

Université de Montréal

**SUBSTANCE P, RÉCEPTEURS NK1 ET NEURONES À SÉROTONINE :
RELATIONS ANATOMIQUES ET FONCTIONNELLES
DANS LE NOYAU RAPHE DORSALIS**

par

Baptiste LACOSTE

Département de physiologie

Faculté de médecine

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences neurologiques**

Juin 2009

© Baptiste LACOSTE, 2009

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**SUBSTANCE P, RÉCEPTEURS NK1 ET NEURONES À SÉROTONINE :
RELATIONS ANATOMIQUES ET FONCTIONNELLES DANS LE NOYAU RAPHE DORSALIS**

présentée par :

Baptiste LACOSTE

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Vincent CASTELLUCCI
président-rapporteur

Laurent DESCARRIES
directeur de recherche

Graciela PIÑEYRO
membre du jury

Rémi QUIRION
examineur externe

John F. KALASKA
représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

Nous avons étudié les relations anatomiques entre les systèmes de neurotransmission à substance P (SP) et à sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) dans le noyau du raphé dorsal (NRD) du rongeur, afin de mieux comprendre les interactions entre ces systèmes durant la régulation de l'humeur.

Le NRD reçoit une innervation SP provenant de l'habenula, et le blocage pharmacologique des récepteurs neurokinine-1 (rNK1) de la SP aurait des effets antidépresseurs. Chez le rongeur, le traitement par les antagonistes des rNK1 s'accompagne d'une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} de la 5-HT et d'une hausse de l'activité des neurones 5-HT dans le NRD, suggérant des interactions locales entre ces deux systèmes.

Dans un premier temps, nous avons démontré par doubles marquages immunocytochimiques en microscopies optique, confocale et électronique, la présence du rNK1 dans une sous-population de neurones 5-HT du NRD caudal. Lors de l'analyse en microscopie électronique, nous avons pu constater que les rNK1 étaient principalement cytoplasmiques dans les neurones 5-HT et membranaires sur les neurones non 5-HT du noyau. Grâce à d'autres doubles marquages, nous avons aussi pu identifier les neurones non-5-HT porteurs de rNK1 comme étant GABAergiques.

Nous avons ensuite combiné l'immunomarquage de la SP avec celui du rNK1, dans le but d'examiner les relations entre les terminaisons (varicosités *) axonales SP et les neurones 5-HT (pourvus de rNK1 cytoplasmiques) du NRD caudal. En simple marquage de la SP, nous avons pu estimer à 41% la fréquence avec laquelle les terminaisons SP font synapse. Dans le matériel doublement marqué pour la SP et son récepteur, les terminaisons SP ont été fréquemment retrouvées en contact direct ou à proximité des dendrites munies de rNK1 cytoplasmiques, mais toujours éloignées des dendrites à rNK1 membranaires. Pour

tester l'hypothèse d'une internalisation soutenue des rNK1 par la SP dans les neurones 5-HT, nous avons ensuite examiné la localisation subcellulaire du récepteur chez le rat traité avec un antagoniste du rNK1, le RP67580. La densité du marquage des rNK1 a été mesurée dans le cytoplasme et sur la membrane des deux types de dendrites (5-HT: rNK1 cytoplasmiques; non 5-HT: rNK1 membranaires). Une heure après une injection unique de l'antagoniste, la distribution du rNK1 est apparue inchangée dans les deux types de neurones (5-HT et non 5-HT). Par contre, après un traitement quotidien de 7 ou 21 jours avec l'antagoniste, nous avons mesuré une augmentation significative des densités cytoplasmique et membranaire du rNK1 dans les neurones 5-HT, sans aucun changement dans les neurones non 5-HT. Ces traitements ont aussi augmenté l'expression du gène rNK1 dans le NRD. Enfin, nous avons mesuré une hausse de la densité membranaire du rNK1 dans les neurones 5-HT, sans hausse de densité cytoplasmique, par suite d'une lésion bilatérale de l'habenula.

Ces résultats confortent l'hypothèse d'une activation et d'une internalisation soutenues des rNK1 par la SP dans les neurones 5-HT du NRD caudal. Ils suggèrent aussi que le trafic des rNK1 dans les neurones 5-HT du NRD représente un mécanisme cellulaire en contrôle de l'activation du système 5-HT par les afférences SP en provenance de l'habenula.

Mots clés : Substance P, récepteur NK1, sérotonine, raphe dorsalis, neuroanatomie fonctionnelle, immunocytochimie, hybridation in situ, habenula, humeur.

* Dans tout cet ouvrage, faute de meilleurs mots, nous utilisons les deux termes comme synonymes et non pour signifier que la « terminaison » est l'extrémité physique de l'axone, alors que la « varicosité » se situerait au long de ce prolongement. L'usage de l'un ou l'autre terme ne préjuge pas non plus de l'existence ou non d'une spécialisation membranaire synaptique.

SUMMARY

We have studied in detail the relationships between substance P (SP) and serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) neurotransmission systems in the dorsal raphe nucleus (DRN) of rodents, in order to further our understanding of their interaction during mood regulation.

The DRN receives a SP innervation arising from the habenula and, in human, it is known that blockade of the neurokinin-1 receptor (NK1r) of SP by antagonists may have antidepressant effects. In rodents, treatment with NK1r antagonists is known to increase the firing of DRN 5-HT neurons and to induce a desensitization of their 5-HT_{1A} autoreceptors, suggesting local interactions between the SP and 5-HT systems.

In a first step, we were able to demonstrate by means of light, confocal, and electron microscopic immunocytochemistry, including double immunolabelings of NK1r and of the biosynthetic enzyme of 5-HT, tryptophane hydroxylase, the presence of NK1r in a subpopulation of 5-HT neurons in the caudal DRN of rat and mouse. After the dual immunolabelings for electron microscopy, we also found that NK1r was mostly cytoplasmic in 5-HT neurons while predominating on the plasma membrane of TPH negative (non 5-HT) neurons. Subsequently, in additional double labeling experiments, we were able to identify most if not all non 5-HT dendrites bearing membranous NK1r as GABAergic.

In a second step, we combined the immunolabeling of SP with that of NK1r, in order to examine the relationships between SP axon terminals (varicosities *) and the two categories of DRN neurons (5-HT: cytoplasmic NK1r; non 5-HT: membranous NK1r). After single SP labeling, we could estimate the frequency with which SP terminals made synapse at 41%, at least. In the material doubly labeled for SP and NK1r, the SP terminals were often found in close contact or in the immediate proximity of dendrites endowed with cytoplasmic receptor, but never near non 5-HT dendrites bearing membrane bound receptors. To test the

hypothesis of a sustained internalization of NK1r in 5-HT neurons, we then tested the effects of RP67580, a selective NK1r antagonist, on the subcellular localization of the receptor. One hour after administration of a single dose, the NK1r distribution was unchanged in both types of dendrites (5-HT and non 5-HT). However, after administration for 7 (subchronic) or 21 (chronic) days, the cytoplasmic and the membrane densities of NK1r were significantly increased in 5-HT dendrites, without any change in non 5-HT dendrites. These treatments also increased NK1r gene expression in the caudal DRN. Lastly, a significant increase in the membrane density of NK1r was measured in the 5-HT neurons, without any increase of the cytoplasmic density, following bilateral electrolytic lesioning of the habenula. These results strengthened the hypothesis of a sustained activation and internalization of NK1r by SP in 5-HT neurons of the caudal DRN. They also suggested that trafficking of NK1r in these cells might represent a cellular mechanism in control of the activation of the 5-HT system by SP afferents from the habenula.

Key words : Substance P, NK1 receptor, serotonin, raphe dorsalis, rodent, functional neuroanatomy, immunocytochemistry, in situ hybridization, habenula, mood.

* Throughout this work, for lack better words, we use these terms as synonyms, without implying that a «terminal» is located at the physical end of the axon, whereas a «varicosity» would be situated along the length of this process. The use of one or the other words does not refer either to the existence or not of a synaptic membrane specialization.

« Ce n'est pas dans la science qu'est le bonheur, mais dans l'acquisition de la science ! Savoir pour toujours c'est l'éternelle béatitude; mais tout savoir serait une damnation. »

E. POE (1857)

« On part d'un détail quelconque, parfois mesquin, et on arrive à découvrir sans le vouloir de grands principes. »

G. SIMENON (1938)

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY.....	v
REMERCIEMENTS.....	xii
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xv
AVANT-PROPOS.....	xvi
PREMIER CHAPITRE : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
I - La substance P et son récepteur préféré : NK1.....	1
I-1 : <u>Les neuropeptides dans le système nerveux central</u>	1
a- Historique	
b- Physiologie	
<i>i</i> - Nature chimique	
<i>ii</i> - Métabolisme	
<i>iii</i> - Récepteurs des neuropeptides	
c- Fonctions des neuropeptides	
I-2 : <u>La substance P</u>	9
a- Historique	
b- Physiologie	
<i>i</i> - Nature chimique	
<i>ii</i> - Métabolisme	
<i>iii</i> - Récepteurs de la SP	
c- Localisation anatomique	
d- Fonctions de la substance P	
I-3 : <u>Le récepteur NK1</u>	13
a- Structure et propriétés	

b- Localisation anatomique	
<i>i-</i> Localisations dans le SNC	
<i>ii-</i> Discordances SP/NK1	
c- Outils pharmacologiques	
d- Fonctions du récepteur NK1	
II - La sérotonine et le noyau du raphé dorsal	20
II-1 : Sérotonine et système sérotoninergique	20
a- Historique	
b- Physiologie	
<i>i-</i> Nature chimique	
<i>ii-</i> Métabolisme	
<i>iii-</i> Récepteurs de la 5-HT	
c- Localisation anatomique	
<i>i-</i> Les sources	
<i>ii-</i> Les cibles	
d- Fonctions de la 5-HT	
II-2 : Le noyau du raphé dorsal (NRD)	25
a- Localisation	
b- Composition	
<i>i-</i> Hétérogénéité de la composition cellulaire du NRD	
<i>ii-</i> La SP dans le NRD	
c- Efférences et afférences du NRD	
<i>i-</i> Projections ascendantes 5-HT	
<i>ii-</i> Afférences	
III - Interactions SP/5-HT et régulation de l'humeur	30
III-1 : Définitions	30
a- Humeur et troubles associés	
b- L'exemple de la dépression	
III-2 : Pathophysiologie de la dépression	31
a- Sérotonine	
<i>i-</i> Dysfonctionnements de la neurotransmission 5-HT	
<i>ii-</i> Traitements à visée sérotoninergique	
b- Substance P	
<i>i-</i> Implication de la SP	
<i>ii-</i> Les antagonistes du récepteur NK1 : un échec en phase III	

III-3 : <u>Le modèle actuel</u>	34
IV - Objectifs de l'étude.....	35
IV-1 : <u>Distribution du récepteur NK1 dans le NRD</u>	36
IV-2 : <u>Antagonistes NK1 et récepteur NK1</u>	36
IV-3 : <u>Déafférentation SP du NRD et récepteur NK1</u>	37
DEUXIÈME CHAPITRE : LES ARTICLES.....	38
Premier article.....	38
<i>"IMMUNOCYTOCHEMICAL EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF SUBSTANCE P RECEPTOR (NK1) IN SEROTONIN NEURONS OF RAT AND MOUSE DORSAL RAPHE NUCLEUS"</i>	
<i>B. Lacoste, M. Riad et L. Descarries.</i>	
Légendes des figures.....	61
Deuxième article.....	71
<i>"TRAFFICKING OF NEUROKININ-1 RECEPTORS IN SEROTONIN NEURONS IS CONTROLLED BY SUBSTANCE P WITHIN THE RAT DORSAL RAPHE NUCLEUS"</i>	
<i>B. Lacoste, M. Riad, M-O. Ratté, S.M. Boye, D. Lévesque et L. Descarries.</i>	
Légendes des figures.....	99
TROISIÈME CHAPITRE : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	109
I - Synthèse des résultats.....	109
II - Faits saillants de l'étude.....	110

II-1 : <u>À propos de la localisation du récepteur NK1 dans le mésencéphale et de sa relation avec les neurones à sérotonine</u>	110
II-2 : <u>À propos de l'innervation SP du NRD et de sa relation avec les neurones à sérotonine</u>	112
II-3 : <u>À propos des manipulations de la distribution et de l'expression du récepteur NK1 dans le NRD caudal :</u>	114
III - Intégration aux circuits de l'humeur	117
IV - Projets complémentaires	118
V – Conclusion générale	120
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE	121
ANNEXE	146
Présentation de l'annexe	146
L'ANNEXE	147

“DEVELOPMENTAL PROFILE OF NEUREGULIN RECEPTOR ERBB4 IN POSTNATAL RAT CEREBRAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS”

N. Mechawar, B. Lacoste, W. Yu, L.K. Srivastava et R. Quirion.

REMERCIEMENTS

La liste est longue, mais je vais tâcher de n'oublier personne...

Je tiens d'abord à exprimer ma plus sincère gratitude au professeur Laurent Descarries, qui a... il en a fait des choses ! Il a commencé par m'accepter dans son laboratoire à l'époque où je quittais la France en espérant trouver une place dans le monde neuroscientifique canadien. Puis il a fait preuve de toute l'expertise, la sagesse, la disponibilité, et la patience que l'on trouve chez les meilleurs professeurs et mentors. Et naturellement, je remercie aussi du fond du cœur son irremplaçable assistant, le Dr. Mustapha Riad, pour sa disponibilité inépuisable et l'excellence de son encadrement.

Je tiens ensuite à remercier les départements de Physiologie, de Pathologie et biologie cellulaire, le Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central (GRSNC), et la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal pour leur accueil, leur support, et la qualité des formations qu'ils dirigent. Je pense en particulier au Dr. John F. Kalaska, à Michel Lauzon, à Nicole Blouin et Monique Leroux pour le temps qu'ils ont accordé à mes multiples requêtes. Je remercie aussi chaleureusement Johanne Payette pour sa générosité (*disponibilité* serait un terme trop faible pour décrire son travail), ainsi que mes deux parrains scientifiques, les professeurs Maria Leiza Vitale et Réjean Couture, pour leurs précieux conseils.

Je remercie aussi tous les membres de mon jury pour leur disponibilité et le temps qu'ils ont consacré à l'examen de cette thèse.

Enfin, je remercie bien sûr mes parents pour... disons que je n'en serais pas là aujourd'hui sans leur infaillible soutien, leur confiance et leur patience. Je suis aussi très reconnaissant envers ma famille et mes amis au sens large pour leurs suggestions et encouragements. D'une manière encore plus personnelle, sachant qu'une thèse comporte des hauts et des bas dans la vie d'un étudiant, je remercie de tout mon cœur ma femme, Patricia, pour tout le bonheur et le soutien qu'elle me procure quotidiennement.

LISTE DES FIGURES

Introduction générale :

FIGURE 1a : Mécanismes moléculaires impliqués dans le trafic des récepteurs couplés aux protéines G.....	8
FIGURE 2a : Modèle de la structure secondaire du récepteur NK1	19
FIGURE 3a : Représentation schématique des voies de projection ascendantes 5-HT des noyaux du raphé dans le cerveau du rat.....	28
FIGURE 4a : Représentation schématique des connexions afférentes et efférentes des noyaux de l'habenula.....	29

Premier article :

FIGURE 1 : Low power photomicrographs of the dorsal mesencephalon from a wild-type (WT) versus a NK1r knock-out mouse (KO).....	64
FIGURE 2 : Distribution of TpOH and NK1r immunoreactive neurons in rat and mouse mesencephalon, with emphasis on the dorsal raphe nucleus (DRN).....	65
FIGURE 3 : Comparative distribution of TpOH, NK1r and SP immunoreactivity in the rostral and caudal parts of rat and mouse ventral DRN.....	66
FIGURE 4 : Distinct and combined visualization of both TpOH and NK1r immunoreactivity in the ventral DRN of rat by immunofluorescence and confocal microscopy.....	67
FIGURE 5 : Electron micrographs illustrating the cellular and subcellular distribution of TpOH and NK1r immunolabeling in singly and doubly labeled material from rat ventromedial DRN.....	68
FIGURE 6 : Electron micrographs illustrating the cellular and subcellular distribution of TpOH and NK1r immunolabeling in singly and doubly labeled material from mouse ventromedial DRN.....	69
FIGURE 7 : Frequency distribution histograms of the number of unlabeled, TpOH-labeled, NK1r- labeled and doubly labeled (TpOH-NK1r) dendrites in the rostral and caudal parts of rat and mouse DRN.....	70

FIGURE 8 : Comparison of the relative frequency with which NK1r labeling was associated with the plasma membrane in dendrites from rat and mouse DRN also immunoreactive or not for TpOH.....	70
---	----

Deuxième article :

FIGURE 1 : SP innervation in rat caudal mesencephalon and DRN.....	102
--	-----

FIGURE 2 : Relationship between SP terminals and 5-HT neurons in the caudal DRN, as visualized after dual immunolabeling of SP and TPH for confocal and electron microscopy.....	103
--	-----

FIGURE 3 : Relationship between SP immunoreactive terminals and NK1r dendrites of the caudal DRN, with special reference to GABA.....	104
---	-----

FIGURE 4 : Effect of different schedules of antagonist RP67580 treatment on the subcellular distribution of immunogold-labeled NK1r in 5-HT versus non 5-HT dendrites in the caudal DRN.....	105
--	-----

TABLE 1: Proportion (%) of NK1r immunolabeling on the plasma membrane of 5-HT and non 5-HT dendrites in caudal DRN after RP67580 treatment or bilateral habenular lesion.....	106
---	-----

FIGURE 5 : Effect of RP67580 treatments on NK1r gene expression in the caudal midbrain, as measured by <i>in situ</i> hybridization.....	107
--	-----

FIGURE 6 : Effect of SP deafferentation on NK1r localization in 5-HT neurons of the caudal DRN.....	108
---	-----

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

5-HIAA : acide 5-hydroxy-indol-acétique
 5-HT : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)
 a.a : acide aminé
 ACh : acétylcholine
 ACTH : adrénocorticotropine
 ARNm : acide ribonucléique messenger
 Ca^{2+} : calcium
 CCK : cholécystokinine
 ChAT : choline acétyl-transférase
 CRE : cAMP response element
 CRH : hormone corticotrope
 DA : dopamine
 DCAA : décarboxylase des acides aminés L-aromatiques
 GVCD : grande vésicule à coeur dense
 IP₃ : inositol 1,4,5-triphosphate
 kDa : kiloDalton
 KO : knock-out
 MAO_A : monoamine oxydase de type A
 NA : noradrénaline
 NKA : neurokinine A
 NKB : neurokinine B
 NO : monoxyde d'azote
 NPκ : neuropeptide κ
 NPγ : neuropeptide γ
 NPY : neuropeptide Y
 NRD : noyau raphe dorsalis
 PAG : matière grise périaqueducule
 pG : protéine G
 PPT-A : préprotachykinine-A
 RER : réticulum endoplasmique rugueux
 POMC : pro-opiomélanocortine
 RCPG : récepteur couplé aux protéines G
 rNK1 : récepteur neurokinine-1
 SERT : transporteur membranaire de la sérotonine
 SN : substance noire
 SNC : système nerveux central
 SNP : système nerveux périphérique
 SNr : substance noire réticulée
 SP : substance P
 SS : somatostatine
 TH : tyrosine hydroxylase
 TPH : tryptophane hydroxylase
 TpOH : tryptophane hydroxylase
 TRH : hormone thyroïdienne
 Trp : tryptophane
 VIP : peptide intestinal vaso-actif
 VMAT₂ : transport vésiculaire des monoamines de type 2

AVANT-PROPOS

Cet ouvrage, qui décrit le rôle de petites pièces moléculaires dans l'engrenage complexe du contrôle des émotions, est à lire avec un réel parti pris pour les neurosciences fondamentales. L'approche neurobiologique de processus hautement intégrés est à la fois passionnante, ambitieuse, complexe, et risquée. Elle est passionnante, car nous ne sommes qu'à l'orée d'un Savoir en constant développement. Elle est ambitieuse, car le terme 'Savoir' est en soi une utopie face à la richesse du système nerveux. Sa complexité tient à son approche inductive, impliquant la manipulation d'un large éventail sans cesse croissant de concepts. Elle est enfin risquée, car sujette à la controverse et souvent récupérée par de multiples écoles de pensée religieuse, psychanalytique, psychologique, psychiatrique.

Sans autre prétention que d'apporter une petite pierre à l'édifice des neurosciences, les travaux présentés dans cette thèse décrivent la découverte d'un mécanisme moléculaire qui pourrait expliquer une modulation fine de la neurotransmission sérotoninergique par le neuropeptide substance P, tout ceci à l'intérieur d'une minuscule région du cerveau (le noyau *raphe dorsalis*) impliquée dans le contrôle de l'humeur et incriminée dans les troubles dépressifs.

Avec l'Introduction générale qui suit, nous allons naviguer à travers les époques clés de la biologie des neuropeptides et du contrôle de l'humeur, en tentant d'extraire « la substantifique moelle » des principales publications parues dans ce domaine depuis le début du vingtième siècle. C'est dans ce contexte que nous pourrons ensuite aborder la Discussion des résultats décrits dans les deux manuscrits qui constituent le cœur de cette thèse.

*« Qu'une chose soit difficile doit nous être une raison de plus pour
l'entreprendre. »*

R.M. RILKE (1904)

PREMIER CHAPITRE : INTRODUCTION GÉNÉRALE

I - La substance P et son récepteur préféré : NK1

I-1 : Les neuropeptides dans le système nerveux central

a- Historique

Alors que la communication interneuronale dépendant de petites molécules non peptidergiques comme l'acétylcholine (ACh), la dopamine (DA), la noradrénaline (NA), ou la sérotonine (5-HT), est un phénomène bien connu en neurobiologie, le rôle des peptides (neuropeptides) dans ce processus fondamental du fonctionnement nerveux reste à explorer.

