Wash. DC*, 251: 435-437, 1991.
- Sommers, D.L. et Beckstead, R.M., N-methyl-D-aspartate receptor antagonism alters substance P and met<sup>5</sup>-enkephalin biosynthesis in neurons of the rat striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 262: 823-833, 1992.
- Song, K., Zhuo, J. et Endelsohn, F.A.O., Access of peripherally administered DuP 753 to rat brain angiotensin II receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 104: 771-772, 1991.
- South, E.H. et Ritter, R.C., Substance P-containing trigeminal sensory neurons project to the nucleus of the solitary tract. *Brain Res.*, 372: 283-289, 1986.
- Spencer, S.E., Sawyer, W.B. et Loewy, A.D., Cardiovascular effects produced by L-glutamate stimulation of the lateral hypothalamic area. *Am. J. Physiol.*, 249: H540-H552, 1989.
- Spencer, S.E., Sawyer, W.B. et Loewy, A.D., L-glutamate mapping of cardioresponsive areas in the rat posterior hypothalamus. *Brain Res.*, 511: 149-157, 1990.
- Srinivasan, M., Gojny, M.M., Pantaleo, T., Lager-Crantz, H., Brodin, E., Runold, M. et Yamamoto, Y., Enhanced in vivo release of substance P in the nucleus tractus solitarius during hypoxia in the rabbit: role of peripheral input. *Brain Res.*, 546: 211-216, 1991.



- Stables, J.M., Arkininstall, S., Beresford, I.J.M., Seale, P., Ward, P. et Hagan, R.M., A novel peptide tachykinin antagonist which is potent at NK<sub>3</sub> receptors. *Neuropeptides*, 24: 232, 1993.
- Stephenson, K.N. et Steele, K.L., Brain angiotensin II receptor subtypes and the control of luteinizing hormone and prolactin secretion in female rats. *J. Neuroendocrinol.*, 4: 441-447, 1992.
- Sternini, C.K., Anderson, K., Frantz, G., Krause, J.E. et Brecha, N., Expression of substance P/neurokinin A-encoding preprotachykinin messenger ribonucleic acid in the rat enteric nervous system. *Gastroenterology*, 97: 348-356, 1989.
- Stewart-Lee, A. et Burnstock, G., Actions of tachykinins on the rabbit mesenteric artery: substance P and [Glp<sup>6</sup>,L-Pro<sup>9</sup>]SP<sub>6-11</sub> are potent agonists for endothelial neurokinin-1 receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 97: 1218-1224, 1989.
- Stjärne, P., Lundblad, L., Änggard, A., Hökfelt, T. et Lundberg, J.M., Tachykinins and calcitonin gene-related peptide: co-existence in sensory nerves of the nasal mucosa and effects on blood flow. *Cell Tissue Res.*, 256: 439-446, 1989.
- Strack, A.M., Sawyer, W.B., Hughes, G.H., Platt, K.B. et Loewy, A.D., A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infection. *Brain Res.*, 491: 156-162, 1989.
- Strasser, R.H., Benovic, J.L., Caron, M.G. et Lefkowitz R.J.,  $\beta$ -agonist- and prostaglandin E<sub>1</sub>-induced translocation of the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase: evidence that the kinase may act on multiple adenylate cyclase-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 6362-6366, 1986.
- Stricker, E.M., Thirst and sodium appetite after colloid treatment in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 95: 1-25, 1981.
- Subissi, A., Guelfi, M. et Criscuoli, M., Angiotensin converting enzyme inhibitors potentiate the bronchoconstriction induced by substance P in the guinea pig. *Br. J. Pharmacol.*, 100: 502-506, 1990.
- Sugiya, H., Tennes, K.A. et Putney, J.W., Jr., Homologous desensitization of substance-P-induced inositol polyphosphate formation in rat parotid acinar cells, *Biochem. J.*, 253: 459-446, 1987.
- Sun, M.-K. et Guyenet, P., Hypothalamic glutamatergic input to medullary sympathoexcitatory neurons in the rat. *Am. J. Physiol.*, 251: R798-R810, 1986.
- Sundelin, J.B., Provedini, D.M., Wahlestedt, C., Laurell, H., Pohl, J.S. et Peterson, P.A., Molecular cloning of the murine substance K and substance P receptor genes. *Eur. J. Biochem.*, 203: 625-631, 1992.
- Suzue, T., Yanaihara, N. et Otsuka, M., Actions of vasopressin, gastrin releasing peptide and other peptides on neurons of newborn rat spinal cord in vitro. *Neurosci. Lett.*, 26: 137-142, 1981.
- Suzuki, M., Suzuki, S. et Okubo, T., Modulation of bronchial reactivity by angiotensin-converting enzyme in unanaesthetized guinea pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 146: 154-158, 1992.