Les neuropeptides ont d'abord été isolés à partir d'organes variés, comme l'intestin ou l'hypothalamus, puis peu à peu impliqués dans les fonctions neurobiologiques. Depuis les années 1970, un flot constant de nouveaux peptides est découvert. Même si la substance P (SP) a été découverte dès 1931 (Euler & Gaddum, 1931), et l'existence de cellules neuronales 'glandulaires' soupçonnée dès les années 1950 (Scharrer & Scharrer, 1954), c'est surtout depuis une quarantaine d'années que la recherche se concentre de manière plus intense sur les propriétés fonctionnelles des neuropeptides dans le système nerveux central (SNC).

En 1965, Knowles et Vollrath ont montré que les fibres des cellules neuro-sécrétrices n'étaient pas toujours associées à un système vasculaire, mais pouvaient aussi former des contacts synaptiques avec d'autres cellules. Puis en 1967, les termes de 'neurone peptidergique' et 'synapse peptidergique' ont été proposés (Bargmann *et al.*). Mais l'entrée dans l'aire de la neuroendocrinologie moderne est imputable aux travaux de Guillemin, Vale, Schally, Arimura, entre la fin de années 1960 et le début des années 1970, période au cours de laquelle la nature peptidergique des facteurs hypothalamiques fut déterminée (revu dans Zupanc, 1996; Hökfelt *et al.*, 2000; Hökfelt *et al.*, 2003). Ces peptides ont été identifiés par extraction chimique, à partir de quantités astronomiques de tissu hypothalamique (50 tonnes d'extraits pour 1 mg de peptide dans le cas de l'hormone thyroïdienne - TRH). Petit à petit, plusieurs d'entre eux ont été localisés dans d'autres régions cérébrales que l'hypothalamus, lieu attendu de leur stockage et libération. Ainsi, on sait aujourd'hui que la TRH et l'hormone corticotrope (CRH) sont largement distribuées dans le cerveau, avec des rôles allant au-delà du contrôle hypophysaire.

Peu après la description initiale des ‘neurohormones’ hypothalamiques, de nombreux peptides identifiés dans le SNC ont été associés à diverses fonctions. Ces découvertes ont été stimulées par le raffinement des techniques de radioimmunoessai, d’immunohistochimie, d’hybridation *in situ* (HIS), et de biologie moléculaire, permettant un calcul plus fin des quantités de neuropeptides, une détermination plus précise de leur lieu d’origine, ainsi qu’une étude plus fiable de leur distribution. Parmi tant d’autres, la cholécystokinine (CCK), la neurotensine, l’enképhaline, la somatostatine (SS), et la SP ont grandement bénéficié de ces progrès. À partir de 1977, tel que proposé par Palkovits puis démontré par Hökfelt, la preuve est faite qu’un neuropeptide (ex : la SS) peut co-localiser avec un neurotransmetteur à petite molécule (ex : la NA) dans un même neurone. Depuis lors, la coexistence des peptides et des neurotransmetteurs classiques a été démontrée dans de nombreux systèmes (revu dans Hökfelt *et al.*, 1987; Zupanc, 1996; Hökfelt, 2009). Vers la fin des années 1970, ces observations ont posé la question du rôle respectif et de l’interaction possible entre un neurotransmetteur classique et un neuropeptide dans un même neurone, contribuant à la définition d’un mode de communication neuronale qualifié de *neuromodulation*, en complément du concept traditionnel de neurotransmission.

C’est à partir de cette époque que la recherche sur les récepteurs et la structure des neuropeptides dans le SNC a pris son envol, avec les études d’autoradiographie, de liaison (voir notamment Quirion *et al.*, 1983 & 1991), ainsi que les nouveaux outils pharmacologiques. On peut citer en exemple les travaux de Young concernant les récepteurs des peptides opiacés, de Uhl pour la SS, ou encore de Tanaka pour la neurotensine.

b- Physiologie

i- Nature chimique

Abordons ici les grandes caractéristiques des neuropeptides. Pour les détails et références, on pourra consulter les revues très complètes de Zupanc (1996) et Hökfelt *et al.* (2000, 2003).

Les neuropeptides sont présents dans tout le règne animal. On les retrouve même dans l’hydre, membre de la famille des Cnidaires doté d’un système nerveux élémentaire. Il s’agit d’une catégorie très diverse de peptides sécrétés par des neurones et faisant fonction de neurotransmetteurs. Ils sont constitués d’enchaînements de 3 à 100 résidus d’acides

aminés (a.a.) et sont jusqu'à 50 fois plus grands que les neurotransmetteurs classiques. Les concentrations de neuropeptides dans le cerveau sont cependant beaucoup plus faibles que celles des autres neurotransmetteurs. Les neuropeptides contiennent davantage d'information chimique et de sites de reconnaissance pour leurs récepteurs que les neurotransmetteurs à petite molécule. Ils sont en outre plus petits que les protéines courantes et possèdent une structure tridimensionnelle moins complexe.

En fonction de leur origine et de leur composition, les neuropeptides sont classés en familles. On trouve par exemple les hormones hypothalamiques (ex : la vasopressine), les peptides opiacés (ex : les endorphines), la famille du neuropeptide Y (NPY), ou encore les tachykinines (ex : la SP). Ces familles peptidiques trouvent leur origine dans des gènes ancestraux qui ont donné, à travers des processus variés de duplications et de mutations ponctuelles, l'ensemble aujourd'hui connu.

La différence d'affinité de liaison entre neuropeptides et neurotransmetteurs vis-à-vis de leurs récepteurs est énorme (respectivement nmol/L versus $\mu\text{mol/L}$), avec une plus grande sélectivité et moins de copies libérées dans le cas des neuropeptides. De plus, les grands neuropeptides diffusent plus lentement mais se lient plus solidement à leur(s) récepteur(s) que les petits neurotransmetteurs, ce qui favorise une intervention pharmacologique plus spécifique et donc moins encline aux effets secondaires (voir Kramer *et al.*, 2004 pour les antagonistes de la SP; Tebbe *et al.*, 2005 pour ceux du NPY).

Presque tous les neuropeptides sont co-localisés avec un ou deux transmetteurs classiques, une combinaison à l'origine de deux vitesses de communication neuronale : rapide (2-5 ms) et lente (100-500 ms). Cette dernière pourrait sous-tendre les effets neuromodulateurs du peptide.

ii- Métabolisme

La biosynthèse des neuropeptides est un processus complexe, distinct des neurotransmetteurs classiques, mais dont les étapes initiales sont communes à presque toutes les protéines sécrétées (revu dans Zupanc, 1996). Les neuropeptides bioactifs sont générés à partir d'un grand précurseur moléculaire inactif produit au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER), donc dans le corps cellulaire du neurone et moindrement dans les dendrites. Les précurseurs peuvent contenir plusieurs copies du même neuropeptide, mais aussi plusieurs peptides différents. Par exemple, le précurseur de la TRH contient cinq copies du tripeptide TRH, alors que la pro-opiomélanocortine (POMC)

donne naissance à la fois à l'adrénocorticotropine (ACTH) et aux β -endorphines. Après clivage d'une séquence signal, le propeptide est transporté vers le réseau *cis*-golgien, puis dans le *trans*-golgien où il est empaqueté dans des vésicules. Les peptides en cours de maturation sont stockés dans de grandes vésicules à cœur dense (GVCD) ou dans des granules de sécrétion, avec d'autres enzymes de maturation (convertases) lesquelles coupent les précurseurs pour en extraire les peptides bioactifs (revu dans Stewart & Hall, 1993). D'importantes modifications post-traductionnelles peuvent se produire ensuite pour obtenir le peptide final, comme la glycosylation, l'acétylation, la phosphorylation, ou encore la sulfatation. Après utilisation, les neuropeptides sont détruits par des peptidases extracellulaires ou membranaires, puis leur remplacement est assuré par leur synthèse/transport.

Les neuropeptides empruntent surtout la voie de la sécrétion régulée, contrairement aux protéines communes qui empruntent la voie de la sécrétion constitutive. Les peptides matures sont transportés dans les GVCD où ils sont très concentrés, et peuvent aussi y être stockés pendant de longues périodes, donnant une réserve disponible de produits sécrétoires matures. Les GVCD sont ensuite acheminées dans les dendrites et l'axone le long du réseau de cytosquelette, retrouvées dans les terminaisons axonales, et leur contenu libéré sur commande dans le milieu extracellulaire (revu dans Zupanc, 1996).

La libération des neuropeptides se fait par exocytose et peut avoir lieu non seulement depuis les terminaisons nerveuses mais aussi depuis les dendrites et le soma. Dans les terminaisons nerveuses, on retrouve majoritairement des petites vésicules claires (neurotransmetteurs classiques), mais aussi des GVCD distribuées spécifiquement à distance des spécialisations membranaires synaptiques (complexes de jonction). Cette différence de distribution spatiale des vésicules dans les terminaisons est à la base du mode de libération des neuropeptides. La relâche des GVCD demande en effet une stimulation plus intense que pour les petites vésicules (une fréquence de décharge plus grande et/ou une durée de stimulation plus longue) (ex : Adelson *et al.*, 2009). C'est ce que l'on appelle la *libération différentielle*, qui implique un mécanisme de relâche différent pour les GVCD, dans lequel le calcium (Ca^{2+}) joue un rôle primordial. Un type particulier de canaux calciques voltage dépendants intervient dans la libération des peptides : une stimulation intense favorise l'activation de ces canaux calciques de type L, dont la conductance est élevée et dont l'inactivation est lente (revu dans Zupanc, 1996). La neurotransmission peptidergique serait ainsi engagée dans des conditions particulières, comme s'il s'agissait

d'un système de réserve, alors que les preuves neurochimiques d'une libération continue (tonique) de neuropeptides restent plutôt rares (ex : Henry *et al.*, 1999).

Plusieurs arguments militent aussi en faveur d'une libération 'non-synaptique' des neuropeptides, tel qu'initialement proposé dans le cas des amines biogènes (Descarries *et al.*, 1975, 1977; Beaudet & Descarries, 1976, 1978). Bien qu'il reste beaucoup à apprendre de la topographie, de la cinétique et des mécanismes de la relâche des GVCD, on sait que ces dernières peuvent libérer leur contenu à distance des complexes de jonction. Cette libération non-synaptique a été suggérée par quatre observations principales : 1) les peptides ne sont pas uniquement localisés dans l'axone, mais aussi dans le corps cellulaire et les dendrites (Pelletier *et al.*, 1981); 2) les terminaisons axonales de neurones peptidergiques ne forment pas toujours des contacts synaptiques (Guy *et al.*, 1982); 3) malgré leur présence dans le corps cellulaire, les peptides sont parfois absents de l'axone ou des terminaisons axonales (Stroh & Zupanc, 1995); et 4) il existe de flagrantes discordances entre les sites de projections des neurones peptidergiques et la localisation des récepteurs correspondants (Herkenham, 1987).

Une fois libérés, les neuropeptides peuvent soit agir sur des récepteurs situés sur une interface membranaire post-synaptique, soit diffuser à distance dans le cas d'une libération non synaptique. D'une manière générale, la fixation d'un peptide sur son récepteur produit une cascade transductionnelle impliquant les seconds messagers intracellulaires du neurone cible et conduisant ainsi à la réponse cellulaire souhaitée.

iii- Récepteurs des neuropeptides

Le premier récepteur cloné a été celui de la substance K, en 1987, par Massu et collaborateurs. Il existe communément plusieurs sous-types de récepteurs pour un neuropeptide donné, mais sauf rares exceptions, il s'agit toujours d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG). La structure générale de ces récepteurs comprend sept segments transmembranaires hydrophobes, avec une queue N-terminale extracellulaire et une queue C-terminale intracellulaire. On y trouve trois boucles cytoplasmiques, dont la troisième est impliquée dans la liaison aux protéines G (pG), et trois boucles extracellulaires impliquées dans la fixation du ligand (Fong *et al.*, 1992; revu dans Ferguson, 2001). Il y a environ 550 gènes de RCPG dans le génome humain et les neuropeptides sont des ligands pour 20% d'entre eux. Ces récepteurs, retrouvés partout sur les neurones et largement distribués à travers le SNC, voient leur fonction régulée par un grand nombre de partenaires

moléculaires (ex : Martini *et al.*, 2002; Cottrell *et al.*, 2006; Kubale *et al.*, 2007; Piñeyro, 2009).

Contrairement aux neurotransmetteurs classiques, les neuropeptides n'ont pas de système de recapture après libération, même si l'existence d'un système de recapture a été suggérée pour certains fragments de la SP (voir Nakata *et al.*, 1981). Dans ces conditions, deux mécanismes fondamentaux assurent l'extinction du signal : la dégradation du peptide et la désensibilisation de son récepteur. La désensibilisation se définit comme la diminution de l'amplitude des réponses post-synaptiques qui se manifestent si le transmetteur est présent en permanence. Au cours de cette désensibilisation, un découplage fonctionnel (recrutement de protéines bloquant l'interaction pG/récepteur) va être suivi d'une internalisation du complexe ligand/récepteur dans un endosome (endocytose de vésicules recouvertes de clathrine; voir Figure 1a). En bref, la fixation du ligand endogène engendre la phosphorylation d'une portion cytoplasmique du récepteur par une kinase (GRK), processus qui augmente l'affinité du récepteur pour la β -arrestine qui elle-même permet le recrutement des effecteurs de l'endocytose (adaptine & clathrine; voir Figure 1a). Suite à l'internalisation, il y a soit dégradation, soit recyclage du récepteur à la membrane (revu dans Ferguson, 2001; voir aussi Cottrell *et al.*, 2006).

Un RCPG, lorsque situé sur l'extrémité présynaptique (autorécepteur), peut aussi servir de frein à la synthèse/libération du neuropeptide (ex : le NPY, voir King *et al.*, 1999).

c- Fonctions des neuropeptides

Malgré les nombreuses études démontrant des actions intéressantes de neuropeptides administrés de manière exogène, et malgré tous les efforts visant à identifier leurs fonctions (notamment avec l'utilisation d'antagonistes), il est difficile de déterminer un rôle précis pour chacun d'entre eux dans le SNC, sauf dans le cas des hormones hypophysaires et des facteurs hypothalamiques. Nous brosserons ici un portrait très général de quelques exemples (revus dans Stewart & Hall, 1993; Hökfelt *et al.*, 2000, 2003); celui de la SP sera développé davantage dans la section I-2.

Plusieurs neuropeptides sont traditionnellement associés à la transmission de la douleur. Il y a plus de 50 ans, Fred Lembeck suggérait la SP comme neurotransmetteur de la douleur. Mais on sait depuis que la SP et ses récepteurs ne suffisent pas à rendre compte de cette régulation complexe. Les cibles thérapeutiques les plus connues dans ce domaine

sont les récepteurs de la morphine et les peptides opiacés (voir Gouarderes *et al.*, 1993). Les enképhalines et les dynorphines sont d'ailleurs localisées dans la corne dorsale de la moelle épinière où elles influencent l'arrivée des influx douloureux. Ces peptides sont aussi retrouvés dans des régions liées au traitement central de l'information nociceptive, comme la matière grise périaqueducale (PAG).

Par ailleurs, les neuropeptides sont souvent définis comme *neuromodulateurs*, avec des effets inhibiteurs ou excitateurs, modifiant l'excitabilité neuronale et régulant la libération et le renouvellement d'autres substances neuroactives. Par exemple, la SS va augmenter la libération d'ACh dans des préparations synaptosomales d'hippocampe, alors qu'elle inhibe la libération d'ACh induite par le potassium dans le noyau caudé.

On reconnaît aussi un rôle trophique à certains neuropeptides, surtout durant la période embryonnaire. C'est le cas de la SS et du peptide intestinal vaso-actif (VIP). La SS est en effet exprimée dans certains systèmes uniquement durant la période embryonnaire. Le VIP, lui, s'est prouvé efficace sur des fœtus *in vitro*. La SP et son récepteur rNK1 joueraient un rôle important durant l'embryogenèse dans la moelle épinière. On a aussi décrit un rôle pour les neurégulines dans la maturation du cerveau postnatal (ex : Mechawar *et al.*, 2007; voir **Annexe**).

D'autres peptides retrouvés dans le SNC suscitent de plus en plus d'intérêt en tant que régulateurs des comportements alimentaires. Ces peptides, incluant la CCK, le NPY et la galanine, vont soit augmenter soit diminuer la prise alimentaire, autrement dit contrôler l'appétit. Plusieurs équipes étudient ces systèmes dans l'espoir de développer des traitements contre l'obésité.

Les neuropeptides semblent aussi impliqués dans la dépendance aux drogues (donc implicitement dans le renforcement positif). Les antagonistes des récepteurs des opiacés ont été utilisés et leur efficacité récemment démontrée contre l'alcoolisme par exemple. De même, le NPY semble être une bonne cible sachant que les souris mutantes nulles (knock-out, KO) pour le NPY ont une consommation accrue d'éthanol.

On peut encore citer l'implication de l'orexine dans la régulation du sommeil, du *gastrin-releasing peptide* dans la réponse aux stimuli aversifs, de la SP dans le contrôle de l'humeur, ou encore de la mélatonine dans la synchronisation des cycles du sommeil. Les neuropeptides centraux sont aussi impliqués dans la modulation de l'expression de certains gènes (ex : *c-fos* dans le cas du NPY, voir Tsai *et al.*, 2009; rNK1 dans le cas du CGRP, voir Seybold *et al.*, 2003), le flux sanguin local, ou la régulation de fonctions motrices.

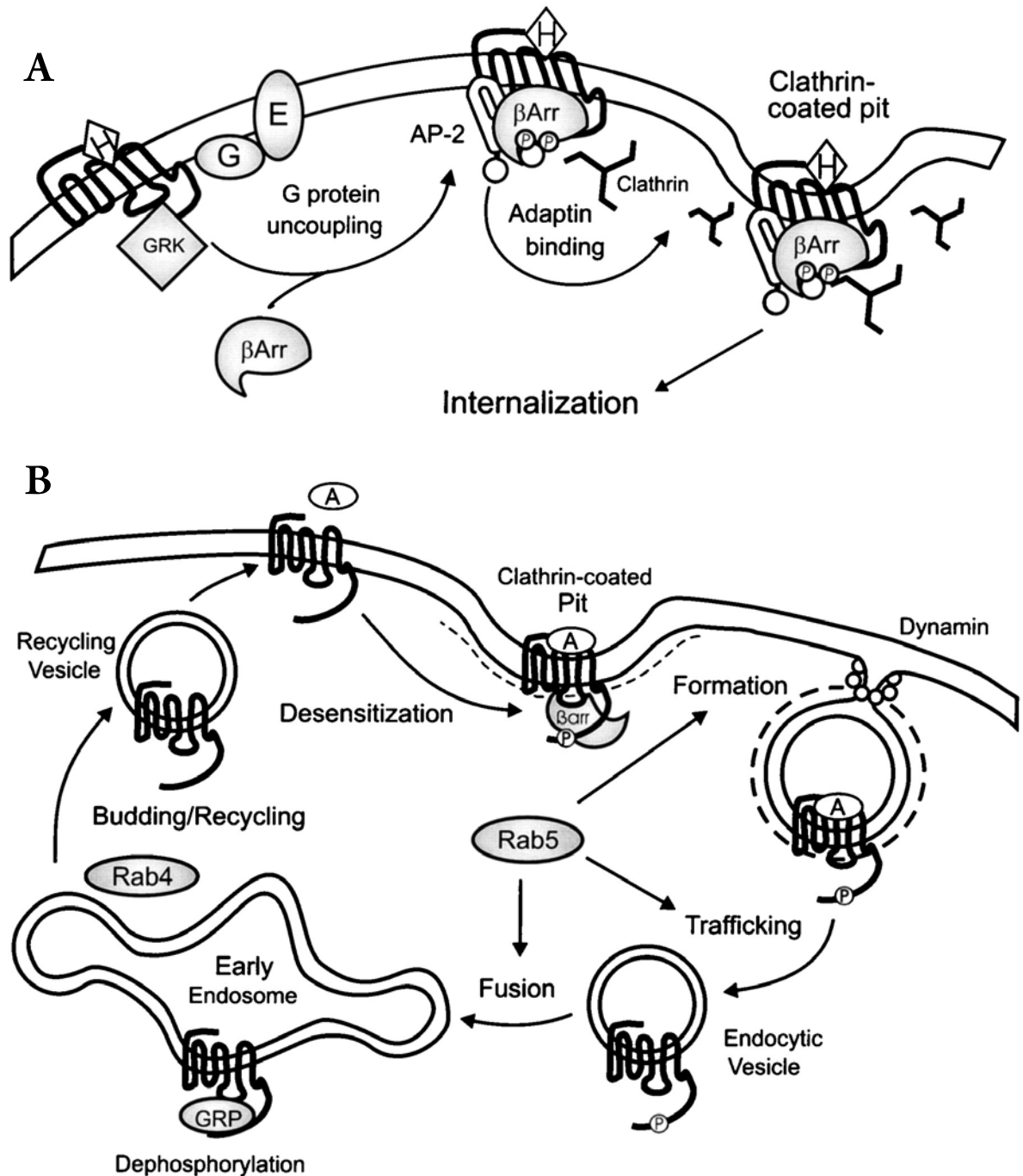


FIGURE 1a : Mécanismes moléculaires impliqués dans le trafic des récepteurs couplés aux protéines G. © Tiré de Ferguson SS (2001) *Pharmacol Rev* 53:1-24.

A: La fixation du ligand conduit à la phosphorylation intracellulaire GRK-dépendante du récepteur, facilitant le recrutement des acteurs de l'internalisation par endocytose (β -arrestine, adaptine, clathrine, dynamine). B: Régulation du trafic des récepteurs couplés aux protéines G; notez l'intervention des petites GTPases Rab4 et Rab5, ainsi que de la phosphatase GRP.