---

**T**

---

- Takahashi, T. et Otsuka, M., Distribution of substance P in cat spinal cord and the alteration following unilateral dorsal root section. *Jpn. J. Pharmacol. Suppl.* 24: 105, 1974.
- Takahashi, T. et Otsuka, M., Regional distribution of substance P in the spinal cord and nerve roots of the cat and the effect of dorsal root section. *Brain Res.*, 87: 1-11, 1975.
- Takahashi, K., Takana, A., Hara, M. et Nakanishi, S., The primary structure and gene organization of human substance P and neuromedin K receptors. *Eur. J. Biochem.*, 204: 1025-1033, 1992.
- Takamatsu, H., Tani, Y., Akiyama, M., Nakata, Y. et Segawa, T., Characterization of the carbohydrate chain on the substance P receptor in the rat brain cortex: effects of lectins on [<sup>3</sup>H]substance P binding. *J. Neurochem.*, 56: 1452-1454, 1991.
- Takano, Y. et Loewy, A.D., Reduction of [<sup>3</sup>H]substance P binding in the intermediolateral cell column after sympathectomy. *Brain Res.*, 333: 193-196, 1985.
- Takano, Y., Nagashima, A., Hagio, T., Tateishi, K. et Kamiya, H., Role of central tachykinin peptides in cardiovascular regulation in rat. *Brain Res.*, 528: 231-237, 1990.
- Takano, Y., Nagashima, A., Kamiya, H., Kurasawa, M. et Sato, A., Well-maintained reflex responses of sympathetic nerve activity to stimulation of baroreceptor, chemoreceptor and cutaneous mechanoreceptors in neonatal capsaicin-treated rats. *Brain Res.*, 445: 188-192, 1988.
- Takano, Y., Nagashima, A., Masui, H., Kuromizu, K. and Kamiya, H., Distribution of substance K (neurokinin A) in the brain and peripheral tissues of rats. *Brain Res.*, 369: 400-404, 1986.
- Takano, Y., Nakayama, Y., Matsumoto, T., Saito, R. et Kamiya, H.-O., The mechanism of central pressor actions of tachykinin NK-3 receptor in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats., *Regul. Pept.*, 46: 360-363, 1993.
- Takeda, Y., Chou, K.B., Takeda, J., Sachais, B.S. et Krause, J.E., Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179: 1232-1240, 1991.
- Takeda, Y. et Krause, J.E., Characterization of a high affinity neuropeptide  $\gamma$  binding sites in rat duodenum, urinary bladder and vas deferens. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 15: 346, 1989a.
- Takeda, Y. et Krause, J.E., Neuropeptide K potently stimulates salivary gland secretion and potentiates substance P-induced salivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 392-396, 1989b.
- Takeda, Y. et Krause, J.E., Pharmacological and molecular biological studies on the diversity of rat tachykinin NK-2 receptor subtypes in rat CNS, duodenum, vas deferens, and urinary bladder. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 632: 479-482, 1991.
- Tamiya, R., Hanada, M., Kawai, Y., Inagaki, S. et Tagaki, H., Substance P afferents have synaptic contacts with dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the rat. *Neurosci. Lett.*, 110: 11-15, 1990.

- Tanigushi, T., Fujiwara, M., Masuo, Y. et Kanazawa, I., Levels of neurokinin A, neurokinin B and SP in rabbit iris sphincter muscle. *Jap. J. Pharmacol.*, 42: 590-593, 1986.
- Taquet, H., Javoy-Agid, F., Mauborgne, A., Benoliel, J.J., Agid, Y., Legrand, J.C., Tramu, G., Casselin, F. et Hamon, M., Biochemical mapping of cholecystokinin-, substance P-, [Met]enkephalin-, [Leu]enkephalin- and dynorphin A (1-8)-like immunoreactivities in the human cerebral cortex. *Neuroscience*, 17: 871-883, 1988.
- Tashiro, T., Satoda, T., Matsushima, R. et Mizuno, N., Possible origins of substance P-like immunoreactive axons within Onuf's nucleus of the cat. *Brain Res.*, 497: 177-182, 1989.
- Tateishi, K., Kishimoto, S., Kobakashi, H., Kobuke, K. et Matsuoka, Y., Distribution and localization of neurokinin A-like immunoreactivity and neurokinin B-like immunoreactivity in rat peripheral tissue. *Regul. Pept.*, 30: 193-200, 1990.
- Tateishi, K., Matsuoka, Y. and Hamaoka, T., Establishment of highly specific radioimmunoassays for neurokinin A and neurokinin B and determination of tissue distribution of these peptides in rat central nervous system. *Regul. Pept.*, 24: 245-257, 1989.
- Tatemoto, K., Lundberg, J.M., Jörnvall, H. et Mutt, V., Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 128: 947-953, 1985.
- Taylor, S.J., Chae, H.Z., Rhee, S.G. et Exton, J.H., Activation of the  $\beta 1$  isozyme of phospholipase C by  $\alpha$  subunits of the  $G_q$  class of G proteins. *Nature*, 350: 516-518, 1991.
- Teichberg, V.I., Cohen, S. et Blumberg, S., Distinct classes of substance P receptors revealed by a comparison of the activities of substance P and some of its segments. *Regul. Pept.*, 1: 327-333, 1981.
- Theodorsson-Norheim, E., Jörnvall, H., Andersson, M., Norheim, I., Oberg, K. et Jacobsson, G., Isolation and characterization of neurokinin A, neurokinin A (3-10) and neurokinin A (4-10) from a neutral water extract of a metastatic ileal carcinoid tumor. *Eur. J. Biochem.*, 166: 693-698, 1987.
- Thériault, E., Otsuka, M. et Jessell, T., Capsaicin-evoked release of substance P from primary sensory neurons. *Brain Res.*, 170: 209-213, 1979.
- Thierry, A.M., Tassin, J.P., Blanc, G. et Glowinski, J., Selective activation of the mesocortical DA system by stress. *Nature Lond.*, 263: 242-244, 1976.
- Thoenen, H. et Barde, Y.-A., Physiology of nerve growth factor. *Physiol. Rev.*, 60: 1284-1335, 1980.
- Thor, K.B. et Helke, C.J., Serotonin- and substance P-containing projections to the nucleus tractus solitarius of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 265: 275-293, 1987.
- Timmermans, P.B.M.W.M., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.A.M. et Smith, R.D., Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.*, 45: 201-251, 1993.
- Tokimasa, T., Ishimatsu, M. et Akasu, T., Substance-P modulates separate set of potassium currents in bullfrog primary afferent neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.* 18: 796, 1992.