I-2 : La substance P

a- Historique

En 1931, Euler et Gaddum ont découvert à partir d'extraits de cerveau et d'intestin un composé pouvant provoquer une hypotension et une contraction des muscles lisses. Cette substance a ensuite été nommée 'substance P'. Ce terme, utilisé pour la première fois par Chang et Gaddum en 1934, faisait référence à la 'préparation de poudre sèche' utilisée par les auteurs. La nature peptidique de cette substance a été reconnue en 1936, suivie de plusieurs tentatives de purification entre les années 1950 et 1960. Il a cependant fallu attendre quarante ans avant l'identification du peptide bioactif. Ce n'est qu'en 1970 que l'on est parvenu à révéler la structure de la SP (Chang & Leeman, 1970; revu dans Harrison & Gepetti, 2001). La signification actuelle de 'SP' est cependant différente de celle de 1970. À cette époque, en effet, la SP, étant définie par ses activités biologiques, devait contenir non seulement le peptide connu aujourd'hui mais aussi d'autres peptides de la même famille, comme les neurokinines A et B (NKA et NKB).

b- Physiologie

La SP est aujourd'hui bien caractérisée. Voyons ici les grandes lignes de nombreuses revues parues au sujet de sa physiologie (Otsuka & Yoshioka, 1993; Zupanc, 1996; Zubrzycka & Janecka, 2000; Harrison & Gepetti, 2001).

i- Nature chimique

La SP appartient à la grande famille des tachykinines, peptides largement distribués dans le corps des mammifères et partageant la même séquence carboxyl-terminale : Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂. Les autres membres de cette famille sont la NKA, la NKB, le neuropeptide κ (NP κ) et le neuropeptide γ (NP γ).

La SP est un *undécapeptide* (à 11 résidus d'a.a.) dont la séquence est : Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (Chang & Leeman, 1970). Sa conformation dépend du solvant et de l'environnement (lipidique ou non) où elle se trouve. Par exemple, dans le méthanol la structure contient un mélange d'hélices β , alors que dans l'eau on trouve plutôt une structure en chaîne longue. La SP dérive du gène du précurseur préprotachykinine-A (PPT-A). Ce gène code aussi pour NKA, NP κ et NP γ . L'épissage alternatif du transcrit du gène PPT-A produit trois acides ribonucléiques messagers

(ARNm) : α PPT-A, β PPT-A et γ PPT-A. Les trois ARNm codent pour la SP, alors que le précurseur de la NKA n'est présent que dans la séquence des α PPT-A et β PPT-A. Il existe aussi un gène PPT-B provenant du même gène ancestral que PPT-A, mais qui ne code que pour la NKB.

ii- Métabolisme

Une fois son ARNm produit, la SP est synthétisée de manière conventionnelle, comme tous les neuropeptides, à savoir dans les ribosomes du RER (voir section I-1-b). La SP est extraite de son précurseur par des convertases. Elle est ensuite stockée dans des vésicules dont le diamètre moyen a été estimé à 117 nm. Comme la biosynthèse des tachykinines a lieu dans le périkarion, le transport axonal représente la seule source de SP dans les terminaisons nerveuses, où celle-ci subit d'ultimes modifications enzymatiques. Ce transport vésiculaire antérograde se fait à une vitesse moyenne de 5 mm par heure. La SP est relâchée dans l'espace extracellulaire par suite d'une stimulation intense, avec intervention des canaux calciques de type L, soit seule soit en même temps qu'un neurotransmetteur classique.

Plusieurs enzymes sont impliquées dans l'inactivation de la SP, limitant sa capacité à activer ses récepteurs (Marvizon *et al.*, 2003); on trouve: l'endopeptidase neutre (NEP), l'enzyme de dégradation de la SP (SP-DE), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), la proline endopeptidase (PEP), ou encore les cathepsines D et E. On retrouve par exemple la NEP dans le cerveau et la moelle épinière, et l'ACE dans le plasma et le liquide céphalorachidien. Ces deux enzymes servent à cliver les ponts Phe⁸-Gly⁹ et Gly⁹-Leu¹⁰ de telle sorte que la SP perd son extrémité carboxyl nécessaire à la fixation au récepteur.

iii- Récepteurs de la SP

Il existe trois classes de récepteurs pour les tachykinines. Après une période de confusion sur la nomenclature, c'est lors d'un symposium à Montréal en 1984 que la communauté scientifique s'est entendue sur la désignation de trois types de récepteurs : rNK1, rNK2 et rNK3. Des subdivisions ont ensuite été décrites pour chacun. Ils sont très similaires dans leur séquence en a.a. et sont tous des RCPG (voir section I-1-b). Les trois récepteurs peuvent lier les différentes tachykinines, mais dans un ordre d'affinité bien précis. La SP a plus d'affinité pour le rNK1, la NKA pour le rNK2, et la NKB pour le rNK3. Nous développerons le cas du rNK1 dans la section I-3.

c- Localisation anatomique

Entre les années 1970 et 1990, de nombreux auteurs se sont intéressés à la distribution très étendue de la SP dans le SNC et les neurones ganglionnaires. On peut citer, entre autres, Brownstein, Cuello, Ljungdhal, Hökfelt, Neckers, Pickel, ou encore de Ribeiro-da-Silva (revus dans Ribeiro-da-Silva *et al.*, 2000; Ribeiro-da-Silva & Hökfelt, 2000). Voyons de manière synthétique les principales localisations qui ont été décrites.

Les premières descriptions immunocytochimiques de la distribution de la SP dans les systèmes nerveux central et périphérique (SNP) du rat et du chat datent de la fin des années 1970. Dans la moelle épinière, la SP est d'abord localisée à la corne dorsale. Elle est aussi détectée, par exemple, dans la PAG, le noyau interpedonculaire, la substance noire (SN), et l'aire préoptique médiane. Dans le SNP, environ 20% des ganglions rachidiens et des nerfs montrent de l'immunoréactivité SP. Les données se précisent peu à peu jusqu'à la fin des années 1980, alors que les fibres SP sont classées en trois systèmes: les circuits locaux (ex: amygdale); les réseaux à longues fibres (ex: système nigro-striatal); les fibres sensorielles (moelle épinière).

Le cortex cérébral et la formation hippocampique sont décrits comme pauvres en SP. La seule région du cortex où un réseau de fibres bien défini a été décrit est le cortex cingulaire antérieur (région d'ailleurs impliquée dans l'interprétation des sensations douloureuses). Dans tout le néocortex, on trouve plutôt des fibres et varicosités isolées; certains neurones pyramidaux des couches II et IV-VI apparaissent aussi marqués. Dans l'hippocampe, on observe seulement quelques corps cellulaires non pyramidaux dans la corne d'Ammon; par contre, le gyrus dentelé est riche en SP. Dans les régions sous-corticales, on retrouve davantage de SP dans le striatum (fibres et corps cellulaires) et le globus pallidus (fibres denses) notamment. On trouve aussi de la SP dans le pallidum ventral, l'amygdale, le mésencéphale (SN, PAG), le pont (locus coeruleus en particulier) et le cervelet. Dans les noyaux du raphé, on observe un réseau de fibres SP de densité faible à forte.

À l'échelon cellulaire, une caractéristique importante de la SP est qu'elle apparaît co-localisée avec un ou plusieurs neurotransmetteurs (classiques ou neuropeptidiques). La SP coexiste par exemple avec la choline acétyl-transférase (ChAT, enzyme de synthèse de l'ACh), l'acide γ -aminobutyrique (GABA), la tyrosine hydroxylase (TH, enzyme de synthèse de la dopamine), la 5-HT, la SS, la CCK, le NPY, la galanine, la dynorphine, ou

encore les enképhalines. Les implications fonctionnelles de cette coexistence ne sont pas encore bien définies. Si un neurone stocke et libère un transmetteur à action rapide et un peptide à action lente, il en résulte une réponse rapide puis une lente (excitatrices ou inhibitrices) du neurone-cible. D'une manière générale, l'interaction des neuropeptides avec d'autres substances neuroactives peut être synergique ou antagoniste, et peut avoir lieu soit en pré- soit en post-synaptique, ou encore agir en altérant l'activité des enzymes de dégradation.

À l'échelon ultrastructural, les premières études utilisant l'immunopéroxydase dans les années 1970 ont décrit le marquage SP comme associé à de grandes vésicules granulaires, résultat confirmé plus tard par l'utilisation de particules d'or (immunogold). Mais, contrairement aux autres neuropeptides, la SP n'apparaît pas uniquement confinée aux GVCD, et son mode de libération n'est donc pas exclusivement non-synaptique. Lors du fractionnement subcellulaire, la SP apparaît concentrée dans la fraction des petites vésicules synaptiques agranulaires.

d- Fonctions de la substance P

Dès le milieu des années 1970, la substance P est associée à la transmission et à l'intégration de l'information nociceptive (de la douleur) depuis la périphérie vers le SNC (ex: Henry, 1976; revu dans Zubrzycka & Janecka, 2000). Le premier argument structural en faveur de cette hypothèse fut la découverte de la présence de SP dans la *substantia gelatinosa* de la corne dorsale de la moelle épinière, ainsi que dans les terminaisons nerveuses des fibres sensibles de type C (nocicepteurs). On sait par exemple que l'injection intrathécale de SP chez la souris entraîne un comportement typique de réaction à une forte douleur, et qu'un antagoniste tachykininergique ou un anticorps anti-SP bloque cette réponse. Dans la PAG, la SP pourrait aussi participer au système de suppression de la douleur sachant que la stimulation de ce site produit une analgésie chez l'animal.

Bien d'autres fonctions ont été suggérées depuis. Comme les autres neuropeptides, la SP joue un rôle neuromodulateur dans tout le SNC (voir Otsuka & Yohsioka, 1993). Dans le néocortex, l'application ionophorétique de SP induit une excitation prolongée des neurones pyramidaux dans les couches V et VI. Dans le striatum, la SP entraîne une hausse de l'activité des certains neurones et induit la libération de DA et d'ACh. La micro injection d'un antagoniste de la SP dans le globus pallidus perturbe le contrôle du tonus

musculaire. Dans la substance noire, la SP exerce un contrôle excitateur sur les neurones dopaminergiques nigro-striataux. Dans l'aire tegmentale ventrale, on observe une diminution de la concentration en SP suite à un stress. On a aussi observé que les comportements provoqués par la nicotine étaient associés à une libération de SP dans le noyau accumbens (nAcc). Au niveau de l'amygdale et du noyau du lit de la strie terminale, la SP semble être impliquée dans la détermination des comportements sexuels : des niveaux plus élevés de SP sont retrouvés chez le mâle, et la castration entraîne une baisse de la teneur en SP dans ces régions. La SP est aussi impliquée dans la mémoire, la respiration et la thermorégulation.

Ce qui nous intéresse plus particulièrement ici correspond au rôle de la SP dans la régulation des émotions (stress, anxiété, dépression) et des comportements associés (revu dans Herpfer & Lieb, 2003; Ebner & Singewald, 2006; Ebner *et al.*, 2009). Chez l'homme, pour ne citer qu'un exemple, le blocage des rNK1 par des antagonistes aurait des effets antidépresseurs (Kramer *et al.*, 1998). Nous développerons cet aspect dans la troisième partie.

I-3 : Le récepteur NK1

a- Structure et propriétés

Toutes les tachykinines peuvent se lier au rNK1, même si ce récepteur est le préféré de la SP en raison de sa grande affinité. Il s'agit d'un RCPG typique, à sept segments transmembranaires, composé de 407 a.a. (Figure 2a). L'analyse génétique chez l'homme montre qu'il provient d'un gène situé sur le chromosome 2. Cloné en 1991 par l'équipe de James E. Krause, le rNK1 présente une grande homologie de séquence d'une espèce à l'autre (humain, rat, souris, cobaye). Par exemple, le rNK1 du rat et de l'homme ont une séquence protéique similaire à 92%. Mais il existe des différences inter-espèces quant aux effets des antagonistes, phénomène lié à des variations d'a.a. aux positions 116 et 290 (revu dans Harrison & Geppetti, 2001). On connaît aussi l'existence de deux isoformes du rNK1, distinctes dans leur extrémité carboxyl cytoplasmique. La forme longue (46 kDa) et la forme courte (37 kDa) présenteraient la même affinité pour la SP. Bien que ce résultat soit controversé, la différence de signalisation via l'une ou l'autre isoforme a été attribuée à leur mode de désensibilisation: la forme courte, qui ne subit pas de désensibilisation rapide, servirait à produire une réponse prolongée (Li *et al.*, 1997; Caberlotto *et al.*, 2003).

Sur son récepteur, la SP se fixe sur un domaine extracellulaire défini entre les segments II et VII (Fong *et al.*, 1992). La stimulation du rNK1 entraîne une hausse de la teneur intracellulaire en Ca^{2+} . La transduction du signal est en effet assurée par un couplage aux $\text{pG}_{q/11}$, activant la phospholipase C_β et résultant en l'augmentation transitoire de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3), lequel active à son tour certains canaux associés aux réserves internes de Ca^{2+} . Il existe aussi un couplage avec la pG_{α_s} , qui stimule la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Ces cascades conduisent non seulement à une réponse électrophysiologique de la cellule cible, mais aussi à la transcription de certains gènes via les éléments de réponse CRE/ Ca^{2+} compris dans leur séquence régulatrice (Holst *et al.*, 2001; Harrison & Geppetti, 2001; Seybold *et al.*, 2003).

Comme de nombreux RCPG, le rNK1 est sujet à désensibilisation (Ferguson, 2001). Ce récepteur est aussi extrêmement mobile. Il s'internalise rapidement: 60% des neurones rNK1-positifs du striatum de rat montrent une forte internalisation du rNK1 une minute seulement après l'injection de SP (Mantyh *et al.*, 1995). Smith et collaborateurs (1999) ont aussi observé une forte internalisation des rNK1 chez la gerbille (bloquée par l'antagoniste NK1, L-760,735) une heure après un stress d'immobilisation. De même, dans la moelle épinière, l'internalisation du rNK1 induite par la SP lors d'une stimulation douloureuse est abolie en présence de l'antagoniste L-703,606 (Marvizón *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1999).

Le rNK1 est aussi sujet à recyclage. On peut englober sous le terme de *trafic* ses va-et-vient entre la membrane plasmique et le cytoplasme: désensibilisation-internalisation/recyclage-resensibilisation. Ainsi, un trafic du rNK1 depuis le cytoplasme vers la membrane a été démontré dans les neurones non dopaminergiques de la SN réticulée (SNr) chez des rats soumis à une stimulation auditive intense (Lessard & Pickel, 2005). Le trafic de plusieurs RCPG semble aussi dépendre de leur état de dimérisation (Wirz *et al.*, 2005). On connaît par exemple un état d'hétérodimérisation du rNK1 avec le récepteur μ -opioïd-1 (MOR1) qui retarde la resensibilisation du MOR1 (Pfeiffer *et al.*, 2003). Nous reviendrons sur le trafic du rNK1 lors de la présentation des résultats de cette thèse.

b- Localisation anatomique

i- Localisations dans le SNC

La description la plus détaillée à ce jour de la localisation anatomique du rNK1 a été publiée en 2000, par le célèbre trio Ribeiro-Da-Silva / McLeod / Krause. Cet article de

revue rapporte les résultats des études antérieures de radioliation, d'HIS et d'immunocytochimie. Voyons quels en sont les faits saillants.

À partir de 1985, les études autoradiographiques révèlent des sites de liaison pour la SP dans la corne dorsale de la moelle épinière. De forts marquages sont aussi détectés dans le bulbe olfactif, l'amygdale médiale, le gyrus dentelé, le colliculus supérieur et le locus cœruleus; de plus faibles intensités sont retrouvées dans le nAcc, le striatum, et la PAG. Entre 1990 et 1993, les études d'HIS (qui révèlent la localisation de l'ARNm du récepteur) font apparaître des signaux dans le bulbe olfactif, le cortex cérébral, le striatum, le nAcc, l'amygdale, l'hippocampe, le thalamus, la PAG, les noyaux du raphé et le locus cœruleus, notamment. Puis, à partir de 1993, on dispose de résultats obtenus grâce à des anticorps spécifiques (Maeno *et al.*, 1993; Nakaya *et al.*, 1994; Vigna *et al.*, 1994). Le marquage concerne par exemple des cellules mitrales des bulbes olfactifs, des neurones non-pyramidaux de différentes subdivisions du cortex cérébral et de l'hippocampe, de neurones multipolaires dans les noyaux gris centraux, de neurones de taille moyenne dans les noyaux cholinergiques, et de petits neurones dans la PAG, les colliculi et les noyaux du raphé. Une étude récente effectuée sur des cerveaux humains a d'ailleurs confirmé la présence d'ARNm du rNK1 et de sites de liaison pour la SP dans plusieurs systèmes neuronaux associés à la régulation de l'humeur et au stress, comme l'hippocampe, l'amygdale, le striatum ventral et le locus cœruleus (Caberlotto *et al.*, 2003).

À l'échelon cellulaire, plusieurs populations porteuses du rNK1 ont été définies comme interneuronales. Dans le cortex, on note que les neurones rNK1-immunoréactifs produisent aussi le GABA et la SS. Dans les noyaux du prosencéphale basal, les neurones qui expriment le rNK1 expriment aussi la ChAT. Dans les différentes subdivisions de l'hippocampe, il semble que tous les interneurons inhibiteurs (à GABA et SS, CCK, NPY, VIP) expriment aussi le rNK1 (Maeno *et al.*, 1993; Acsády *et al.*, 1997; Sloviter *et al.*, 2001). Dans les noyaux du raphé (pourtant riches en neurones à 5-HT), le rNK1 apparaît confiné aux interneurons, notamment glutamatergiques et GABAergiques (Commons & Valentino, 2002; Nattie *et al.*, 2004).

À l'échelon ultrastructural, les rNK1 apparaissent somatodendritiques, et normalement distribués de manière homogène le long de la membrane plasmique des neurones (McLeod *et al.*, 1998; Monastyrskaya *et al.*, 2005), sans concentration dans les axones et terminaisons (varicosités) axonales. On trouve aussi du rNK1 dans le cytoplasme,

ce qui est en accord à la fois avec la présence de sites de synthèse dans le corps cellulaire (RER) et l'existence d'une certaine proportion de récepteurs internalisés (endosomes).

ii- Discordances SP/NK1

Même si, dans la plupart des régions du SNC, la SP semble innover spécifiquement les neurones porteurs de rNK1 membranaires (McLeod, 1998, 1999; Li *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2004), plusieurs études révèlent une discordance entre la distribution de l'innervation SP et celle de son récepteur (Shults *et al.*, 1984; Herkenham, 1987; Ribeiro-Da-Silva *et al.*, 2000). Un fait surprenant est l'absence quasi-totale de sites de radioliation, d'ARNm et d'immunoréactivité rNK1 dans la SN, une région anatomique pourtant très riche en SP. De plus, les neurones DA de la SN ne répondent pas à la SP (excluant alors l'hypothèse d'une action de la SP via d'autres types de récepteurs). Cet argument a souvent été considéré comme preuve formelle de l'existence d'une transmission peptidergique par diffusion, bien que cette conclusion reste discutable à la lumière de données plus récentes. En effet, la SP de la SN provient de neurones originaires du striatum qui libèrent aussi le GABA, et seul le GABA semble être actif sur les neurones DA de la SN. La SP agirait dans le striatum, à travers des collatérales innervant préférentiellement des neurones rNK1-positifs (Ribeiro-Da-Silva *et al.*, 2000). Dans les régions dépourvues de rNK1, la SP serait donc un neurotransmetteur accessoire. De plus, des résultats de McLeod (1998, 1999) montrent que, dans la plupart des systèmes neuronaux, la SP agit surtout à courte distance de son site de relâche, sur des sites membranaires neuronaux riches en rNK1. Néanmoins, ceci n'exclut pas l'existence d'une transmission volumique à SP. Une fois libérée, celle-ci pourrait diffuser vers des cibles distantes de ses sites de relâche (voir Duggan, 2000).

d- Outils pharmacologiques

Différents types d'agonistes du rNK1 ont été produits au cours des ans, qui possèdent la capacité d'activer le récepteur à des concentrations nanomolaires, et donc avec la même efficacité que la SP (revu dans Harrison & Geppetti, 2001). Leur histoire date du début des années 1980, avec des analogues comme la [pGlu⁶,MePhe⁸,Sar⁹]-SP(5-11) ayant des propriétés hypotensives chez le rat et le lapin. On a cependant rapidement constaté que ce composé activait surtout les rNK3. Des agonistes plus sélectifs pour le rNK1 ont été développés par la suite, formant deux grands groupes selon leur activité pharmacologique :

les agonistes classiques, hautement sélectifs pour le rNK1 (ex : le SP méthyl ester), et les agonistes 'septide-like', comme le septide lui-même (ex : Cellier *et al.*, 1999) et la [Pro⁹,NmeLeu¹⁰]-SP(7-11). De nos jours, à l'exception de travaux de neurobiologie fondamentale (ex : Simmons, 2006) et sachant que leur efficacité clinique n'est pas prouvée, il n'y a que peu d'études concernant ces agonistes.

Les antagonistes du rNK1, découverts dans les années 1975-1980, suscitent par contre un intérêt croissant. L'un des premiers, la [D-Pro²,D-TRP^{7,9}]-SP, s'est avéré très efficace pour bloquer la contraction musculaire lisse, mais extrêmement neurotoxique. D'autres approches ont conduit au développement de substances encore plus efficaces, sélectives et biodisponibles (voir Harrison & Geppetti, 2001; Genicot *et al.*, 2003), comme les composés non-peptidiques CP96345, CP99994, RP67580, ou encore le MK-0869 (aussi connu sous le nom d'Aprepitant[®]). L'efficacité de ces composés varie cependant selon les espèces. Ainsi, le RP67580 (Garret *et al.*, 1992) est plus actif chez le rat (Beaujouan *et al.*, 1993), alors que le CP96345 et le MK-0869 le sont chez l'humain (Kramer *et al.*, 1998). Ces antagonistes passent aisément la barrière hémato-encéphalique et permettent une grande diversité d'utilisation. Ils offrent ainsi de nouvelles perspectives pour étudier l'implication du rNK1 dans les fonctions et les maladies du SNC.

Le RP67580, dont il sera question dans cette thèse, est un antagoniste non peptidique dérivé du perhydroisoindole, hautement sélectif pour le rNK1 (Fong *et al.*, 1992). Il est stable et pénètre bien la barrière hémato-encéphalique; c'est un puissant inhibiteur de la fixation de SP, avec un Ki de 4.2 nM (Garret *et al.*, 1991; Laird *et al.*, 1993). De plus, il s'agit de l'antagoniste du rNK1 le plus efficace chez le rongeur (Beaujouan *et al.*, 1993; Mantyh *et al.*, 1995; Cellier *et al.*, 1999).

c- Fonctions du récepteur NK1

Même si le rNK1 est un hétérorécepteur (absent des neurones SP eux-mêmes), ses fonctions dans le SNC vont évidemment correspondre à celles du neurotransmetteur qui l'active, la SP (voir partie I-2-c). Voyons quelques exemples (revus dans Saria, 1999).