- Toney, G.M. et Porter, J.P., Functional role of brain AT1 and AT2 receptors in the central angiotensin II receptor antagonists. *Brain Res.*, 603: 57-63, 1993.
- Too, H.P., Cordova, J.L. et Maggio, J.E., Heterogeneity of tachykinin-like immunoreactivity peptides in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Peptide*, 10: 25-30, 1989a.
- Too, H.P., Cordova, J.L. et Maggio, J.E., A novel radioimmunoassay for neuromedin K. I. Absence of neuromedin K-like immunoreactivity in guinea-pig ileum and urinary bladder. II. Heterogeneity of tachykinins in guinea-pig tissues. *Regul. Pept.*, 26: 93-105, 1989b.
- Toresson, G., Brodin, E., Wahlstrom, A. et Bertilsson, L., Detection of N-terminally extended substance P but not of substance P in human cerebrospinal fluid: quantitation with HPLC-radioimmunoassay. *J. Neurochem.*, 50: 1701-1707, 1988.
- Torrens, Y., Beaujouan, J.C. et Glowinski, J., Pharmacological characterization of two tachykinin binding sites in the rat cerebral cortex. *Neuropeptides*, 6: 59-70, 1985.
- Torrens, Y., Lavielle, S., Chassaing, G., Marquet, A., Glowinski, J. et Beaujouan, J.C., Neuromedin K, a tool to further distinguish two central tachykinin binding sites. *Eur. J. Pharmacol.*, 102: 381-382, 1984.
- Tousignant, C., Guillemette, G. et Regoli, D., Binding sites for [<sup>3</sup>H][Sar<sup>9</sup>]SP in rat brain and guinea-pig ileum. *Brain Res.*, 560: 1-11, 1991.
- Tregear, G.W., Niall, H.D., Potts, J.T., Leeman, S.E. et Chang, M.M., Synthesis of substance P. *Nature New Biol.*, 232: 87-89, 1971.
- Tsai, H.-Y., Maeda, S., Iwatsubo, K. et Inoki, R., Effects of neuroactive peptides on labeled 5-hydroxytryptamine release from rat spinal slices in vitro. *Jpn. J. Pharmacol.*, 35: 403-406, 1984.
- Tsuchida, K., Shigemoto, R., Yokota, Y. et Nakanishi, S., Tissue distribution and quantitation of the mRNA for three rat tachykinin receptors. *Eur. J. Biochem.* 193: 751-757, 1990.
- Tsutsumi, M., Zhou, W., Millar, R.P., Mellon, P.L., Roberts, J.L., Flanagan, C., Dong, K., Boaz, K. et Selfon S.C., Cloning and functional expression of mouse gonadotropin releasing hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* 6: 1163-1169, 1992.
- Tuchscherer, M.M. et Seybold, V.S., Immunohistochemical studies of substance P, cholecystokinin-octapeptide and somatostatin in dorsal root ganglia of the rat. *Neuroscience*, 14: 593-605, 1989.
- Turski, L., Klockgether, T., Turski, W.A., Schwartz, M. et Sontag, K.-H., The entopeduncular nucleus regulates muscle tone in genetically spastic rats: role of substance P and  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Brain Res.*, 509: 347-350, 1990.

---

## U

---

- Unger, T., Becker, H., Petty, M., Demmert, G., Schneider, B., Ganten, D. et Lang, R.E., Differential effects of central angiotensin II and substance P on sympathetic nerve activity in conscious

- rats: implication for cardiovascular adaptation to behavioural responses. *Circ. Res.*, 63: 563-575, 1985.
- Unger, T., Carolus, S., Demmert, G., Ganten, D., Lang, R.E., Maser-Gluth, C., Steinberg, H. et Veelken, R., Substance P induces a cardiovascular defence reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ. Res.*, 63: 812-820, 1988.
- Unger, T., Rascher, W., Schuster, C., Pavlovitch, R., Schömig, A., Dietz, R. et Ganten, D., Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II: role of the sympathetic nervous system and vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.*, 71: 33-42, 1981.
- Unger, T., Rockhold, R.W., Schaz, K. et Ganten, D., Hämodynamische effekte von substanz P nach zentraler und peripherer applikation. Weiten hinweise für die beteiligung zentraler peptide ber der blutdruckregulation. *Therapiewoche*, 29: 7693, 1979.
- Urbán, L. et Dray, A., Synaptic activation of dorsal horn neurons by selective C-fibre excitation with capsaicin in the mouse spinal cord in vitro. *Neuroscience* 47, 693-702, 1992.
- Urban, L. et Papka, R.E., Origin of small primary afferent substance P-immunoreactive nerve fibers in the guinea-pig heart. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 12: 321-331, 1985.
- Urbán, L. et Randic, M., Slow excitatory transmission in rat dorsal horn: possible mediation by peptides. *Brain Res.*, 290: 336-341, 1985.

---

## V

---

- Valcourt, R.J. et Sachs, B.D., Penile reflexes and copulatory behaviour in male rats following lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res. Bull.*, 4: 131-133, 1979.
- VanDenBoss, R., Cools, A.R. et Ögren, S.O., Neurokinin A enhances the stimulatory effects of d-amphetamine on motor activity in the nucleus accumbens of the rat. *Acta Physiol. Scand.*, 138: 423-424, 1990.
- VanGiersbergen, P.L.M., Shatzer, S.A., Harbeson, S.L., Rouissi, N., Nantel, F. et Buck, S.H., Multiple NK<sub>2</sub> receptor subtypes are suggested by physiological and biochemical studies with neurokinin A (NKA) analogues and antagonists. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 632, 483-484, 1991a.
- VanGiersbergen, P.L.M., Shatzer, S.A., Henderson, A.K., Lai, J., Nakanishi, S., Yamamura, H.I. et Buck, S.H., Characterization of a tachykinin peptide NK<sub>2</sub> receptor transfected into murine fibroblast B82 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 1661-1666, 1991b.
- Vaught, J.L., Substance P antagonists and analgesia: a review of the hypothesis. *Life Sci.*, 43: 1419-1431, 1988.
- Vedder, H., Affolter, H.U. et Otten, U., Nerve growth factor (NGF) regulates tachykinin gene expression and biosynthesis in rat sensory neurons during early postnatal development. *Neuropeptides*, 24: 351-357, 1993.

- Velimirovic, B., Koyano, K., Nakajima, S. et Nakajima, Y., Substance P, somatostatine and Met-enkephalin regulate the same K-channel in cultured noradrenergic neurons from the locus coeruleus. *Soc. Neurosci. Abstr.* 17: 1474, 1991.
- Venepalli, B.R., Aimone, L.D., Appell, K.C., Bell, M.R., Dority, J.A., Goswami, R., Hall, P.L., Kumar, V., Lawrence, K.B., Logan, M.E., Scensny, P.J., Seelye, J.A., Tomczuk, B.E. et Yanni, J.M., Synthesis and substance P receptor binding activity of androstano[3,2-b]pyrimido[1,2-a]-benzimidazoles. *J. Med. Chem.*, 35: 374-378, 1992.
- Verge, V.M.K., Xu, Z., Xu, X.J., Weisenfeld-Hallin, Z. et Hökfelt, T., Marked increase in NO synthase mRNA in rat DRG after peripheral axotomy: In situ hybridization and functional studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 11617-11621, 1992.
- Viger, A., Beaujouan, J.C., Torrens, Y. et Glowinski, J., specific binding of a <sup>125</sup>I-substance P derivative to rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 40: 1030-1039, 1983.
- Vincent, S.R., Satoh, K., Armstrong, D.M. et Fibiger, H.C., Substance P in the ascending cholinergic reticular system. *Nature Lond.*, 306: 688-691, 1983.
- Von Euler, U.S., Untersuchungen über substanz P, die atropinfester, darmerregende und gefäßweiternde substanz aus darm und gehirn. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 181: 181-197, 1936.
- Von Euler, U.S. et Gaddum, J.H., An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol. Lond.*, 72: 74-87, 1931.
- Voorn, P., Docter, G.J., Jongen-Relo, A.L. et Jonker, A.J., Rostrocaudal subregional differences in the response of enkephalin, dynorphin and substance P synthesis in rat nucleus accumbens to dopamine depletion. *Eur. J. Neurosci.*, 6: 486-496, 1994.