Le rNK1 joue un rôle important dans la transmission nociceptive (récemment : Powell *et al.*, 2003). En effet, l'expression de ce récepteur est localisée aux différentes régions dédiées au traitement de la douleur (moelle épinière, neurones sensoriels). Les antagonistes du rNK1 sont d'ailleurs efficaces contre la douleur chronique.

Lors de manipulations expérimentales comme l'administration de SP ou d'agonistes, la présence de rNK1 dans de nombreuses régions du cerveau rend compte d'une grande variété d'effets physiologiques, comportementaux et cognitifs. Probablement en lien avec la libération d'autres médiateurs comme la DA, l'ACh et la 5-HT, mentionnons des effets sur la locomotion, l'accouplement, l'humeur (stress, anxiété, dépression). Dans les ganglions de la base, des efforts ont été faits pour comprendre l'implication du rNK1 dans la maladie de Parkinson ou dans la chorée de Huntington. La lésion des neurones nigro-striataux à GABA/SP entraîne une hausse de l'expression du rNK1 dans la SN, et le traitement chronique avec un antipsychotique à effets extrapyramidaux entraîne une régulation à la hausse de la SP et du rNK1.

On peut voir les choses 'inversement' et tirer des conclusions à partir de traitements avec les antagonistes. De nombreuses études récentes démontrent un effet anxiogène de la SP et anxiolytique des antagonistes de son récepteur. Par exemple, l'équipe de Kramer a montré en 1998 que l'antagoniste MK-0869 pouvait réduire les vocalisations des petits du cobaye lors de la séparation maternelle, et présenter aussi des propriétés antidépressives chez l'humain. D'autres composés modifient les rythmes circadiens locomoteurs chez le hamster, diminuent le volume d'un infarctus cérébrovasculaire chez le rat, ou encore réduisent la toux et les vomissements chez l'humain (revu dans Saria, 1999).

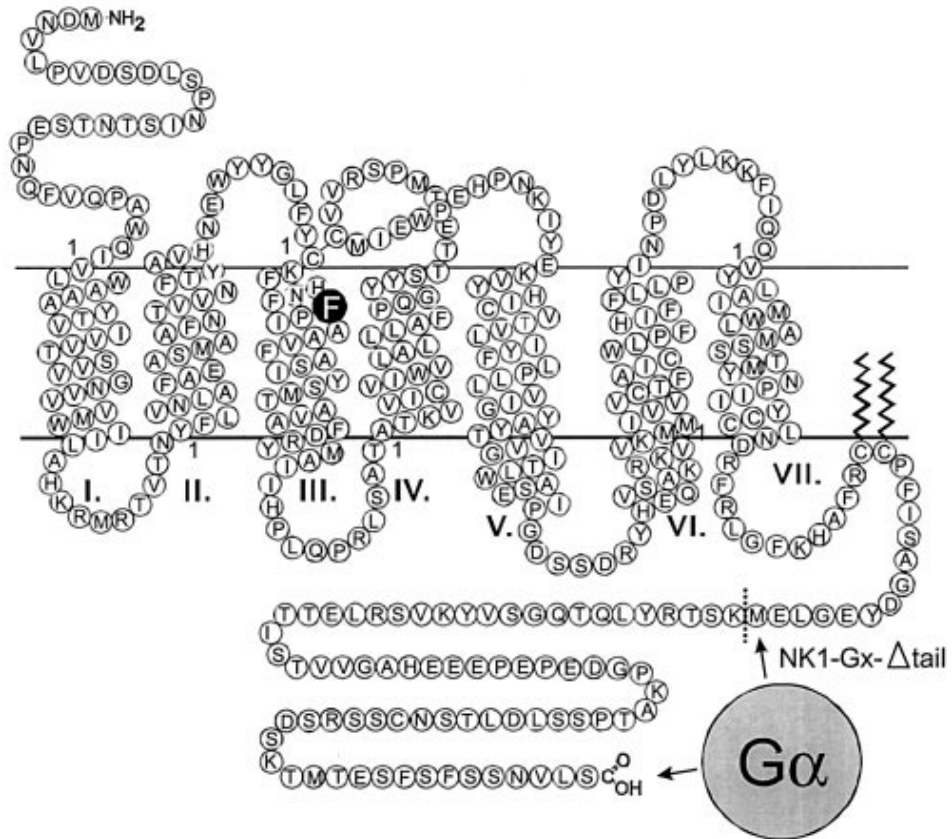


FIGURE 2a : Modèle de la structure secondaire du récepteur NK1.

© Tiré de Holst et al. (2001) *J Biol Chem* 23:19793-19799.

Le rNK1 est composé de 7 segments transmembranaires hydrophobes, notés de I à VII, avec une queue NH₂-terminale extracellulaire et une queue COOH-terminale intracellulaire. La forme longue du récepteur représentée ici comporte une séquence de 407 acides aminés. Les protéines G peuvent s'ancrer à la queue cytoplasmique via des liens covalents. Le cercle noir indique le lieu d'une substitution unique (Phe111Ser) capable de découpler le récepteur de la pGα_s. La forme courte (311 a.a.) diffère dans la longueur de l'extrémité COOH-terminale.

II - La sérotonine et le noyau du raphé dorsal

II-1 : Sérotonine et système sérotoninergique

a- Historique

La présence d'un facteur vasotonique dans le sang a été pressentie dès le début du 20^{ème} siècle, et c'est en 1935 qu'Erspamer montre l'existence d'une substance capable de contracter les muscles lisses (voir Lisi, 2006); le fait qu'il l'ait trouvée dans les cellules chromaffines de l'intestin l'amène à appeler cette substance "entéramine". En 1948, le groupe de Rapport isole un tel facteur à partir du sérum du sang et l'appelle alors "sérotonine". L'année suivante, Rapport détermine la structure de cette amine comme étant la 5-hydroxytryptamine (5-HT). En 1953, Twarog et Page démontrent que la 5-HT est aussi un neurotransmetteur du cerveau des mammifères, et Woolley présente dix ans plus tard l'hypothèse de son implication dans les maladies mentales. Cette hypothèse sera précisée notamment par Coppen en 1969, qui propose un rôle majeur pour la 5-HT dans la dépression (revu dans Nichols & Nichols, 2008). Entre la fin des années 1960 et le début des années 1990, le système sérotoninergique (noyaux d'origine et projections) fera l'objet de nombreuses descriptions, d'abord par Dahlström & Fuxe (1964) et Fuxe (1965), Ungerstedt (1971), Parent *et al.* (1981), puis Steinbusch (1984) et autres. Les années suivantes ont vu une multiplication impressionnante des travaux expérimentaux et des observations cliniques démontrant le rôle crucial de la 5-HT dans les fonctions du SNC.

b- Physiologie

i- Nature chimique

La 5-HT, neurotransmetteur à petite molécule, est une monoamine, ou plus précisément une *indolalkylamine*. Elle est synthétisée à partir du L-tryptophane (TP), un a.a importé dans le cerveau sous forme libre par la circulation sanguine via un transport actif. Chez les mammifères, on retrouve 90% de la 5-HT dans l'intestin, 8% dans les plaquettes, et 2% dans les cellules nerveuses.

ii- Métabolisme

Les neurones à 5-HT transforment le TP en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) via l'enzyme tryptophane hydroxylase (TpOH, ou TPH), à l'aide de co-facteurs comme l'oxygène et le fer. Le 5-HTP est ensuite converti en 5-HT par la décarboxylase des acides aminés L-aromatiques (DCAA). La biodisponibilité cérébrale de TP influence fortement la synthèse de 5-HT (Feldman & Lee, 1985; Schröder *et al.*, 1999). L'apport minimum nécessaire serait de l'ordre de 200 mg de TP par jour, dont une faible partie transformée en 5-HT.

La 5-HT provient donc d'une synthèse enzymatique. Ce sont les enzymes de sa synthèse qui sont produites dans le RER, puis acheminées vers les lieux de synthèse (somatodendrites et varicosités ou terminaisons axonales). Dans les terminaisons, la 5-HT synthétisée à partir de son précurseur est chargée dans les vésicules dites synaptiques via un transporteur vésiculaire (VMAT₂), et peut ainsi être libérée dans l'espace extracellulaire par exocytose. Une libération somato-dendritique de 5-HT a également été démontrée (Héry *et al.*, 1982), mais la recherche d'amas vésiculaires à proximité de la membrane plasmique des neurones 5-HT s'est avérée décevante (voir Descarries *et al.*, 2009). Une grande partie de la 5-HT libérée peut être recaptée par les neurones dont elle est issue, en raison de l'existence, tout au long de leur membrane, d'un transporteur spécifique, le 5-HTT (ou SERT). La 5-HT peut être aussi dégradée en molécules inactives dans le cytoplasme : sa désamination oxydative par la monoamine oxydase de type A (MAO_A) conduit au 5-hydroxy-indol-acétaldéhyde qui est ensuite oxydé en acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA). Dans la glande pinéale, la 5-HT peut aussi être transformée en mélatonine (MLT), ce qui ne doit pas être considéré comme une dégradation puisque la MLT est biologiquement active.

Comme les neuropeptides (voir partie I-1-b), la 5-HT libérée peut agir selon deux modes de transmission complémentaires : synaptique, au niveau des zones actives, et volumique, par diffusion dans l'espace extracellulaire (Descarries *et al.*, 1975; Beaudet & Descarries, 1976, 1978; voir Descarries *et al.*, 2009 pour revue).

iii- Récepteurs de la 5-HT

Différents types de récepteurs sérotoninergiques ont été pharmacologiquement identifiés à partir de la fin des années 1970, puis caractérisés et clonés avec l'avènement de

la biologie moléculaire (Leysen *et al.*, 1978; Peroutka & Snyder, 1979; Gozlan *et al.*, 1983; Gerhardt *et al.*, 1997; Riad *et al.*, 2000).

De nos jours, ces récepteurs sont classés en 7 familles principales, de 5-HT₁ à 5-HT₇ (voir Nichols & Nichols, 2008), dont 14 membres se retrouvent dans le SNC des mammifères. Six de ces familles (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇) regroupent des RCPG, qui modulent l'activité cellulaire via la production de seconds messagers, tandis que le 5-HT₃ est un récepteur canal qui dépolarise la cellule en laissant passer les cations. Selon leur couplage, on peut distinguer cinq types de récepteurs : **5-HT₁** (1A, 1B, 1D, pré- et post-synaptiques, inhibiteurs, couplés négativement à l'adénylate cyclase); **5-HT₂** (2A, 2B, 2C, couplés positivement à la phospholipase C); **5-HT₃** (excitateur, récepteur de type nicotinique); **5-HT_{4,6,7}** (excitateurs, couplés positivement à l'adénylate cyclase); et **5-HT₅** (5A, 5B, au couplage mal connu).

Dans le cadre du présent travail, il suffira de rappeler certaines données sur les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} (voir Riad *et al.*, 2000; Nichols & Nichols, 2008). Les récepteurs 5-HT_{1A} sont somatodendritiques, et régulent négativement l'activité électrique des neurones 5-HT au sein des noyaux d'origine (autorécepteurs), et celle des neurones cibles dans les territoires d'innervation (hétérorécepteurs) (Blier *et al.*, 1998). Les récepteurs 1B/1D, situés sur les terminaisons axonales, influencent la synthèse et la libération de la 5-HT. Les hétérorécepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} sont répartis de façon différentielle dans le cerveau : les 5-HT_{1A} prédominent dans le système mésolimbique, et les 5-HT_{1B} dans le système extrapyramidal. Les 5-HT_{1A} sont impliqués dans les troubles cognitifs et sont la cible d'antidépresseurs. Les 5-HT_{1B} sont principalement impliqués dans la motricité (revu dans Nichols & Nichols, 2008).

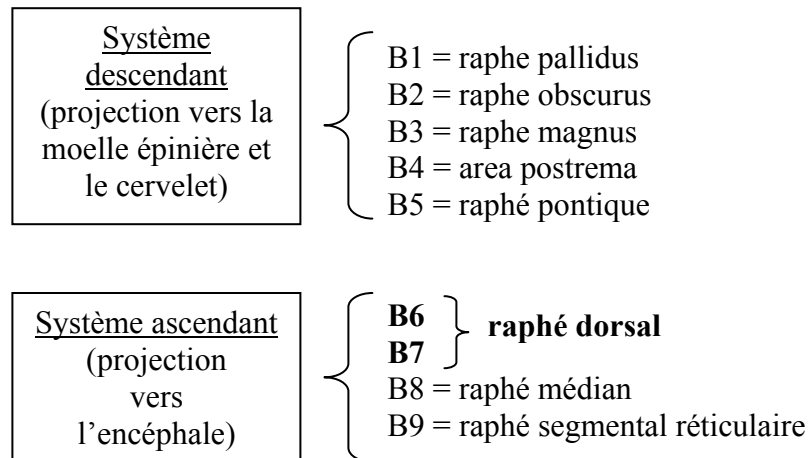
Comme pour les neuropeptides, les réponses cellulaires via les RCPG de la 5-HT sont régulées par une désensibilisation/internalisation du complexe ligand-récepteur (voir partie I-1-b). L'autorécepteur 5-HT_{1A} en est le meilleur exemple, récepteur dont la cinétique d'internalisation pourrait être un déterminant de l'efficacité thérapeutique des traitements antidépresseurs (Riad *et al.*, 2001, 2004; et partie III-2).

c- Localisation anatomique

i- Les sources

Définissons comme ‘sources’ les régions à l’origine de l’innervation 5-HT du SNC. Chez toutes les espèces de mammifères étudiées à ce jour, les corps cellulaires des neurones produisant la 5-HT se trouvent principalement dans le tronc cérébral, dans le mésencéphale ventral, formant un groupe de noyaux de matière grise (notés B) appelé *noyaux du raphé*. Ces noyaux, qui contiennent aussi d’autres types neuronaux, ont d’abord été décrits chez le rat, grâce à l’utilisation de la méthode d’histofluorescence de Falck et Hillarp (Dahlström & Fuxe, 1964). Quinze années plus tard, ils ont fait l’objet d’une nouvelle description, cette fois en immunocytochimie de fluorescence, à l’aide d’anticorps spécifiques dirigés contre la 5-HT elle-même (Steinbusch *et al.*, 1984). Une description détaillée du principal d’entre eux, le noyau raphe dorsalis (NRD), ainsi que de l’ultrastructure de ses neurones à 5-HT, a également été produite en radioautographie à haute résolution après capture et stockage *in vivo* de 5-HT tritiée (Descarries *et al.*, 1982).

Voici une vision très simplifiée de la répartition anatomique des neurones 5-HT du cerveau de rat :



ii- Les cibles

On va définir comme ‘cibles’ les territoires d’innervation, régions vers lesquelles les neurones à 5-HT se projettent. La 5-HT est le neurotransmetteur le plus répandu dans le cerveau : aucune région du SNC n’est dépourvue d’innervation 5-HT (Figure 3a). En tenant compte des données quantitatives actuellement disponibles pour le rat, signalons les innervations 5-HT particulièrement denses de la substance noire (6 à 9 x 10⁶ varicosités par

mm³ de tissu), du cortex cérébral (moyenne de 5.8×10^6), du néostriatum (5.6×10^6), du globus pallidus (4.8×10^6), de l'hippocampe (2.7×10^6), et du thalamus (1.4×10^6) (revu par Descarries *et al.*, 2009).

Une description détaillée de l'ultrastructure de l'innervation 5-HT dépasse le cadre de cette thèse. À ce sujet, on pourra consulter les articles de revue de Beaudet & Descarries (1987), Soghomonian *et al.* (1988), et Descarries *et al.* (2009).

d- Fonctions de la 5-HT

Le système 5-HT est le plus vaste système de neuromodulation dans le cerveau des vertébrés. Il permet un ajustement de l'activité des réseaux neuronaux dans toutes les régions du SNC; il n'est donc pas étonnant qu'elle soit impliquée dans un grand nombre de fonctions nerveuses. Voyons quelques exemples, tels que revus par Dugovic (2001), Millan (2002), Sodhi (2004), et Siever (2008). L'implication de la 5-HT dans la pathophysiologie de la dépression sera abordée dans la troisième partie de cette introduction.

Développement: Le fait que la synthèse de 5-HT et la croissance des axones des neurones du raphé soient très précoces a conduit à l'hypothèse d'une implication de la 5-HT dans la maturation du cerveau. Pour ne donner qu'un exemple, une ségrégation incomplète des inputs neuronaux dans la rétine et le thalamus a été observée chez la souris KO pour la MAO_A.

Sommeil: Chez le chat, l'injection périphérique de TP engendre une augmentation de la teneur centrale en 5-HT, corrélée à une augmentation de la durée du sommeil. En revanche, l'inhibition de la synthèse centrale de 5-HT par la parachlorophénylalanine (PCPA) entraîne une insomnie. De même, la destruction des noyaux du raphé conduit à une diminution de la durée du sommeil.

Douleur: L'action analgésique de la morphine a été corrélée à l'activation des neurones 5-HT. En particulier, l'effet de cet alcaloïde est potentialisé par la stimulation électrique des noyaux du raphé, alors qu'il est partiellement inhibé par un traitement préalable à la PCPA. De même, l'injection périphérique de 5-HTP entraîne une élévation du seuil de sensibilité à des stimuli nociceptifs.

Comportement: L'agressivité, mélange de colère et d'agitation, est un comportement sur lequel la 5-HT semble exercer un contrôle inhibiteur. De simples fluctuations du métabolisme de la 5-HT affectent ce comportement. Chez le chat, l'inhibition de la synthèse de 5-HT provoque une hyper-agressivité envers les proies et les

congénères. De nombreuses études ont aussi conclu que l'humain agressif a des taux diminués de 5-HT cérébrale. Le circuit impliqué comprendrait les cortex préfrontal, le cortex cingulaire antérieur, l'amygdale et l'hippocampe.

II-2 : Le noyau du raphé dorsal (NRD)

a- Localisation

Le NRD est un noyau mésencéphalique localisé à la partie ventrale de la PAG, entre le troisième nerf crânien, rostralement, et le locus cœruleus, caudalement. Il est long d'environ 1 mm chez la souris et 2 mm chez le rat. Sa limite dorsale correspond à l'aqueduc de Sylvius. Sa limite ventrale correspond aux faisceaux longitudinaux médians (revu dans Pineyro & Blier, 1999; Michelsen *et al.*, 2007). La première description du NRD est imputable à Santiago Ramón y Cajal en 1904, et de nombreuses études ont été publiées depuis (ex : Descarries *et al.*, 1982; Steinbusch *et al.*, 1984; Baker *et al.*, 1991; Hornung, 2003; Vanderhorst *et al.*, 2006).

b- Composition

i- Hétérogénéité de la composition cellulaire du NRD

L'hétérogénéité du NRD est connue depuis la fin des années 1970. Les corps cellulaires des neurones à 5-HT sont en effet retrouvés parmi plusieurs types neuronaux, des cellules de soutien, et de nombreuses terminaisons axonales. Chez le rat, les neurones 5-HT représentent le tiers d'un total d'environ 36 000 neurones (Descarries *et al.*, 1982; revu dans Kirby *et al.*, 2003). On y trouve notamment un millier de neurones dopaminergiques, lesquels se projettent essentiellement sur le cortex préfrontal et le striatum (Descarries *et al.*, 1986). Le NRD contient aussi de petits interneurons GABAergiques, qui contactent les neurones 5-HT, ainsi que des neurones de taille moyenne exprimant le NPY. L'hétérogénéité concerne aussi les neurotransmetteurs présents dans le NRD. On a décrit une production de glutamate, d'enképhaline, et de monoxyde d'azote (NO) dans le NRD (revu dans Michelsen *et al.*, 2007).

ii- La SP dans le NRD

Plusieurs études immunocytochimiques ont porté sur l'innervation SP du NRD chez le rat (Cuello & Kanazawa, 1978; Hökfelt *et al.*, 1978), le chat (Lovick & Hunt, 1983), et l'homme (Baker *et al.*, 1991). Tel que rapporté, il s'agit d'un immunomarquage ponctiforme, correspondant à un réseau d'axones variqueux particulièrement dense dans la partie ventrale du noyau. Contrairement au NRD de l'homme et du macaque, ainsi qu'à certains neurones 5-HT du raphé à projection médullaire chez le rat, les neurones 5-HT du NRD du rat n'expriment pas la SP (Sergeyev *et al.*, 1999; Michelsen *et al.*, 2007). Cependant, dans le NRD du rat, des fibres SP ont été observées au voisinage immédiat des neurones 5-HT (Ljungdahl *et al.*, 1978).

Une grande partie de la SP du NRD (~60%) est acheminée depuis l'habenula latérale (voir section b-ii ci-dessous). Le reste du réseau de fibres SP observé dans le NRD pourrait provenir d'interneurones situés à proximité (PAG) ou d'autres sources encore inconnues (Cuello & Kanazawa, 1978; Ljungdahl *et al.*, 1978).

b- Efférences et afférences du NRD

i- Projections ascendantes 5-HT

Dans le cadre de cette thèse, nous ne décrivons brièvement que les constituants du système ascendant 5-HT (voir Ungerstedt, 1971; Azmitia & Segal, 1978; Parent *et al.*, 1981).

Ce système ascendant est classiquement constitué de deux voies principales : l'une, dorsale, périventriculaire, et l'autre ventrale, transtegmentaire (Figure 3a), qui contiennent toutes deux les projections des groupes sérotoninergiques B6 et B7 appartenant au NRD (Dahlström & Fuxe, 1964). C'est par la voie dorsale que le NRD innerve en 5-HT le prosencéphale, incluant le cortex cérébral, l'hippocampe et les noyaux gris centraux. Par la voie ventrale, le NRD innerve en 5-HT d'autres régions du prosencéphale dont l'hypothalamus, le septum, l'amygdale et les bulbes olfactifs. À ces deux voies, certains auteurs ajoutent une voie dite médiane, via laquelle serait innervée la SN, et particulièrement la SN compacte (Michelsen *et al.*, 2007).