---

## W

---

- Waksman, G., Hamel, E., Fournié-Zalusky, M.-C. et Roques, B.P., Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase "enkephalinase" and of  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 1523-1527, 1986.
- Walker, P.D., Green, T.L., Jonakait, G.M. et Hart, R.P., A comparison of substance P peptide and preprotachykinin mRNA levels during development of rat medullary raphe and neostriatum. *Int. J. Develop. Neurosci.*, 9: 47-55, 1991.
- Walker, R.J., Kemp, J.A., Yajima, H., Kitagawa, K. et Woodruff, G.N., The action of substance P on mesencephalic reticular and substantia nigra neurones of the rat. *Experientia Basel*, 32: 214-215, 1976.
- Wallengren, J. et Hakanson, R., Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory nerve-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.*, 143: 267-273, 1987.
- Walling, M.W., Brasitus, T.A. et Kimberg, D.V., Effects of calcitonin and substance P on the transport of Ca, Na and Cl across rat ileum in vitro. *Gastroenterology*, 73: 89-94, 1977.

- Walsh, D.M., Elliott, P.J. et Hagan, R.M., Role of NK-2 receptors in the antidipsogenic activity of neurokinins in the mouse. *Gen. Pharmacol.*, 23: 231-233, 1992.
- Wang, L., Ahmad, S., Benter, I.F., Chow, A., Mizutani, S. et Ward, P.E., Differential processing of substance P and neurokinin A by plasma dipeptidyl(amino)peptidase IV, aminopeptidase M, and angiotensin converting enzyme. *Peptides*, 12: 1357-1364, 1991.
- Wang, L., Sadoun, E., Stephens, R.E. et Ward, P.E., Metabolism of substance P and neurokinin A by vascular endothelium and smooth muscle. *Peptides*, 15: 497-503, 1994.
- Wang, Y., Badgery-Parker, T., Lovas, S., Chartrel, N., Vaudry, H., Burcher, E. et Conlon, J.M., Primary structure and receptor binding properties of a neurokinin A-related peptide from frog gut. *Biochem. J.*, 287: 827-832, 1992a.
- Wang, Y., O'Harte, F. et Conlon, J.M., Structural characterization of tachykinins (neuropeptide gamma, neurokinin A and substance P) from a reptile, Alligator mississippiensis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88: 277-286, 1992b.
- Ward, P., Ewan, G.B., Jordan, C.C., Ireland, S.J., Hagan, R.M. et Brown, J.R., Potent and highly selective neurokinin antagonists. *J. Med. Chem.*, 33: 1848-1851, 1990.
- Warden, M.K. et Young, W.S.III, Distribution of cells containing mRNAs encoding substance P and neurokinin B in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 272: 90-113, 1988.
- Watkins, L.R., Griffin, G., Leichnetz, G.R. et Mayer, D.J., The somatotopic organization of the nucleus raphe magnus and surrounding brain stem structures as revealed by HRP slow-release gels. *Brain Res.*, 181: 1-15, 1980.
- Watson, S.P., The action of substance P on contraction, inositol phospholipids and adenylate cyclase in rat small intestine. *Biochem. Pharmacol.*, 33: 3733-3737, 1984.
- Watson, S.P. et Downes, C.P., Substance P induced hydrolysis of inositol phospholipids in guinea-pig ileum and rat hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.*, 93: 245-253, 1983.
- Watson, S.P., Sandberg, B.E.B., Hanley, M.R. et Iversen, L.L., Tissue selectivity of substance P alkylesters suggesting multiple receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 87: 77-84, 1983.
- Wagh, D., Hazon, N., Balment, R.J. et Conlon, J.M., Structures and biological activities of novel tachykinins from fish brain. *Thirteenth Am. Peptide Symp.* 1993.
- Wagh, D., Sower, S., Bjerning, C. et Conlon, J.M., Novel tachykinins from the brain of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*, and the skate, *Raja rhina*. *Peptides*, 15: 155-161, 1994.
- Weihe, E., Neuropeptides in primary afferent neurons, dans : *The primary afferent neuron*. Eds. Zenler, W. et Neuhuber, W., Plenum, New York, pp. 127-159, 1990.
- Weihe, E., Hartschuth, W. et Nohr, D., Light microscopic immunoenzyme and electron microscopic immunogold cytochemistry reveal tachykinin immunoreactivity in Merkel cells of pig skin. *Neurosci. Lett.*, 124: 260-263, 1991.
- Weihe, E., Reinecke, M., Opherk, D. et Forssmann, W.G., Peptidergic innervation (substance P) in the human heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 13: 331-333, 1981.

- Wharton, J., Polak, J.M., McGregor, G.P., Bishop, A.E. et Bloom, S.R., The distribution of substance P-like immunoreactive nerves in the guinea-pig heart. *Neuroscience*, 6: 2193-2204, 1981.
- Whittle, B.J.R., Lopez-Belmonte, J. et Rees, D.D., Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation. *Br. J. Pharmacol.*, 98: 646-652, 1989.
- Wible, J.H., Luft, F.C. et Dimicco, J.A., Hypothalamic GABA supresses sympathetic outflow to the cardiovascular system. *Am. J. Physiol.*, 254: R680-R687, 1988.
- Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., Lundberg, J.M., Forssmann, W.G., Reinecke, M., Tschopp, F.A. et Fischer, J.A., Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioural responses of the rat. *Neurosci. Lett.*, 52: 199-204, 1984.
- Williams, B.J., Curtis, N.R., McKnight, A.T., Maguire, J., Foster, A. et Tridgett, R., Development of NK-2 selective antagonists. *Reg. Pept.*, 22: 189P, 1988.
- Wolf, G., Refined salt appetite methodology for rats demonstrated by assessing sex differences. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 36: 1012-1021, 1982.
- Womack, M.D., Hanley, M.R. et Jessell, T.M., Functional substance P receptors on a rat pancreatic acinar cell line. *J. Neurosci.*, 5: 3370-3378, 1985.
- Womack, M.D., Macdermott, A.B. et Jessell, T.M., Sensory transmitters regulate intracellular calcium in dorsal horn neurons. *Nature Lond.*, 334: 351-353, 1988.
- Wong, P.C., Price, W.A., Chiu, A.T., Duncia, J.V., Carini, D.J., Wexler, R.R., Johnson, A.L. et Timmermanns, P.B.M.W.M., Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VIII. Characterization of functional antagonism displayed by DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 252: 719-725, 1990a.
- Wong, P.C., Price, W.A., Chiu, A.T., Duncia, J.V., Carini, D.J., Wexler, R.R., Johnson, A.L. et Timmermanns, P.B.M.W.M., Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP 3174: an active metabolite of DuP 753, an orally antihypertensive agent. *J. Pharmacol., Exp. Ther.*, 255: 211-217, 1990b.
- Woodhams, P.L., Roberts, G.W., Polak, J.M. et Crow, T.J., Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the bed nucleus of the stria terminalis, septum and preoptic area. *Neuroscience*, 8: 677-703, 1983.
- Wormser, U., Laufer, R., Hart, Y., Chorev, M., Gilon, C. et Selinger, Z., Highly selective agonists for substance P receptor subtypes. *EMBO J.*, 5: 2805-2808, 1986.
- Wright, J.W. et Harding, J.W., Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioural responses. *Brain Res. Rev.*, 17: 227-262, 1992.
- Wu, D., Lee, C.H., Rhee, S.G. et Simon, M.I., Activation of phospholipase C by the  $\alpha$  subunit of the  $G_q$  and  $G_{11}$  proteins in transfected Cos-7 cells. *J. Biol. Chem.*, 267: 1811-1817, 1992.