Le long de l'axe rostrocaudal du NRD, les neurones 5-HT présentent une organisation topographique qui semble respecter l'ordre de leurs projections (Imai *et al.*, 1986; Vertes, 1991; Vertes & Kocsis, 1994). Ainsi, les neurones 5-HT situés dans la moitié rostrale du noyau se projetteraient davantage sur les aires néocorticales, alors que ceux de sa moitié caudale innerveraient davantage les aires limbiques.

ii- Afférences

Différentes méthodes expérimentales ont permis de déterminer les principaux systèmes afférents au NRD, à savoir : l'habenula latérale, le locus cœruleus, la PAG, l'hypothalamus latéral, la formation réticulée pontique, les colliculi supérieurs et la moelle épinière (Sakai *et al.*, 1977; Azmitia & Segal, 1978). Parmi les neurotransmetteurs qui parviennent au NRD, on trouve notamment la noradrénaline (NA), qui provient du locus cœruleus (Baraban & Aghajanian, 1981), ou encore l'ACh et la SP qui proviennent de l'habenula latérale (Ljungdahl *et al.*, 1978; Neckers, 1979; Gallardo & Pasquier, 1980).

Plusieurs études démontrent un contrôle de l'activité des neurones 5-HT du NRD par l'habenula latérale (Reisine *et al.*, 1982; Paris & Cunningham, 1994; Amat *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2008; revu dans Hikosaka *et al.*, 2008). Cette petite structure, paire de noyaux situés au-dessus du thalamus, est la principale source de l'innervation SP du NRD (Figure 4a). Une étude lésionnelle et biochimique de Neckers (1979) a montré que les neurones peptidergiques de l'habenula latérale se projettent sur le NRD via le fasciculus retroflexus, fournissant la majeure partie de la SP du noyau. Comme nous le verrons plus loin, nos travaux apportent une confirmation immunocytochimique de ces résultats, ainsi que la première description de l'ultrastructure de cette innervation.

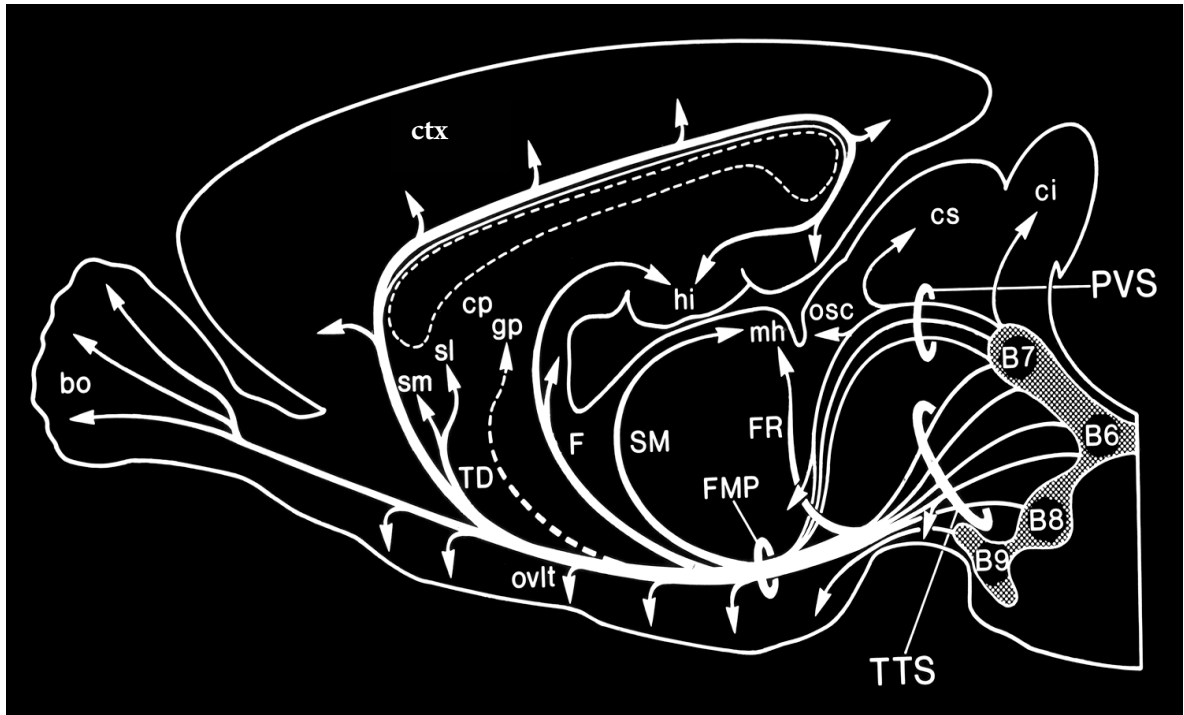


FIGURE 3a. Représentation schématique des voies de projection ascendantes 5-HT des noyaux du raphé dans le cerveau du rat. © Tiré de Parent et al. (1981) *Neuroscience* 6:115-138.

bo: bulbes olfactifs; **ci:** colliculus inférieur; **cp:** caudé-putamen; **cs:** colliculus supérieur; **ctx:** cortex; **gp:** globus pallidus; **hi:** hippocampe; **mh:** habenula médiale; **osc:** organe sous commissural; **ovlt:** organe vasculaire de la lame terminale; **sl:** septum latéral; **sm:** septum médian; **F:** piliers du fornix; **FMP:** faisceau prosencéphalique médian; **FR:** fasciculus retroflexus; **PVS:** système périventriculaire; **SM:** strie médullaire thalamique; **TD:** tractus diagonal de Broca; **TTS:** système transtegmentaire.

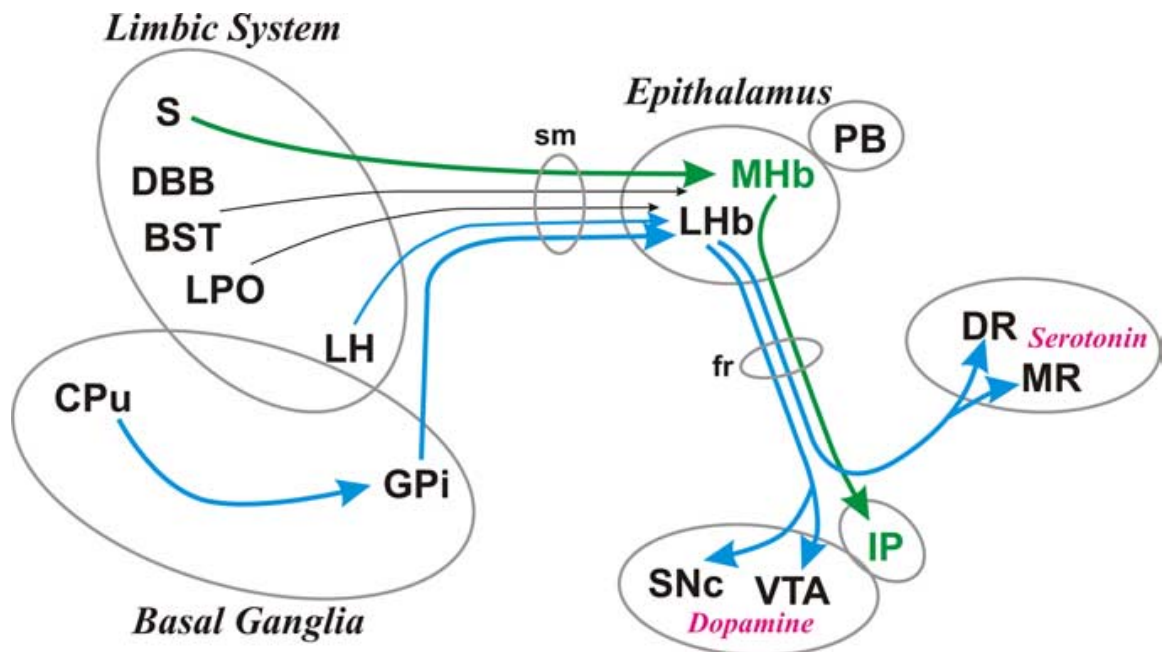


FIGURE 4a. Représentation schématique des connexions afférentes et efférentes des noyaux de l'habenula. © Tiré de Hikosoka et al. (2007) *J Neurosci* 28:11825-11829.

La glande pinéale (PB), l'habenula médiane (MHb) et l'habenula latérale (LHb) forment un ensemble appelé *épithalamus*. La MHb reçoit principalement des afférences provenant du septum (S) et se projette vers le noyau interpedonculaire (IP). La LHb reçoit surtout des afférences des noyaux gris centraux et se projette sur la substance noire compacte (SNc) et les noyaux sérotoninergiques, dont le noyau du raphé dorsal (DR). Les afférences et efférences de l'habenula sont respectivement convoyées par la stria medullaire (sm) et le fasciculus retroflexus (fr).

III - Interactions SP/5-HT et régulation de l'humeur

III-1 : Définitions

a- Humeur et troubles associés

Le terme 'humeur' (*mood* en anglais) est banalement utilisé pour évoquer une disposition affective ou émotionnelle, comme la tristesse ou la joie. On peut aussi l'employer pour évoquer un état passager (*être de mauvaise humeur*). Dans le langage courant, l'humeur est synonyme de 'tempérament'. En psychologie, l'humeur correspond à l'état thymique régissant les émotions et l'affectif, la thymie provenant du grec *thumos* qui signifie 'siège des passions'. Lorsque les médecins Antiques pensèrent découvrir l'organe à l'origine des émotions, ils le baptisèrent *thymus*. En psychiatrie (ce qui nous intéresse particulièrement ici), la *dysthymie* définit un trouble chronique de l'humeur suffisant pour causer des perturbations significatives chez le patient.

On appellera 'régulation de l'humeur' l'équilibre qui règne entre les différents systèmes neurobiologiques responsables de la genèse et de la régulation des émotions et des comportements associés. Une dérégulation, d'origine génétique ou épigénétique, pourra donner naissance à des 'troubles de l'humeur' ou 'troubles psychiatriques' incluant l'agressivité, l'anxiété, ou encore la dépression.

b- L'exemple de la dépression

En psychiatrie, la dépression fait référence au terme latin *depressio* signifiant 'enfouissement'. Elle désigne une maladie pour certains, un syndrome pour d'autres, dont la principale manifestation est une perturbation importante des rapports psycho-affectifs. Elle concerne environ 10% de la population mondiale.

On distingue deux grandes formes de troubles dépressifs. La principale, plus classique, est caractérisée par des épisodes dépressifs sévères (aussi appelée dépression majeure). Les principaux symptômes sont : la perte d'intérêt et de plaisir (anhédonie), la fatigue, les troubles du sommeil et de la concentration, la dévalorisation de soi et les pensées suicidaires. La seconde forme correspond aux troubles maniaco-dépressifs ou cyclothymiques, caractérisés par une alternance d'accès dépressifs et d'accès maniaques; dans la phase maniaque, le sujet peut être hargneux, irritable, parfois exubérant. La mélancolie est la forme la plus grave et la plus intense des états dépressifs, où la douleur

morale est plus forte que la douleur physique, où le désinvestissement est massif, où le ralentissement moteur se rapproche de l'inhibition, et où le désir de mort est constant.

L'émergence de la dépression comme 'épidémie' commence dans les années 1960, contemporaine du lancement des premiers médicaments antidépresseurs. Ainsi, lorsqu'en 1956 le psychiatre Roland Kuhn découvre les effets antidépresseurs de l'imipramine, le laboratoire GEIGY refuse d'abord d'en financer le développement, jugeant le marché de la dépression trop limité. Puis la société pharmaceutique MERCK emboîte le pas dans les années 1960, souhaitant promouvoir les effets antidépresseurs de l'amitriptyline. Peu à peu apparaissent de nouveaux composés moins puissants, mais avec moins d'effets secondaires et pouvant être prescrits par des médecins généralistes.

III-2 : Pathophysiologie de la dépression

a- Sérotonine

i- Dysfonctionnements de la neurotransmission 5-HT

Bien que le système 5-HT ne soit pas le seul responsable (voir Blier & De Montigny, 1994), de nombreuses données suggèrent une perturbation de la neurotransmission sérotoninergique au cours des désordres psychoaffectifs (revu dans Middlemiss *et al.*, 2002; Jones & Blackburn, 2002; Lowry *et al.*, 2008). La pathophysiologie de la dépression serait étroitement associée à un déficit de la transmission 5-HT centrale. On sait par exemple que, chez les patients dépressifs, les niveaux de 5-HT, de ses métabolites, et la réponse aux agonistes des récepteurs 5-HT sont réduits.

En tant que principal fournisseur de 5-HT pour le prosencéphale, le NRD a naturellement beaucoup attiré l'attention en recherche sur la dépression (revu dans Michelsen *et al.*, 2007; Lowry *et al.*, 2008). Parmi les études les plus récentes, on trouve par exemple des résultats obtenus en post-mortem montrant une diminution de 30% du nombre de neurones immunoréactifs pour la 5-HT dans le NRD de patients dépressifs âgés (Bauman *et al.*, 2002) ou une hausse de l'expression de la TPH dans le NRD de patients dépressifs suicidés (Boldrini *et al.*, 2005; revu par Lowry *et al.*, 2008).

Mais compte tenu de l'hétérogénéité du NRD, les scientifiques ont fini par élargir l'éventail de leurs recherches pour s'intéresser aux autres systèmes de neurotransmetteurs présents à proximité des neurones 5-HT. Le *corticotropin-releasing factor* (CRF) inhiberait

les neurones 5-HT via l'activation d'interneurones GABAergiques (Valentino & Commons, 2005). La galanine semble quant à elle stimuler la transmission 5-HT grâce à des récepteurs situés sur les neurones 5-HT du NRD (Kuteeva *et al.*, 2007). La SP agirait à travers des circuits locaux glutamatergiques et GABAergiques pour moduler la transmission 5-HT (Liu *et al.*, 2002; Ma & Bleasdale, 2002; Valentino *et al.*, 2003).

ii- Traitements à visée sérotoninergique

La plupart des médicaments utilisés pour traiter la dépression (antidépresseurs) ont une action qui repose sur leur capacité à induire une facilitation de la neurotransmission 5-HT (Blier & De Montigny, 1994; Kroeze & Roth, 1998; Piñeyro & Blier, 1999; Naughton *et al.*, 2000; Jones & Blackburn, 2002; Nichols & Nichols, 2008). Cinq grandes classes d'antidépresseurs ont été développées :

Les inhibiteurs des MAO (I-MAO): Les I-MAO_A s'intéressent aux indolamines. En inhibant la dégradation par la MAO_A ils augmentent les concentrations synaptiques en 5-HT. Les I-MAO_B visent les catécholamines (NA, DA). Un des premiers antidépresseurs (l'iproniazide), découvert au début des années 1960, est un I-MAO non sélectif agissant de façon non réversible sur les MAO_A et B.

Les antidépresseurs tricycliques: Ils bloquent la recapture de la 5-HT et de la NA. On trouve par exemple l'amitryptiline (action sur 5-HT et NA), la clomipramine (préférence pour la NA), et l'imipramine. Certains tricycliques bloquent aussi les récepteurs 5-HT₂. Mais ils interfèrent avec les systèmes histaminergique, noradrénergique, et cholinergique, d'où la présence d'effets indésirables.

Les inhibiteur sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS): Ce sont des antidépresseurs purement sérotoninergiques (moins d'effets secondaires). Ils sont largement utilisés dans les dépressions, les troubles de panique, la boulimie. On trouve par exemple la fluoxétine (Prozac[®]), la paroxétine, et le citalopram (voir Wong *et al.*, 1995). Ils n'influencent pas les récepteurs postsynaptiques (dans les région-cibles), mais induisent une désensibilisation et une internalisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} dans le NRD. Ils suppriment donc le frein physiologique, conduisant ainsi à une hausse du tonus sérotoninergique. L'effet maximal s'installe après 21 jours de traitement, période qui semble nécessaire à l'installation de la désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} (Czachura & Rasmussen, 2000).

Les antidépresseurs atypiques: Il en existe quatre classes : les inhibiteurs de la recapture 5-HT et NA (venlofoxine), les inhibiteurs de la recapture NA et DA (bupropion), les antagonistes des récepteurs 5-HT₂ et inhibiteurs de la recapture 5-HT, et enfin les antagonistes des récepteurs de NA et 5-HT (miansérine).

On connaît d'autres modulateurs de la neurotransmission 5-HT. L'antipsychotique atypique clozapine par exemple est un antagoniste des récepteurs dopaminergiques de type D₄, mais a aussi une bonne affinité pour les récepteurs 5-HT_{2A}. Un autre exemple de manipulation correspond à la lignée de souris où le gène codant pour le 5-HTT a été invalidé (KO 5-HTT); en effet, lorsque la recapture de la 5-HT est inexistante, on mime de manière permanente les effets des ISRS (Mannoury la Cour *et al.*, 2001).

b- Substance P

i- Implication de la SP

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la SP n'est pas seulement impliquée dans la régulation de fonctions physiologiques, incluant la nociception et la respiration, mais aussi dans la modulation de plusieurs fonctions hautement intégrées comme les émotions et les comportements associés. La localisation du système SP/rNK1 à des régions cérébrales connues pour réguler les comportements affectifs, ainsi que certaines études précliniques, suggèrent un rôle majeur de ce système dans les troubles psychiatriques comme l'anxiété et la dépression (revu dans Hasenöhr *et al.*, 2000; Mantyh, 2002; Ebner & Singewald, 2006).

Les preuves fonctionnelles de l'implication de la SP dans la régulation de l'humeur ont commencé à affluer vers le début des années 1990. Une des premières études publiées à ce sujet démontrait qu'un stress de contention ou d'isolation chez le rat pouvait altérer les niveaux de SP dans les aires cérébrales limbiques (Rosén *et al.*, 1992). Puis il est montré que les drogues anxiolytiques (Brodin *et al.*, 1994) et les antidépresseurs (Shirayama *et al.*, 1996) peuvent réduire les niveaux de SP dans le cerveau. En 1998, une étude préclinique fait grand bruit en décrivant les effets antidépresseurs, chez l'animal et l'homme, de l'antagoniste du rNK1, MK-0869 (Kramer *et al.*, 1998; revu dans Rupniak & Kramer, 1999; Stout *et al.*, 2001). En 2002, une équipe allemande démontre que les niveaux sériques de SP sont augmentés chez les patients atteints de dépression majeure (Bondy *et al.*, 2002). Enfin, les techniques d'injection intracérébrale de SP ou d'agonistes des rNK1 se sont

montrées efficaces pour déclencher des effets anxiogènes au cours de plusieurs tests comportementaux (Teixeira *et al.*, 2004; Bassi *et al.*, 2007).

Il faut souligner que plusieurs équipes ont aussi étudié l'effet des antagonistes des rNK2 et rNK3 sur la régulation de l'humeur. Ces deux sous-types de récepteurs, rappelons-le, possèdent une bonne affinité pour la SP. Bien que leur présence sur les neurones 5-HT du NRD ne soit pas clairement démontrée (Stoessl *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 2002), les rNK2 et rNK3 sont trouvés dans différentes régions cérébrales cruciales pour l'expression des comportements affectifs, comme le cortex frontal, l'hippocampe ou les noyaux du raphé (Dam *et al.*, 1990; Hagan *et al.*, 1993; Ribeiro-da-Silva *et al.*, 2000). Certains antagonistes non-peptidiques des rNK2 et rNK3 se sont avérés efficaces dans divers modèles d'anxiété et de dépression chez le rat (Walsh *et al.*, 1995; Dableh *et al.*, 2005), avec des possibles interactions avec le système sérotoninergique (Stoessl *et al.*, 1988; Stoessl & Hill, 1990).

ii- Les antagonistes du récepteur NK1: un échec en phase III

Ces 'pilules miracles' semblaient avoir un effet thérapeutique semblable aux antidépresseurs les plus prescrits mais avec moins d'effets indésirables (revu dans Pirot, 1999; Kramer *et al.*, 2004). Par conséquent, de 1999 à 2003, on assiste à une profusion d'études comportementales mettant en scène les antagonistes du rNK1 et concluant toutes à un effet anxiolytique et/ou antidépresseur (Smith *et al.*, 1999; Papp *et al.*, 2000; Cheeta *et al.*, 2001; Rupniak *et al.*, 2003). Pourtant, à partir de 2004, l'industrie pharmaceutique abandonne ce domaine de recherche prometteur, par suite de quelques études cliniques décevantes. S'agit-il d'une décision à courte vue? Plusieurs laboratoires continuent d'étudier activement les effets de la SP et des antagonistes du rNK1 sur la régulation de l'humeur (Dableh *et al.*, 2005; Czéch *et al.*, 2006; Guiard *et al.*, 2007; Gobert *et al.*, 2008; Haddjeri & Blier, 2008; revu dans Ebner *et al.*, 2009).

III-3 : Le modèle actuel

À travers l'histoire de la recherche sur les antagonistes du rNK1, on a aussi senti naître un intérêt croissant pour la possibilité d'une interaction entre les monoamines centrales (dont la 5-HT) et le système SP/rNK1 au cours de la régulation de l'humeur. Des preuves convaincantes ont commencé à apparaître au début des années 2000. Tout comme à la suite d'un traitement aux ISRS, l'administration d'un antagoniste NK1 chez le rat

provoque une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} dans le NRD suivie d'une hausse de l'activité électrique des neurones 5-HT (Haddjeri & Blier, 2001; Conley *et al.*, 2002). Chez la souris, l'invalidation génétique (KO) du gène du rNK1 tout comme son blocage pharmacologique augmentent la transmission 5-HT (Froger *et al.*, 2001; David *et al.*, 2004) et induisent des comportements similaires à ceux produits par les antidépresseurs classiques (Santarelli *et al.*, 2001). De plus, les effets antidépresseurs des ISRS semblent être potentialisés par la co-administration avec un antagoniste du rNK1 (Ryckmans *et al.*, 2002; Guiard *et al.*, 2004; Gobert *et al.*, 2008).