---

**X**

---

- Xu, X.J., Maggi, C.A. et Wiesenfeld-Hallin, Z., On the role of NK<sub>2</sub> tachykinin receptor in the mediation of spinal reflex excitability in the rat. *Neuroscience*, 44: 483-490, 1991.
- Xu, X.J., Dalsgaard, C.J. et Wiesenfeld-Hallin, Z., Spinal substance P and N-methyl-D-aspartate receptors are coactivated in the induction of central sensitization of the nociceptive flexor reflex. *Neuroscience*, 51: 641-648, 1992a.
- Xu, X.J., Dalsgaard, C.J. et Wiesenfeld-Hallin, Z., Intrathecal CP-96,345 blocks reflex facilitation induced in rats by substance P and C-fiber-conditioning stimulation. *Eur. J. Pharmacol.*, 216: 337-344, 1992b.

---

**Y**

---

- Yamagushi, K., Nakajima, Y., Nakajima, S. et Stanfield, P.R., Modulation of inwardly rectifying channels by substance P in cholinergic neurones from rat brain in culture. *J. Physiol. Lond.*, 426, 499-520, 1990.
- Yamashita, H., Kannan, H., Kasai, M. et Osaka, T., Decrease in blood pressure by stimulation of the rat hypothalamic paraventricular nucleus with L-glutamate or weak current. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 19: 229-234, 1987.
- Yanagisawa, M., Otsuka, M., Konishi, S., Agaki, H., Folkers, K. et Rosell, S., A substance P antagonist inhibits a slow reflex response in the spinal cord of the newborn rat. *Acta Physiol. Scand.*, 116: 109-112, 1982.
- Yanagisawa, M., Yagi, N., Otsuka, M., Yanaihara, C. et Yanaihara, N., Inhibitory effects of galanin on the isolated spinal cord of the newborn rat. *Neurosci. Lett.*, 70: 278-282, 1986.
- Yashpal, K., Dam, T.V. et Quirion, R., Quantitative autoradiographic distribution of multiple neurokinin binding sites in rat spinal cord. *Brain Res.*, 506: 259-266, 1990.
- Yashpal, K., Gauthier, S.C. et Henry, J.L., Substance P given intrathecally at the spinal T<sub>9</sub> level increases arterial pressure and heart rate in the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 18: 93-103, 1987.
- Yasuhara, T., Nakajima, T., Falconieri-Ersparmer, G. et Ersparmer, V., New tachykinins Glu<sup>2</sup>Pro<sup>5</sup>-kassinin (Hylambates-kassinin) and hylambin in the skin of the african rhacophorid frog *Hylambates maculatus*. *Biomed. Res.*, 2: 613-617, 1981.
- Yau, W.M., Dorsett, J.A. et Youther, M.L., Calcium-dependent stimulation of acetylcholine release by substance P and vasoactive intestinal polypeptide. *Eur. J. Pharmacol.*, 120: 241-243, 1986.
- Yau, W.M. et Youther, M.L., Direct evidence for a release of acetylcholine from the myenteric plexus of guinea pig small intestine by substance P., *Eur. J. Pharmacol.*, 81: 665-668, 1982.



Yokota, Y., Sasai, Y., Tanaka, K., Fujiwara, T., Tsuchida, K., Shigemoto, R., Kakizura, A., Ohkubo, H. et Nakanishi, S., Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor. *J. Biol. Chem.*, 264: 17649-17652, 1989.

Yoshimura, M., et Jessell, T.M., Primary afferent-evoked synaptic responses and slow potential generation in rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *J. Neurophysiol.*, 62: 96-108, 1989.

Yoshizawa, T., Kimura, S., Kanazawa, I., Uchiyama, Y., Yanagisawa, M. et Masaki, T., Endothelin localizes in the dorsal horn and acts on the spinal neurones: possible involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels and substance P release. *Neurosci. Lett.*, 102: 179-184, 1989.

---

## Z

---

Zawadski, J.V., Furchgott, R.F. et Cherry, P., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by substance P. *Fed. Proc.*, 40: 689, 1981.

Zoffmann, S., Gether, U. et Schwartz, T.W., Conserved His<sup>VI-17</sup> of the NK-1 receptor is involved in binding of non-peptide antagonist but not substance P. *FEBS Lett.*, 336: 506-510, 1993.