On sait que le NRD est riche en ARNm, en sites de liaison et en protéine du rNK1 (Maeno *et al.*, 1993; Saffroy *et al.*, 1994; Vigna *et al.*, 1994; revu dans Ribeiro-Da-Silva, 2000). Mais, au début de nos travaux, on ne trouvait dans la littérature qu'une seule description ultrastructurale de la distribution du rNK1 dans le NRD du rat (Commons & Valentino, 2002). Cette étude, appuyée par des publications ultérieures, démontrait la présence du rNK1 sur des interneurons glutamatergiques dans le NRD, mais laissait l'impression qu'il n'y a pas ou très peu de neurones 5-HT porteurs du rNK1 (voir aussi Léger *et al.*, 2002; Ma & Bleasdale, 2002; Nattie *et al.*, 2004). De même, chez la souris, deux études immunocytochimiques mentionnent l'absence de rNK1 sur les neurones à 5-HT du NRD (Froger *et al.*, 2001; Santarelli *et al.*, 2001).

Il a donc été suggéré que les effets de la SP sur la neurotransmission sérotoninergique étaient principalement indirects (Liu *et al.*, 2002; Valentino *et al.*, 2003). Un contrôle indirect de la transmission 5-HT par la SP sera ensuite confirmé par plusieurs équipes (Blier *et al.*, 2004; Gobbi *et al.*, 2007; Haddjeri & Blier, 2008).

IV - Objectifs généraux de l'étude

À la lumière des études que nous venons de résumer, le NRD apparaît bien comme le substrat anatomique privilégié de l'interaction entre la 5-HT et la SP. Mais jusque là, les données permettaient seulement de conclure à une interaction très indirecte entre les deux systèmes de neurotransmission au cours de la régulation de l'humeur. Les différentes parties exposées dans cette thèse re-examinent en détail les relations entre les deux systèmes à l'échelon cellulaire et subcellulaire, chez le rat et la souris, en vue d'une meilleure compréhension des mécanismes via lesquels le système SP peut interagir avec le système 5-HT pour modifier cette neurotransmission.

IV-1 : Distribution du récepteur NK1 dans le NRD du rat et de la souris

Nous avons d'abord considéré que la relation entre rNK1 et neurones 5-HT du NRD restait mal connue. Les démonstrations immunocytochimiques chez le rat illustraient jusque là une localisation du rNK1 principalement sur des neurones non-5-HT du NRD. En accord avec ces données, plusieurs équipes n'avaient observé que très peu de neurones colocalisant la 5-HT et le rNK1 dans le NRD. Ces données nous laissaient cependant perplexes et la prudence et la curiosité nous ont poussés à nous interroger sur la validité de ces résultats reposant essentiellement sur des observations négatives.

Nous disposions d'anticorps particulièrement sensibles et efficaces pour la détection immunocytochimique du rNK1 (courtoisie de James Krause du Neurogen Corporation; voir Ardel *et al.*, 1996). À l'aide de ces anticorps, nous avons examiné en microscopie optique, confocale et électronique la distribution cellulaire et subcellulaire de l'immunoréactivité anti-rNK1 dans le NRD du rongeur, ainsi que les relations entre cette immunoréactivité et d'autres marqueurs. Le récepteur a ainsi été visualisé lors de simples marquages avec l'anticorps anti-rNK1 (révélé à l'immunopéroxydase ou à l'immunogold), et lors de doubles marquages en combinaisons avec divers anticorps couplés à l'immunopéroxydase ou à des fluorophores (anti-TPH, anti-SP; anti-GABA).

L'objectif de ce premier travail était de voir, dans le NRD du rat : 1) si le rNK1 est présent sur des corps cellulaires et dendrites uniquement, ou aussi sur des terminaisons axonales (afférences); 2) s'il existe des rNK1 sur les neurones 5-HT; 3) si les afférences SP au NRD possèdent des autorécepteurs NK1; 4) quels sont les rapports anatomiques entre la SP et la 5-HT; puis 5) vérifier la distribution du rNK1 sur les neurones non 5-HT. L'examen parallèle chez la souris devait répondre aux mêmes questions en indiquant dans quelle mesure la localisation du rNK1 était comparable à celle du rat.

Sur la base de ces données, nous estimions pouvoir réaliser une deuxième étude visant à mieux comprendre l'action des antagonistes du rNK1 dans le NRD du rongeur.

IV-2 : Antagonistes NK1 et récepteur NK1

Ayant précisé la localisation cellulaire et subcellulaire du rNK1, nous nous sommes ensuite interrogés sur les effets possibles du traitement aux antagonistes sur la localisation subcellulaire et l'expression du récepteur. Nous avons ainsi examiné la distribution du récepteur en microscopie électronique quantitative, ainsi que la quantité de son ARNm dans

le NRD, au cours de traitements aigu, subchronique et chronique avec l'antagoniste RP67580. Nous avons décidé d'utiliser cet antagoniste sachant qu'il s'avérait particulièrement efficace pour bloquer les réponses à la SP chez le rongeur (Beaujouan *et al.*, 1993; Santarelli *et al.*, 2001).

Nous voulions ainsi déterminer si le traitement aux antagonistes affectait la distribution de ces récepteurs dans le NRD, et si d'éventuels mouvements du récepteur étaient alors associés à une régulation de l'expression de son gène. Dans les deux cas, il fallait tenir compte du décours temporel d'éventuels changements. Sur la base des résultats de la première partie, nous pensions aussi être en mesure de préciser la nature des éléments cellulaires subissant les changements.

IV-3 : Déafférentation SP du NRD et récepteur NK1

Nous avons voulu examiner enfin la localisation subcellulaire du rNK1 dans le NRD du rat trois semaines après une dénervation SP par destruction électrolytique de l'habenula (noyau à l'origine des afférences à SP du NRD). L'objectif était ici de savoir si les effets d'une telle désafférentation – éliminant en grande partie l'innervation SP du NRD – seraient équivalents à ceux d'un traitement prolongé avec un antagoniste du rNK1.

DEUXIÈME CHAPITRE : LES ARTICLES

Premier article :

**IMMUNOCYTOCHEMICAL EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF
SUBSTANCE P RECEPTOR (NK1) IN SEROTONIN NEURONS
OF RAT AND MOUSE DORSAL RAPHE NUCLEUS**

Publié en 2006

dans :

The European Journal of Neuroscience 23:2947-2958

(Baptiste LACOSTE, Mustapha RIAD et Laurent DESCARRIES)

**IMMUNOCYTOCHEMICAL EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF
SUBSTANCE P RECEPTOR (NK1) IN SEROTONIN NEURONS OF RAT AND
MOUSE DORSAL RAPHE NUCLEUS**

Baptiste LACOSTE, Mustapha RIAD and Laurent DESCARRIES

Départements de pathologie et biologie cellulaire et de physiologie,
and Centre de recherche en sciences neurologiques, Faculté de médecine,
Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

NK1 receptors in DRN

(Words in manuscript: 7998; in abstract: 243; in introduction: 499)

Correspondence: Laurent DESCARRIES M.D.
Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de médecine, Université de Montréal
CP 6128, Succursale Centre-ville
Montréal, QC, Canada H3C 3J7

Key words: mood, neurokinin receptors, cellular distribution, immunocytochemistry

ABSTRACT

In addition to its neurotransmitter/modulator role in pain perception, substance P (SP) is involved in a regulation of mood, since antagonists of its neurokinin-1 receptor (NK1r) have been found to have antidepressant-like effects in human. In rodents, treatment with NK1r antagonists has been shown to increase the firing of dorsal raphe nucleus (DRN) serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) neurons and to induce a desensitization of their 5-HT_{1A} autoreceptors, suggesting local interactions between the SP and 5-HT systems. To search for the presence of NK1r on 5-HT neurons of the DRN, we used light and electron microscopic immunocytochemistry, as well as confocal microscopy, after single and double labeling of NK1r and of the biosynthetic enzyme of 5-HT, tryptophan hydroxylase (TpOH). A significant number of 5-HT (TpOH positive) cell bodies and dendrites endowed with NK1r were thus demonstrated in the caudal part of rat and mouse DRN. As visualized by electron microscopy after gold immunolabeling, NK1r was mostly cytoplasmic in 5-HT neurons while predominating on the plasma membrane in the case of TpOH negative dendrites. The proportion of NK1r observed on the plasma membrane of 5-HT neurons was however slightly higher in mouse than rat. Thus, in both rat and mouse DRN, a subpopulation of 5-HT neurons is endowed with NK1r receptors and may be directly involved in the antidepressant-like effects of NK1r antagonists. These 5-HT neurons represent a new element in the neuronal circuitry currently proposed to account for the role of SP in mood regulation.

INTRODUCTION

Most effects of substance P (SP) in CNS appear to be mediated by high affinity neurokinin-1 receptors (NK1r) (reviewed in Otsuka and Yoshioka, 1993; Ribeiro-Da-Silva et al., 2000). A well established role for central SP is in pain perception, but there is increasing evidence for its implication in mood regulation also (reviewed in Herpfer and Lieb, 2003). It has been suggested that SP neurotransmission is affected in mood disorders. Serum levels of SP were shown to be elevated in major depression (Bondy et al., 2003; but see Deuschle et al., 2005), and SP concentration reduced in several brain regions under antidepressant treatment (Shirayama et al., 1996).

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is the neurotransmitter best known to be involved in mood regulation (for review, see Middlemiss et al., 2002). The efficacy of most antidepressant treatments, and particularly of selective 5-HT reuptake inhibitors (SSRIs), depends on increases of 5-HT neurotransmission in key brain regions such as hippocampus. This effect is itself conditioned by a desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors that normally block the firing of 5-HT neurons (Le Poul et al., 1995, 2000).

The discovery that NK1r antagonists may also have antidepressant effects in human (Kramer et al., 1998; reviewed in Rupniak and Kramer, 1999) has drawn attention to interactions between the SP and 5-HT systems in dorsal raphe nucleus (DRN), and the possible localization of NK1r on its 5-HT neurons. Much as observed after SSRI treatment, the administration of NK1r antagonist in rat was found to desensitize 5-HT_{1A} autoreceptors in the DRN, and to increase the spontaneous firing of 5-HT neurons (Haddjeri and Blier, 2001; Conley et al., 2002). In mouse, both the genetic deletion and pharmacological inactivation of NK1r increase 5-HT neurotransmission (Froger et al., 2001; David et al., 2004) and induce a behavior similar to that produced by antidepressants (Santarelli et al., 2001). Lastly, co-administration of SSRI and NK1 antagonist has recently been shown to potentiate the cortical outflow of 5-HT induced by the SSRI (Guiard et al., 2004).

To date, there has been only one light and electron microscopic immunocytochemical study of the distribution of NK1r in rat DRN (Commons and Valentino, 2002). This study has demonstrated the presence of NK1r on glutamate neurons within the nucleus, but left the impression that there were very few on its 5-HT neurons (see also Léger et al., 2002; Ma and Bleasdale, 2002; Nattie et al., 2004). It was therefore suggested that the effects of SP on 5-HT neurotransmission are mostly indirect (Liu et al., 2002; Valentino et al., 2003). Similarly, in mouse, two light microscopic immunocytochemical studies reported an absence of NK1r on DRN 5-HT neurons (Froger et al., 2001; Santarelli et al., 2001). In this context, and because these studies had all focused on the largest, rostral portion of DRN, we further examined the cellular and subcellular distribution of NK1r in its caudal as well as rostral part in both species, using single and double immunolabeling of NK1r and of the biosynthetic enzyme of 5-HT, tryptophan hydroxylase (TpOH).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Fourteen adult male Sprague Dawley rats (body weight: 225-250 g) and 12 adult male sv129 mice (body weight: 25-30 g), including 2 knockout (KO) for NK1r, were used. These animals were directly purchased from Charles River (St Constant, QC), except for the KOs, which were kindly provided by Dr. René Hen (Columbia University, New York). Housing was at a constant temperature (21°C) and humidity (60%), under a fixed 12 hours light/dark cycle and with free access to food and water. All procedures involving animals and their care were conducted in strict accordance with the Guide to the Care and Use of Experimental Animals (Ed2) of the Canadian Council on Animal Care. The experimental protocols were approved by the Comité de Déontologie pour l'Expérimentation sur des Animaux at the Université de Montréal.

Immunocytochemistry

Primary antibodies. Mouse monoclonal antibody against tryptophan hydroxylase (TpOH) was purchased from Sigma (Saint Louis, MI). The preparation and characterization of this antibody have been described by Haycock et al. (2002), who verified its specificity by preadsorption and western blot. The distribution of immunostaining with this antibody matched that of 5-HT neurons (Haycock et al., 2002), without any cross reactivity of midbrain dopamine neurons (data not shown). Rabbit polyclonal antibody against NK1r was a generous gift of Dr. James E. Krause (Neurogen Corporation, Branford, CT). This antibody was raised against the intracellular carboxy-terminal sequence (376-407) of the long form of rat NK1r. Its preparation and characterization have already been described (Ardelt et al., 1996; Ribeiro-Da-Silva et al., 2000). Its specificity was tested by the processing of sections from 2 NK1r KO mice. Rat monoclonal antibody against substance P (SP) was purchased from Cedarlane (Hornby, ON). This antibody recognizes the COOH-terminal end of SP, thus not cross-reacting with Leu- or Met-enkephalin, somatostatin, or beta-endorphin. This antibody has been extensively used for the localization of SP immunoreactive sites in brain sections (e.g., Cuello et al., 1979; Kelly et al., 2003). Immunocytochemical specificity controls also included omission of primary antibodies (2 rats, 1 mouse).

Tissue preparation. The animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (80mg/kg, i.p.) and perfused through the aortic arch with a solution of 3% acrolein (300 ml in 3 min for rats; 150 ml in 4 min for mice) in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4), followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in the same buffer (500 ml in 5 min for rats; 300 ml in 8 min for mice). The brain was removed, postfixed by immersion in the PFA solution at 4°C (60 min for rats, 30 min for mice), and washed in phosphate buffered saline (PBS: 0.9% NaCl in 50 mM PB, pH 7.4). Parasagittal (0.1 mm lateral to the medial line) and transverse sections of the midbrain (50 µm-thick for rats, 40 µm-thick for mice) were then cut in PBS with a vibratome, immersed in 0.1% sodium borohydride in PBS for 30 min at room temperature, and washed in this buffer before immunocytochemical processing. In complementary experiments, sections from two rats, in which primary fixation and postfixation were carried out with 4%PFA only, were prepared for dual immunofluorescence labeling and confocal microscopy, as described below.

Single TpOH, NK1r, or SP labeling for light and electron microscopy. Sections were processed free floating for single immunoperoxidase (light and electron microscopy) or immunogold labeling (electron microscopy). After preincubation for 2 h at room temperature in a blocking solution of PBS containing 10% normal goat serum, 0.5% gelatin, and 0.3% Triton X-100, sections were incubated overnight (or 48 h for electron microscopy) at room temperature, in a 1:1000 dilution of TpOH or NK1r antibodies, or 1:500 of SP antibody, in blocking solution.

For immunoperoxidase labeling and light microscopy, sections were rinsed in PBS, incubated for 2 h at room temperature with biotinylated goat anti-mouse (for TpOH), anti-rabbit (for NK1r), or anti-rat (for SP) IgGs (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), diluted 1:1000 in blocking solution, rinsed in PBS, and then incubated for 1 h with a 1:1000 dilution of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin (Jackson ImmunoResearch). After washes in PBS and then in 0.05 M Tris-saline buffer (TBS) (pH 7.4), these sections were incubated for 2-5 min in TBS containing 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) and hydrogen peroxide (0.01%) and the reaction was stopped by several washes in TBS followed by PBS. Revelation with the Vector VIP substrate kit (Vector, Burlington, ON) was also used on several occasions. The immunostained sections were mounted on microscope slides, dehydrated in ethanol of increasing concentration, cleared in toluene, and coverslipped with DPX (Fluka, Sigma-Aldrich, Oakville, ON).

For immunogold labeling and electron microscopy, Triton X-100 was omitted from the blocking solution. Incubation with primary antibody was followed by rinses in PBS and incubation overnight at room temperature in goat anti-mouse IgGs conjugated to 1 nm colloidal gold particles (AuroProbe One, Amersham, Oakville, ON) diluted 1:50 in blocking solution. The size of immunogold particles was increased by silver enhancement (IntenSE kit, Amersham, Amersham Biosciences) for 15 min, and the sections processed for electron microscopy as previously described in detail (Riad et al., 2000). In brief, the sections were osmicated, dehydrated and flat-embedded in resin between a glass slide and plastic coverslip (Rinzl, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). After 48 hours of polymerization at 60°C, the coverslips were removed, and regions of interest, selected by light microscopy, were excised from the slides and re-embedded at the tip of resin blocks. Ultrathin sections from these blocks were cut on a ultramicrotome (Reichert Ultracut S, Leica Canada, St. Laurent, QC), collected on bare square-meshed copper grids, stained with lead citrate, and examined with an electron microscope (Philips CM100, Philips Electronique, St. Laurent, QC).

The protocol of *double NK1r and TpOH immunolabeling for electron microscopy* was a slight modification of the single labeling protocols. After simultaneous incubation with both primary antibodies (1:000 dilution) for 48 h, NK1r were labeled with immunogold and then TpOH with immunoperoxidase, as described above.

Double NK1r and TpOH immunofluorescence labeling for confocal microscopy. 50 µm-thick sections were preincubated for 1 h in blocking solution (10% normal donkey serum, 0.5% gelatin and 0.3% Triton X100 in PBS), and then incubated for 60 h at room temperature with both mouse anti-TpOH and rabbit anti-NK1 primary antibodies diluted 1:500 in blocking solution. After several washes in PBS, sections were incubated for 48 h at room temperature with a mix of Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and a Cy3-conjugated donkey anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch) IgGs, diluted 1:200 in blocking solution. After washes in 0.1 M PB and distilled water, sections were mounted on microscope slides in Vectashield mounting medium for fluorescence (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Immunocytochemical controls included experiments in which one of the primary antibodies was omitted. There was no cross reactivity of the secondary antibodies. These sections were observed at the confocal microscope (Leica, TCS-SP1) using sequential laser analysis with emission intensities of 519 nm (Alexa Fluor) and 570 nm (Cy3). Images were produced with the

Leica confocal software (LCS v2.65) and adjusted for brightness and contrast with the Adobe Photoshop software.

Data analysis

The midbrain of 5 rats and 7 mice (including the 2 NK1r KO) was examined in longitudinal as well as transverse sections after single immunoperoxidase-labeling for TpOH or NK1r (3 rats, 5 mice), or for SP (2 rats, 2 mice), from a stereotaxic level approximating A + 4 mm (IA) rostrally to A - 1 mm caudally, in rats (Paxinos and Watson, 1986), and A 0.0 mm to A - 1.54 mm in mice (Franklin and Paxinos, 1997). This included both the B7 and B6 serotonin cell groups in the DRN, as described in the rat by Steinbusch (1981; also see Descarries et al., 1982). Photomicrographs were taken with a Leitz Diaplan optical microscope coupled to a Spot RT color digital camera, using Spot v4.0.5 for Windows (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI). These images were adjusted for brightness, contrast and sharpness with the Adobe Photoshop software.

The electron microscopic analysis focused on the ventro-medial portion of the DRN (white boxes in Fig. 2), at two transverse levels: one in the rostral half of the nucleus (A + 1.36 mm for rats, - 0.56 mm for mice), the other in its caudal half (A + 0.28 mm for rats, - 1.16 mm for mice). Material from 5 rats and 4 wild-type mice was examined after double NK1r/TpOH immunolabeling. Single immunogold labeling of TpOH was also carried out in 1 rat.

In each condition and for both DRN levels, a minimum of 10 electron micrographs of immunoreactive DRN somata and dendrites were taken at a uniform working magnification (X 6 600), within a narrow area of thin sections less than 10 μm away from the tissue-resin border. Cellular profiles were considered as immunoreactive when showing unequivocal DAB immunoprecipitate or an accumulation of silver-intensified immunogold particles (at least three per profile in the case of dendrites). The film negatives were scanned (Epson Perfection 3200), converted into a positive picture, adjusted for brightness, contrast, and sometimes for sharpness (Adobe Photoshop), and printed at a final magnification of 16 000 X.

To quantify the cellular distribution of the NK1r immunogold labeling after double NK1r/TpOH labeling, 10 micrographs from each animal, showing the best morphological preservation, were selected at each DRN level, for a total tissue surface of 10 500 μm^2 per

animal. Cross sectional profiles of unlabeled and of singly and doubly labeled dendrites ($n = 1400$ for rats; $n = 1120$ for mice) were measured for size (transverse diameter), and the frequency of doubly (NK1r-gold/TpOH-DAB) versus singly (NK1r or TpOH) labeled dendrites was determined and expressed as percent of all TpOH profiles.

Lastly, we compared the frequency of plasma membrane localization of NK1r in singly versus doubly labeled dendrites of rats and mice. This was done by determining the proportion (%) of silver-enhanced gold particles juxtaposed to the plasma membrane as opposed to those within the cytoplasm. Gold particles were considered as membrane-bound only when overlapping or in direct contact with the plasma membrane. These counts were obtained from 85 and 80 singly labeled dendrites, and 124 and 110 doubly labeled dendrites of rats and mice, respectively.

All statistical analysis were performed with the Prism 4 software for Windows (GraphPad Software). Differences in dendritic labeling between DRN levels, in the size of dendrites according to membranous or cytoplasmic NK1r-labeling, or in the localization of NK1r labeling between rat and mouse, were analyzed by unpaired Student's *t* tests; and differences in size of doubly labeled dendrites between rat and mouse by a paired Student's *t* test. $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Specificity of the NK1r antibody

There was no immunostaining in light microscopic sections from NK1r KO mice processed for NK1r-DAB immunolabeling (Fig. 1). In material from rats and normal mice processed for electron microscopy according to the double labeling protocol, but without NK1r antibody, no immunogold particles were seen.

TpOH labeling in rat and mouse mesencephalon and DRN

In mice as well as rats, numerous TpOH positive cell bodies and their dendrites were readily identified by light microscopy after immunoperoxidase labeling, along the whole rostro-caudal extent of the DRN (approximately 1 and 2 mm, respectively) (Figs. 2A-C, G-I; for a detailed, recent description, see Veronique et al., 2006). The median raphe nucleus

(MRN), ventral to the medial longitudinal fasciculi (mlf), also showed intense somatodendritic TpOH labeling (Figs. 2A,G;). In both species, the rostral part of the DRN, shaped like an inverted triangle, contained the greatest number of TpOH positive neurons (compare B to C, and H to I), distributed in two median and two lateral subgroups, as previously described in rat (Steinbusch, 1981; Descarries et al., 1982). The caudal part of the DRN (Figs. 2C,I) was much narrower and contained fewer and less tightly grouped TpOH positive neurons (see also Fig. 3).

At the electron microscopic level, many TpOH (DAB) immunoreactive cell bodies and dendrites were visible in the ventromedial DRN of both rats and mice after single TpOH (DAB) (Figs. 5A,B and 6A) or double TpOH (DAB)/NK1r (gold) labeling (Figs. 5G-I and 6C-F). This DAB immunostaining was in the form of a dense precipitate, sparing the nucleus and scattered over the entire cytoplasm (e.g., Figs. 5A,B). Immunogold labeling of TpOH (Fig. 5C) confirmed the widespread cytoplasmic localization of the enzyme throughout 5-HT cell bodies and dendrites.

Distribution of NK1r labeling in rat and mouse mesencephalon and DRN

In both rat and mouse mesencephalon, including the DRN, the overall pattern of NK1r immunoperoxidase labeling was markedly different from that of TpOH and also different between the two species (Figs. 2 D-F and J-L; see also Fig. 3). In rat, relatively dense immunostaining was found in the DRN, MRN and along the dorsal aspect of the caudal interpeduncular nucleus (IPC), and lighter immunostaining in the parvocellular oculomotor nucleus (3) and supraoculomotor central gray, around the posterodorsal and dorsal tegmental nuclei (DTg), and in the sphenoid nucleus. In mouse (Fig. 2J), the supraoculomotor central gray and DTg were the most intensely labeled, whereas the DRN, MRN, and IPC showed light immunolabeling, and the posterodorsal tegmental nucleus was unlabeled. Also contrasting with the rat, was a very light labeling of the IPC and heavier labeling of the rostral interpeduncular nucleus (IPR).

In all these regions, the NK1r labeling appeared to be somatodendritic, even if less dense and abundant than the TpOH. In the rostral half of rat DRN, it assumed a shell-like distribution around the portion of the nucleus containing the dorsomedial 5-HT cluster (Fig. 2E). A similar predilection of the NK1r dendritic labeling for the periphery of the dorsomedial 5-HT cluster was apparent, caudally, in the mouse (Fig. 2L).

Distribution of SP labeling in rat and mouse DRN

As previously described in rat by Cuello and Kanazawa (1978; see also Ribeiro-Da-Silva et al., 2000), a delicate network of SP immunoreactive varicose axons was observed throughout the DRN of both rat and mouse, notably in its ventral part (Fig. 3). In rat, but not mouse, this punctate labeling was particularly dense along the inner aspects of the medial longitudinal fasciculi, rostrally, and extended along their mediodorsal aspects, caudally (see Fig. 3 SP).

Dual TpOH/NK1r immunofluorescence labeling (confocal microscopy)

As shown in Fig. 4, the distribution pattern of TpOH immunoreactivity observed by fluorescence and confocal microscopy in the rostral and caudal parts of rat DRN was identical to that detected after immunoperoxidase labeling (compare with TpOH at top row of Fig. 3). In contrast, the cell bodies immunoreactive for NK1r stood out more distinctly after immunofluorescence than immunoperoxidase labeling and were more numerous in the caudal than rostral part of the nucleus. Singly and doubly immunolabeled neurons were present in both part of the DRN, and the proportion of TpOH neurons endowed with NK1r (see merge in Fig. 4) was obviously greater in the caudal than rostral part of DRN.

Ultrastructural localization of NK1r in rat and mouse DRN

In both rat and mouse, the electron microscopic examination of the ventromedial DRN after single immunogold labeling of NK1r revealed the presence of two populations of dendrites with respect to the subcellular distribution of the receptor (gold particles) (e.g. Figs. 5D-F). In some dendrites, the labeling was mainly located in the cytoplasm (Figs. 5D and F), in others it was mainly associated with the plasma membrane (Figs. 5E and F, and 6B). In the rostral DRN, the membrane-labeled profiles were predominant, whereas, in the caudal DRN, the dendrites with cytoplasmic NK1r labeling were also frequent. After double NK1r (gold) and TpOH (DAB) labeling, it was obvious that all somata dendrites displaying cytoplasmic NK1r labeling were TpOH immunopositive, whereas all those with membranous NK1r labeling were TpOH immunonegative (Figs. 5H and I). In both rat and mouse, the TpOH/NK1r positive dendrites were slightly larger than the TpOH negative (rat: 1.36 ± 0.05 versus 0.97 ± 0.04 μm , $p < 0.01$; mouse: 1.04 ± 0.03 versus 0.96 ± 0.04 μm , $p < 0.05$), in keeping with the larger size of DRN 5-HT versus non 5-HT neurons (Descarries et al., 1982). In all 165 dendritic profiles displaying membrane-bound NK1r,

the receptor appeared to be scattered along the plasma membrane and never seen in dendritic zones abutted by synaptic terminals (e.g., Figs. 5E, F, H, I and 6B).

Quantitative analysis. Fig. 7 illustrates the frequency with which NK1r/TpOH immunoreactive dendrites were observed in doubly labeled material from the caudal versus rostral DRN of rat (Fig. 7A) and mouse (Fig. 7B), as compared with unlabeled and singly TpOH- (DAB) or NK1r-labeled (gold) dendrites. In both rat and mouse, there was no significant difference between rostral and caudal DRN in the total number of TpOH positive dendrites. In contrast, the total number of NK1r positive dendrites was greater in the caudal compared to the rostral part of the DRN. This difference reached statistical significance in both species when the frequency of NK1r/TpOH-labeled dendrites was expressed as percent of total TpOH labeled (37% versus 5% in rat; 26% versus 13% in mouse) (Figs. 7A and B, inserts).

Fig. 8 compares in this same material the proportion of NK1r labeling associated with the plasma membrane in dendrites labeled for both NK1r/TpOH as opposed to NK1r only. In singly NK1r-labeled dendrites of both rat and mouse, 80% of the gold particles (NK1r) are associated with the plasma membrane, whereas this proportion falls to 26% and 41% in NK1r/TpOH labeled dendrites of rat and mouse, respectively. This latter value in mouse is significantly higher than that in rat ($p < 0.001$), a difference which cannot be attributed to the slightly smaller average diameter of the dendrites sampled in mouse ($1.15 \pm 0.03 \mu\text{m}$; median = $1.14 \mu\text{m}$) compared with rat ($1.25 \pm 0.03 \mu\text{m}$; median = $1.23 \mu\text{m}$).

DISCUSSION

This study reveals the existence of a subpopulation of 5-HT neurons endowed with somatodendritic NK1r, which predominate in the caudal part of the DRN. In so doing, it also demonstrates a predominant cytoplasmic localization of the NK1r in the 5-HT neurons of DRN, contrasting with their membrane-bound localization in its non-5-HT neurons.

NK1r in rat and mouse DRN

Whereas the overall pattern of distribution of the 5-HT neurons was similar in rat and mouse mesencephalon, there were striking differences in the anatomical localization and

density of somatodendritic NK1r immunolabeling between the two species. This could reflect interspecies differences in intrinsic organization and cellular composition, and/or in the SP afferentation of the NK1r positive nuclei. Within the DRN itself, the NK1r immunoreactivity also displayed distinctive patterns of distribution between rat and mouse that suggested a predilection of these receptors for the periphery of the tightest clusters of 5-HT neurons. The exclusive somatodendritic localization of NK1r within the DRN, and presumably in the other NK1r rich nuclei of the mesencephalon, was in keeping with the matching patterns of distribution of its mRNA (Maeno et al., 1993) and binding sites (Saffroy et al., 1994), as well as with the earlier immunocytochemical data at light and electron microscopic levels (Ribeiro-Da-Silva et al., 2000; Commons and Valentino, 2002). Overall, there also seemed to be a good match between the regional distribution of immunoreactive SP axons within the DRN and that of the NK1 receptors.

Under the conditions of the present experiments, it could not be ascertained that all 5-HT neurons endowed with NK1r receptors were actually being detected, especially at the electron microscopic level, since NK1r had to be immunolabeled with gold in these double labeling experiments, and the preembedding immunogold technique is notoriously less sensitive than the immunoperoxidase-DAB technique. Even then, however, the percentage of TpOH-immunopositive dendrites endowed with NK1r in the caudal part of both rat and mouse DRN (37% and 26%, respectively) indicated that a significant proportion of its total population of 5-HT neurons were endowed with NK1r. This was also confirmed by the double labeling immunofluorescence experiments for confocal microscopy, which revealed a number of TpOH fluorescent cell bodies entirely compatible with the observations after single immunoperoxidase labeling, and a greater proportion of doubly labeled nerve cell bodies in the caudal than rostral half of the ventral DRN.

In monkey (Charara and Parent, 1998) and human (Baker et al., 1991; Sergejev et al., 1999), approximately 50% DRN 5-HT neurons have been shown to co-express SP. In rat or mouse DRN, neither SP neuronal cell bodies nor, a fortiori, co-existent 5-HT and SP have ever been demonstrated (Chan-Palay et al., 1978; Hökfelt et al., 1978; Björklund et al., 1979). One must therefore assume that, in rodents, the activation of NK1r on 5-HT and non 5-HT DRN neurons is by SP released by afferents from the habenula (Neckers et al., 1979; Reisine et al., 1982), and perhaps also by diffusion of SP from nearby release sites (Liu et al., 1994; Barbaresi, 1998).

SP fibers and terminals have already been shown to be present in the rat DRN (Cuello and Kanazawa, 1978; Ljungdahl et al., 1978), but the available data does not suggest a differential distribution of these afferents in different portions of the nucleus. In rat, we did observe a particularly dense SP innervation pervading the ventralmost part of the nucleus, caudally. Differences in the distribution of efferent projections from the rostral versus the caudal DRN have also been described in rat (Vertes, 1991; Vertes and Kocsis, 1994). From these anterograde axon tracing studies, it was concluded that the caudal DRN sends more fibers to limbic areas, including the hippocampal formation (which is poorly innervated by the rostral DRN), while the rostral DRN projects more densely to virtually all neocortical areas. In addition, the fibers from the caudal DRN would project less widely and heavily than those from the rostral DRN to structures of the brainstem and the medulla.

NK1r is mostly cytoplasmic in 5-HT neurons of rat and mouse DRN

The electron microscopic examination of doubly-labeled (NK1r and TpOH) material indicated that the DRN dendrites showing NK1r in their cytoplasm after single immunogold labeling corresponded to TpOH-positive (5-HT) neurons, whereas those showing NK1r on their plasma membrane were always TpOH immunonegative (non 5-HT). These results were not inconsistent with the earlier electron microscopic observations of Commons and Valentino (2002), demonstrating the existence of membrane-associated NK1r on glutamate neurons of the rat DRN. In most CNS regions thus far examined, NK1r has been described as a membrane bound somatodendritic receptor (Mantyh, 1995; Ribeiro-Da-Silva et al., 2000; Commons and Valentino, 2002).

There was no obvious explanation for the predominantly cytoplasmic and plasma membrane localizations of NK1r in the 5-HT and non 5-HT neurons, respectively, in both rat and mouse DRN. Like most G-protein-coupled receptors, NK1r undergo rapid desensitization by internalization, as observed after stimulation by agonist or social stress in the case of this receptor (Mantyh, 1995). It will be of interest to determine, by double immunolabeling at electron microscopic level, if there are preferential topological and/or synaptic relationships between SP axon terminals and 5-HT and non 5-HT neurons bearing NK1 receptors in the DRN.

Knowing that SP is released in DRN, it is reasonable to assume that it is the action of the endogenous peptide which is responsible for internalization of NK1r in the 5-HT neurons. Mantyh (1995) has shown that approximately 60% of NK1r in rat striatum are

internalized in both cell bodies and dendrites within 1 min after stereotaxic injection of SP. Smith and colleagues (1999) have observed a strong internalization of NK1r in gerbil amygdala after 1 h of immobilization stress, which was prevented by pretreatment with the SP antagonist, L-760,735. In view of the persistence of membrane bound receptor on the membrane of non 5-HT neurons, however, it is unlikely that the mere handling of animals for anesthesia was sufficient to internalize NK1r in the 5-HT neurons. As internalization of many G-protein-coupled neuropeptide receptors has been shown to depend on their dimerization (e.g., Wirz et al., 2005), internalization of NK1r in 5-HT neurons could reflect a dimerized state of NK1 receptors in these cells.

It is probable that the intracellular localization of NK1r in 5-HT, but not non 5 HT DRN neurons, depends on the existence of different transduction pathways for NK1r. Differential trafficking of NK1r has already been reported in dopamine (DA) versus non-DA neurons of rat ventral tegmental area (Lessard and Pickel, 2005). Gq or Gs-coupled NK1r constructs transfected in COS-7 cells have already been shown to result in distinct pharmacological properties of the receptor, including affinity for agonists and second messenger turnover (Holst et al., 2001). Differences in transduction pathways have also been proposed to account for the internalization of 5-HT_{1A} receptors located on DRN 5-HT neurons (autoreceptors), as opposed to those of hippocampal non 5-HT neurons (heteroreceptors), after acute pharmacological treatment with the specific agonist 8-OH-DPAT or with a 5-HT reuptake inhibitor (Riad et al., 2001, 2004). The greater proportion of NK1r associated with the plasma membrane of DRN 5-HT neurons in mouse versus rat could similarly reflect an interspecific difference in the cellular mechanisms accounting for the trafficking of NK1r in the 5-HT neurons.

Concluding remarks

Several mechanisms have been proposed through which NK1 antagonists might affect the firing rate of DRN 5-HT neurons, such as blockade of SP effects on noradrenaline neurons in the locus coeruleus (Blier et al., 2004) and/or enkephalinergic neurons in the PAG, as well as on glutamate neurons within the DRN, which have all been shown to innervate the DRN and notably its 5-HT neurons (Baraban and Aghajanian, 1981; Commons and Valentino 2002; Liu et al., 2002; Commons et al., 2005). The antidepressant properties of NK1r antagonists may thus involve a combination of direct and indirect effects on the activity of DRN 5-HT neurons. In view of the existence of a significant

population of DRN 5-HT neurons endowed with NK1r receptors in both mouse and rat, it also appears likely that these neurons participate in the presumptive role of SP in mood regulation.

REFERENCES

- Ardelt, A.A., Karpitsky, V.V., Krause, J.E., Roth, K.A. (1996) The neostriatal mosaic: basis for the changing distribution of neurokinin-1 receptor immunoreactivity during development. *J. Comp. Neurol.*, **376**, 463-475.
- Baker, K.G., Halliday, G.M., Hornung, J.P., Geffen, L.B., Cotton, R.G., Tork, I. (1991) Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*, **42**, 757-775.
- Baraban, J.M., Aghajanian, G.K. (1981) Noradrenergic innervation of serotonin neurons in the dorsal raphe: Demonstration by electron microscopic autoradiography. *Brain Res.*, **204**, 1-11.
- Barbaresi, P. (1998) Immunocytochemical localization of substance P receptor in rat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopy study. *J. Comp. Neurol.*, **398**, 473-490.
- Björklund, A., Emson, P.C., Gilbert, R.F., Skagerberg, G. (1979) Further evidence for the possible coexistence of 5 hydroxytryptamine and substance P in medullary raphe neurones of rat brain. *Brit. J. Pharmacol.*, **66**, 112P-113P.
- Blier, P., Gobbi, G., Haddjeri, N., Santarelli, L., Mathew, G., Hen, R. (2004) Impact of substance P receptor antagonism on the serotonin and norepinephrin systems: relevance to the antidepressant/anxiolytic response. *J. Psychiatry Neurosci.*, **29**, 208-218.
- Bondy, B., Baghai, T.C., Minov, C., Schüle, C., Schwartz, M.J., Zwanzger, P., Rupprecht, R., Möller, H.J. (2002) Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results. *Biol. Psychiatry*, **53**, 538-542.
- Chan-Palay, V., Jonsson, G., Palay, S.L. (1978) Serotonin and substance P coexist in neurons of the rat's central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1582-1586.
- Charara, A., Parent, A. (1998) Chemoarchitecture of the primate dorsal raphe nucleus. *J. Chem. Neuroanat.*, **15**, 111-127.

- Commons, K.G., Valentino, R.J. (2002) Cellular basis for the effects of substance P in the periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus. *J. Comp. Neurol.*, **447**, 82-97.
- Commons, K.G., Beck, S.G., Bey, V.W. (2005) Two populations of glutamatergic axons in the rat dorsal raphe nucleus defined by the vesicular glutamate transporters 1 and 2. *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 1577-1586.
- Conley, R.K., Cumberbatch, M.J., Mason, G.S., Williamson, D.J., Harrison, T., Locker, K., Swain, C., Maubach, K., O'Donnell, R., Rigby, M., Hewson, L., Smith, D., Rupniak, N.M.J. (2002) Substance P (neurokinin 1) receptor antagonists enhance dorsal raphe neuronal activity. *J. Neurosci.*, **22**, 7730-7736.
- Cuello, A.C., Kanazawa, I. (1978) The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, **178**, 129-156.
- Cuello, A.C., Galfré, G., Milstein, C. (1979) Detection of substance P in the central nervous system by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3532-3536.
- David, D.J., Froger, N., Guiard, B., Przybylski, C., Jegou, G., Boni, C., Hunt, S.P., De Felipe, C., Hamon, M., Jacquot, C., Gardier, A.M., Lanfumey, L. (2004) Serotonin transporter in substance P (neurokinin 1) receptor knock-out mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **492**, 41-48.
- Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S., Beaudet, A. (1982) The serotonin neurons in dorsal raphe nucleus of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J. Comp. Neurol.*, **207**, 239-254.
- Deuschle, M., Sander, P., Herpfer, I., Fiebich, B.L., Heuser, I., Lieb, K. (2005) Substance P in serum and cerebrospinal fluid of depressed patients: No effect of antidepressant treatment. *Psychiatry Res.*, **136**, 1-6.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G. (1997) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, USA.
- Froger, N., Gardier, A.M., Moratalla, R., Alberti, I., Lena, I., Boni, C., De Felipe, C., Rupniak, N.M.J., Hunt, S.P., Jacquot, C., Hamon, M., Lanfumey, L. (2001) 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A} autoreceptor adaptive changes in substance P (neurokinin 1) receptor knock-out mice mimic antidepressant-induced desensitization. *J. Neurosci.*, **21**, 8188-8197.

- Guiard, B.P., Przybylski, C., Guiloux, J.P., Seif, I., Froger, N., De Felipe C., Hunt, S.P., Lafumey, L., Gardierr, A.M. (2004) Blockade of substance P (neurokinin 1) receptors enhances extracellular serotonin when combined with a selective serotonin reuptake inhibitor: an *in vivo* microdialysis study in mice. *J. Neurochem.*, **89**, 54-63.
- Haddjeri, N., Blier, P. (2001) Sustained blockade of neurokinin-1 receptors enhances serotonin neurotransmission. *Biol. Psychiatry*, **50**, 191-199.
- Haycock, J.W., Kumer, S.C., Lewis, D.A., Vrana, K.E., Stockmeier, C.A. (2002) A monoclonal antibody to tryptophan hydroxylase: applications and identification of the epitope. *J. Neurosci. Meth.*, **114**, 205-212.
- Herpfer, I., Lieb, K. (2003) Substance P and substance P receptor antagonists in the pathogenesis and treatment of affective disorders. *World J. Biol. Psychiatry*, **4**, 56-63.
- Hökfelt, T., Ljungdahl, A., Steinbusch, H., Verhofstad, A., Nilsson, G., Brodin, E., Pernow, B., Goldstein M (1978) Immunohistochemical evidence of substance P-like immunoreactivity in some 5-hydroxytryptamine-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience*, **3**, 517-538.
- Holst, B., Hastrup, H., Raffetseder, U., Martini, L., Schwartz, T.W. (2001) Two active molecular phenotypes of the tachykinin NK1 receptor revealed by G-protein fusions and mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **276**, 19793-19799.
- Kelly, L.R, Jianli, LI., Breckinridge Carden, W., Bickford M.E. (2003) Ultrastructure and synaptic targets of tectothalamic terminals in the cat lateral posterior Nucleus. *J Comp Neurol*, **464**, 472-486.
- Kramer, M.S., Cutler, N., Feighner, J., Shrivastava, R., Carman, J., Sramek, J.J., Reines, S.A., Liu, G., Snavely, D., Wyatt-Lnowles, Hale, J.J., Mills, S.G., MacCoss, M., Swain, C.J., Harrison, T., Hill, R.G., Hefti, F., Scolnick, E.M., Cascieri, M.A., Chichi, G.G., Sadowski, S., Williams, A.R., Hewson, L., Smith, D., Carlson, E.J., Hargreaves, R.J., Rupniak, N.M.J. (1998) Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science*, **281**, 1640-1645.
- Léger, L., Gay, N., Cespuglio, R. (2002) Neurokinin NK1- and NK3-immunoreactive neurons in serotonergic cell groups in the rat brain. *Neurosci. Lett.*, **323**, 146-150.

- Le Poul, E., Laaris, N., Doucet, E., Laporte, A.M., Hamon, M., Lanfumey, L. (1995) Early desensitization of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.*, **352**, 141-148.
- Le Poul, E., Boni, C., Hanoun, N., Laporte, A.M., Laaris, N., Chauveau, J., Hamon, M., Lanfumey, L. (2000) Differential adaptation of brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology*, **39**, 110-122.
- Lessard, A., Pickel, V.M (2005) Subcellular distribution and plasticity of neurokinin-1 receptors in the rat substantia nigra and ventral tegmental area. *Neuroscience*, **135**, 1309-1323.
- Liu, R., Ding, Y., Aghajanian, G.K. (2002) Neurokinins activate local glutamatergic inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology*, **27**, 329-340.
- Liu, H., Brown, J.L., Jasmin, L., Maggio, J.E., Vigna, S.R., Mantyh, P.W., Basbaum, A.I. (1994) Synaptic relationship between substance P and the substance P receptor: Light and electron microscopic characterization of the mismatch between neuropeptides and their receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91**, 1009-1013.
- Ljungdahl, A., Hökfelt, T., Nilsson, G. (1978) Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat – I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience*, **3**, 861-943.
- Ma, Q.P., Bleasdale, C. (2002) Modulation of brain monoamines and γ -aminobutyric acid by NK1 receptors in rats. *NeuroReport*, **13**, 1809-1812.
- Maeno, H., Kiyama, H., Tohyama, M. (1993) Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. *Mol. Brain Res.*, **18**, 43–58.
- Mantyh, P.W. (1995) Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: Substance P-evoked internalization of its receptor in the rat striatum in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2622-2626.
- Middlemiss, D.N., Price, G.W., Watson, J.M. (2002) Serotonergic targets in depression. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2**, 18-22.

- Neckers, L.M., Schwartz, J.P., Wyatt, R.J., Speciale, S.G. (1979) Substance P afferents from the habenula innervate the dorsal raphe nucleus. *Exp. Brain. Res.*, **37**, 619-623.
- Nattie, E.E., Li, A., Richerson, G., Lappi, D.A. (2004) Medullary serotonergic neurones and adjacent neurons that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. *J. Physiol.*, **556**, 235-253.
- Otsuka, M., Yoshioka, K. (1993) Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.*, **73**, 229-308.
- Paxinos, G., Watson, C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Sydney: Academic Press, USA.
- Reisine TD, Soubrie P, Artaud F, Glowinski J (1982) Involvement of lateral habenula-dorsal raphe nucleus neurons in the differential regulation of striatal and nigral serotonergic transmission in cats. *J Neurosci* 2:1062-1071.
- Riad, M., Garcia, S., Watkins, K.C., Jodoin, N., Doucet, E., Langlois, X., El Mestikawy, S., Hamon, M., Descarries, L. (2000) Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **417**, 181-194.
- Riad, M., Watkins, K.C., Doucet, E., Hamon, M., Descarries, L. (2001) Agonist-induced internalization of serotonin-1A receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J. Neurosci.*, **21**, 8378-8386.
- Riad, M., Zimmer, L., Rbah, L., Watkins, K.C., Hamon, M., Descarries, L. (2004) Acute treatment with antidepressant fluoxetine internalizes 5-HT_{1A} autoreceptors and reduces the in vivo binding of the PET radioligand [¹⁸F] MPPF in the dorsal raphe nucleus of rat. *J. Neurosci.*, **24**, 5420-5426.
- Ribeiro-Da-Silva, A., McLeod, A.L., Krause, J.E. (2000) *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Quirion R, Björklund A, Hökfelt T (eds), *Neurokinin receptors in the CNS*. Vol. 16: Peptide Receptors, Part 1, 195-240.
- Rupniak, N.M.J., Kramer, M.S. (1999) Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**, 485-490.

- Saffroy, M., Beaujouan, J.C., Petite, F., Torrens, Y., Glowinski, J. (1994) Differential localization of ^3H -[Pro9]SP binding sites in the guinea pig and rat brain. *Brain Res.*, **633**, 317–325.
- Santarelli, L., Gobbi, G., Debs, P.C., Sibille, E.L., Blier, P., Hen, R., Heath, M.J.S. (2001) Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1912-1917.
- Sergeyev, V., Hökfelt, T., Hurd, Y. (1999) Serotonin and substance P co-exist in dorsal raphe neurons of the human brain. *NeuroReport*, **10**, 3967–3970.
- Shirayama, Y., Mitsushio, H., Takashima, M., Ichikawa, H., Takahashi, K. (1996) Reduction of substance P after chronic antidepressant treatment in the striatum, substantia nigra and amygdala of the rat. *Brain Res.*, **739**, 70-78.
- Smith, D.W., Hewson, L., Fuller, P., Williams, A.R., Wheeldon, A., Rupniak, N.M. (1999) The substance P antagonist L-760,735 inhibits stress-induced NK(1) receptor internalisation in the basolateral amygdala. *Brain Res.*, **848**, 90-95.
- Steinbusch, H.W.M., Nieuwenhuys, R., Verhofstad, A.A.J., Van Der Kooy, D. (1981) The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. A combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study. *J. Physiol. (Paris)*, **77**, 157-174.
- Valentino, R.J., Bey, V., Pernar, L., Commons, K.G. (2003) Substance P acts through local circuits within the rat dorsal raphe nucleus to alter serotonergic neuronal activity. *J. Neurosci.*, **23**, 7155-7159.
- VanderHorst, V.G.J.M., Ulfhake, B. (2006) The organization of the brainstem and spinal cord of the mouse: Relationships between monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems. *J. Chem. Neuroanat.*, **31**, 2-36.
- Vertes, R.P. (1991) A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **313**, 643-668.
- Vertes, R.P., Kocsis, B. (1994) Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **340**, 11-26.

Wirz, S.A., Davis, C.N., Lu, X., Zal, T., Bartfai, T. (2005) Homodimerization and internalization of galanin type 1 receptor in living CHO cells. *Neuropeptides*, **39**, 535-546.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Low power photomicrographs of the dorsal mesencephalon from a wild-type (WT) versus a NK1r knock-out mouse (KO), demonstrating the total absence of NK1r labeling in the NK1r KO. Sections simultaneously processed for NK1r immunocytochemistry with the immunoperoxidase technique. Scale bar: 0.5 mm.

Figure 2. Distribution of TpOH (**A-C; G-I**) and NK1r (**D-F; J-L**) immunoreactive neurons in rat and mouse mesencephalon, with emphasis on the dorsal raphe nucleus (DRN). Parasagittal sections at low magnification (**A,D** and **G,J**) provide an overview of the immunolabeling, and vertical dashed lines indicate the two anatomical levels at which the rostral (**B,E,H,K**) and caudal (**C,F,I,L**) parts of DRN were examined (mlf, medial longitudinal fasciculus; MRN, median raphe nucleus; IPR, rostral interpeduncular nucleus; IPC, caudal interpeduncular nucleus; 3, oculomotor nucleus; DTg, dorsal tegmental nucleus). The transverse sections at higher magnification illustrate the distribution of the TpOH (**B,C,H,I**) and NK1r (**E,F,K,L**) immunoreactive neurons in DRN at both levels (Aq, aqueduct; dm, dorsomedial; vm, ventromedial). The boxed area in **B** and **H** correspond to the ventromedial region of DRN examined by electron microscopy and illustrated in Fig. 3. Scale bars: 0.5 mm.

Figure 3. Comparative distribution of TpOH, NK1r and SP immunoreactivity in the rostral and caudal parts of rat and mouse ventral DRN after single immunoperoxidase labeling. Note how the punctate pattern of SP labeling matches the distribution of NK1r immunoreactivity in both species and both the rostral and caudal parts of the nucleus. Same sections as in Fig. 2 for TpOH and NK1r. Scale bar: 100 μ m.

Figure 4. Distinct and combined visualization of both TpOH and NK1r immunoreactivity in the ventral DRN of rat (rostral and caudal parts) by immunofluorescence and confocal microscopy. The cellular pattern of TpOH labeling is identical to that after immunoperoxidase labeling in both parts of the nucleus. In contrast, the cell bodies endowed with NK1r receptor stand out more prominently after immunofluorescence than immunoperoxidase labeling. After merge of the two pictures, it is apparent that singly NK1r-labeled (arrowheads in NK1) and doubly labeled neurons (* in Merge) are present in

both rostral and dorsal parts of the ventral NRD, and that the NK1r/TpOH-labeled neurons are more numerous in its caudal than rostral part. Scale bars: 50 μm .

Figure 5. Electron micrographs illustrating the cellular and subcellular distribution of TpOH and NK1r immunolabeling in singly (**A-F**) and doubly (**G-I**) labeled material from rat ventromedial DRN. All pictures are from the caudal DRN, except **E** and **G** (rostral DRN). **A-C**: TpOH immunoreactivity. In **A**, a cell body (N in nucleus) and numerous small dendritic branches in the surrounding neuropil (e.g., small arrows) display TpOH, DAB immunolabeling. **B**: A TpOH (DAB-immunolabeled) dendrite is seen in synaptic contact (between small arrow) with an immunonegative (unidentified) axon terminal (at). **C**: This large TpOH-positive dendrite, immunolabeled with gold, displays silver-intensified particles mostly located in its cytoplasm, and only few on its plasma membrane. **D-F**: NK1r immunogold labeling. **D**: Three dendritic profiles (D1-D3) exhibit NK1r immunoreactivity mostly located in their cytoplasm. Note the two synaptic contacts (between small arrows) on D3. **E**: Contrary to the previous, this dendritic profile displays NK1r immunoreactivity solely on its plasma membrane. As in all dendrites showing such labeling (e.g., * in F,H,I and in Fig. 4B), the receptor is found on non synaptic portions of the plasma membrane. In **F**, the two types of dendritic profiles are observed close to one another: the one on top with all but one of its immunogold particles in the cytoplasm; the one below, with all particles on its membrane. **G-I**: Double NK1r (gold)-TpOH (DAB) immunolabeling. In **G**, three TpOH immunoreactive dendrites from rostral DRN are visible, none of which displays NK1r receptor (immunogold labeling). **H**: Two nearby dendrites are seen: the top one is TpOH-positive and displays gold particles (NK1r) mostly located in its cytoplasm; the lower one is TpOH-negative and all its immunogold particles (NK1r) are located on or near its plasma membrane. **I**: Again, in the same field, part of a TpOH-positive cell body also showing NK1r in its cytoplasm, lies next to a TpOH-negative dendrite showing NK1r almost exclusively on its plasma membrane. All scale bars: 1 μm .

Figure 6. Electron micrographs illustrating the cellular and subcellular distribution of TpOH and NK1r immunolabeling in singly (**A,B**) and doubly (**C-F**) labeled material from mouse ventromedial DRN. All pictures except **C** and **D** are from the caudal DRN. **A,B** : Examples of TpOH- (**A**) or NK1r positive (**B**) dendrites. Note the plasma membrane localization of the NK1r immunogold labeling in **B**. **C-F**: Doubly and singly labeled

dendrites are found in both the rostral (**C,D**) and caudal (**E,F**) parts of DRN. In **C**, one of two TpOH-positive dendrites (DAB-labeled) displays NK1r (gold-labeled) on its plasma membrane. **D-F**: Numerous TpOH-positive dendrites (DAB-labeled), endowed or not with NK1r are visible (gold-labeled). All those that are doubly labeled show immunogold particles (NK1r) that are mostly cytoplasmic, but also seen on or near their plasma membrane, less infrequently than in rat. All scale bars: 1 μm .

Figure 7. Frequency distribution histograms of the number of unlabeled, TpOH-labeled, NK1r-labeled and doubly labeled (TpOH-NK1r) dendrites in the rostral (R) and caudal (C) parts of rat and mouse DRN. Means \pm SEM from five rats and four mice, for 10 500 μm^2 of tissue per animal. See Materials and Methods for details. The inserts show the proportion (%) of TpOH positive dendrites that were also NK1r positive. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.005$; * $p < 0.05$ by unpaired Student's *t*-test.

Figure 8. Comparison of the relative frequency with which NK1r labeling was associated with the plasma membrane in dendrites from rat and mouse DRN (rostral and caudal parts) also immunoreactive (TpOH/NK1) or not (NK1) for TpOH. Mean \pm SEM in doubly labeled material from five rats and four mice. As explained in Materials and Methods, association with the plasma membrane was expressed in percent of total number of gold particles in dendrites. *** $p < 0.001$ by unpaired Student's *t*-test.

Acknowledgements

This study was supported by grant MOP-3544 from the Canadian Institutes for Health Research to L.D. B.L. holds studentships from the Groupe de recherche sur le système nerveux central (GRSNC) and the Faculté des études supérieures of the Université de Montréal. The authors also thank Michel Lauzon, Jean Léveillé and Kenneth C. Watkins, for technical assistance.

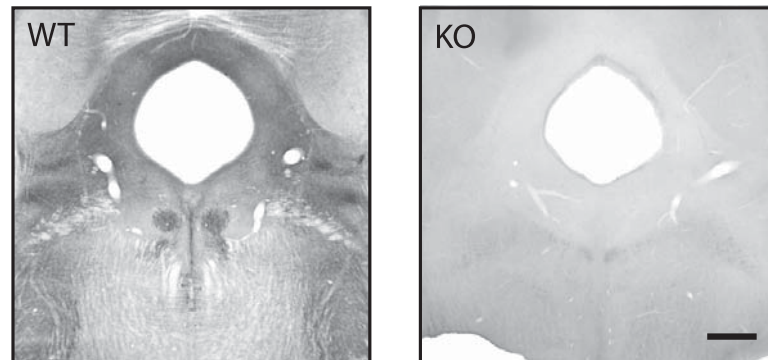
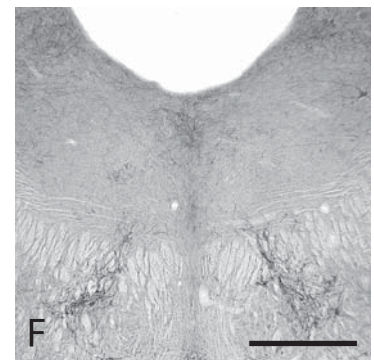
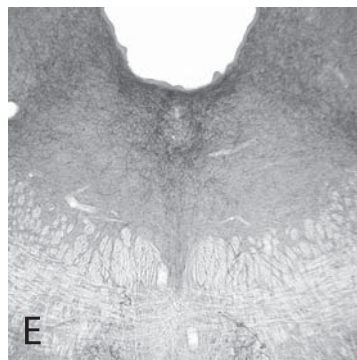
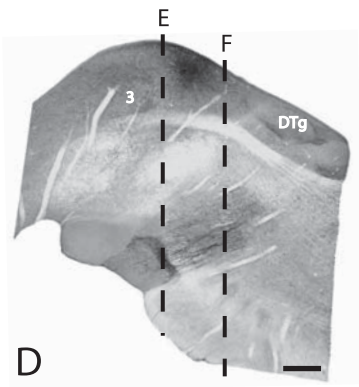
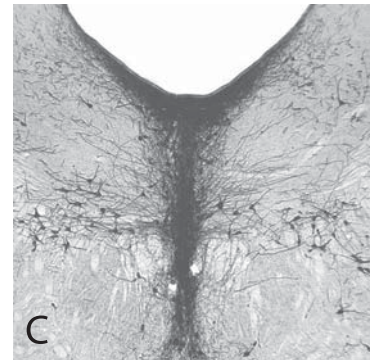
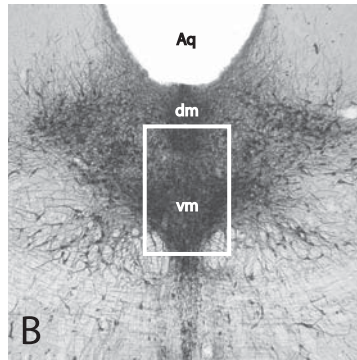
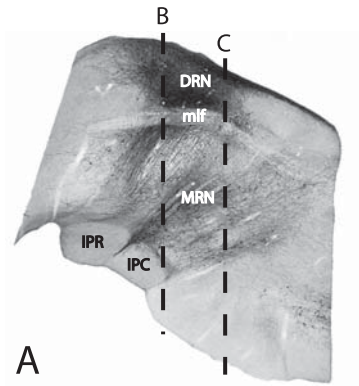


FIGURE 1 : Low power photomicrographs of the dorsal mesencephalon from a wild-type (WT) versus a NK1r knock-out mouse (KO).

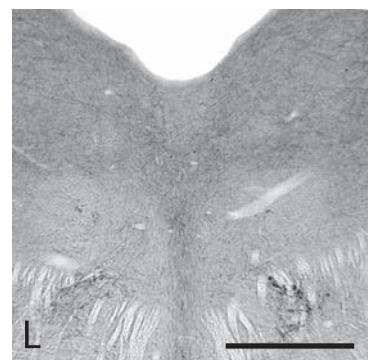
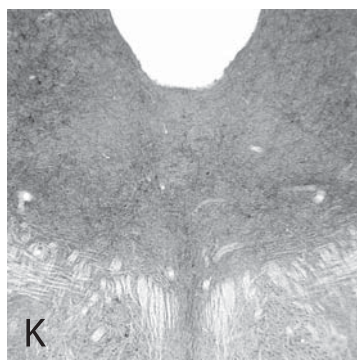
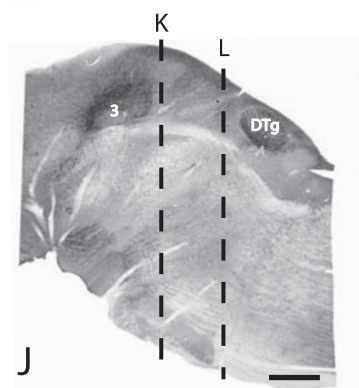
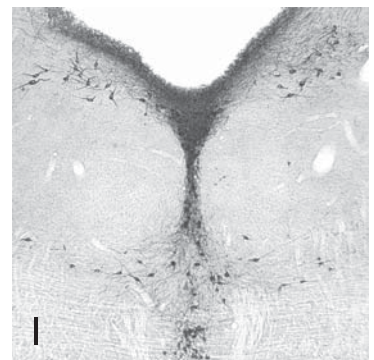
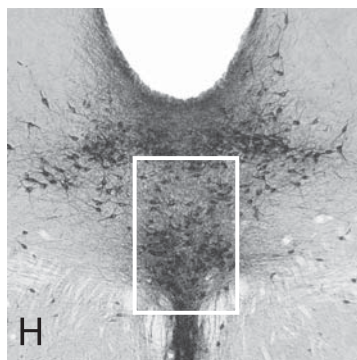
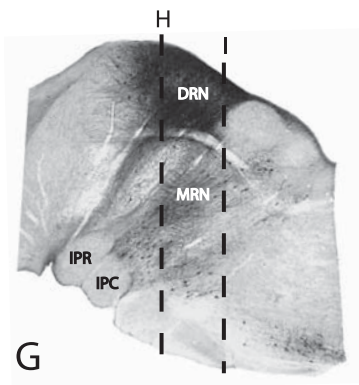
Page suivante :

FIGURE 2 : Distribution of TpOH and NK1r immunoreactive neurons in rat and mouse mesencephalon, with emphasis on the dorsal raphe nucleus (DRN).

RAT



MOUSE



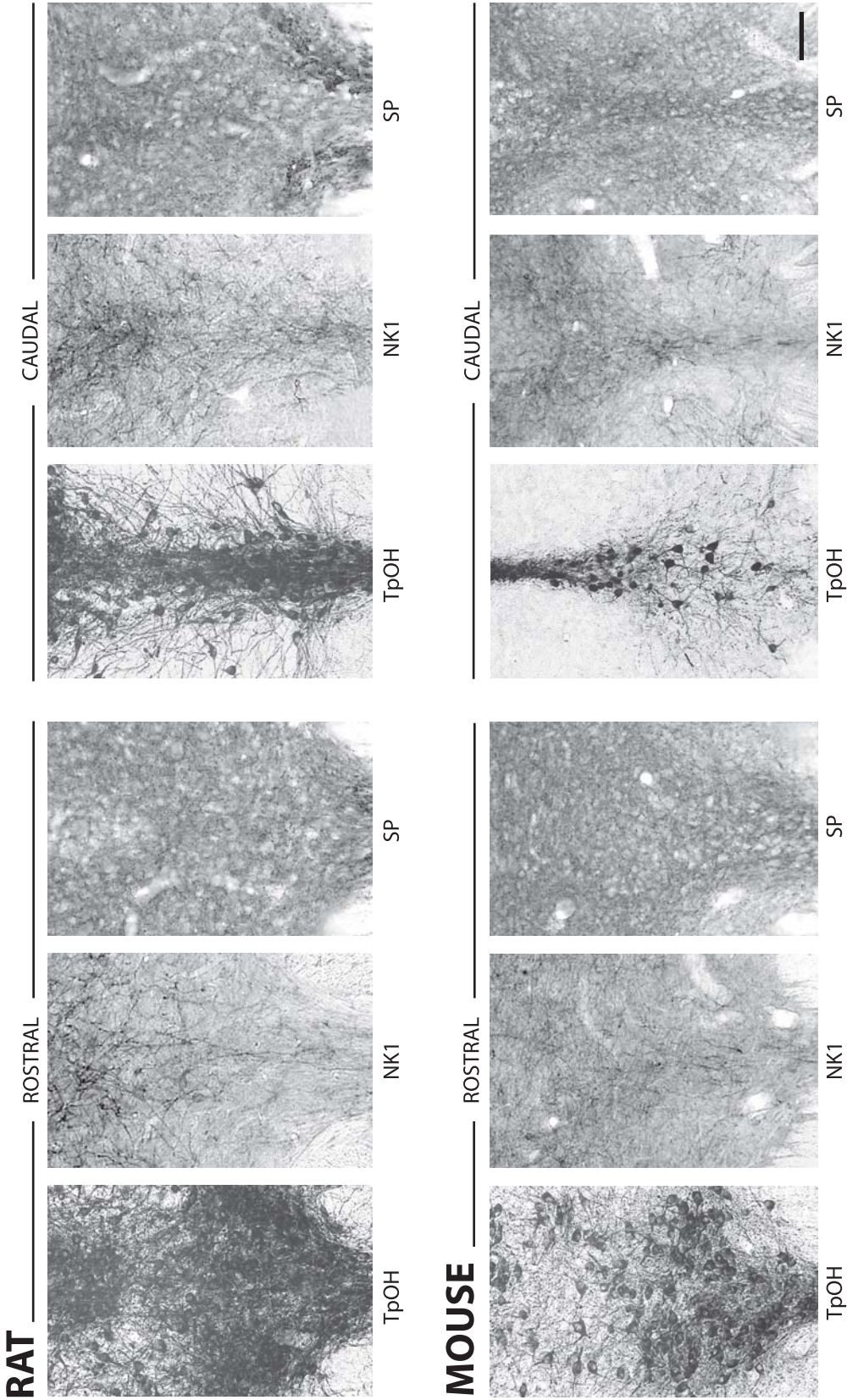


FIGURE 3 : Comparative distribution of TpOH, NK1r and SP immunoreactivity in the rostral and caudal parts of rat and mouse ventral DRN.

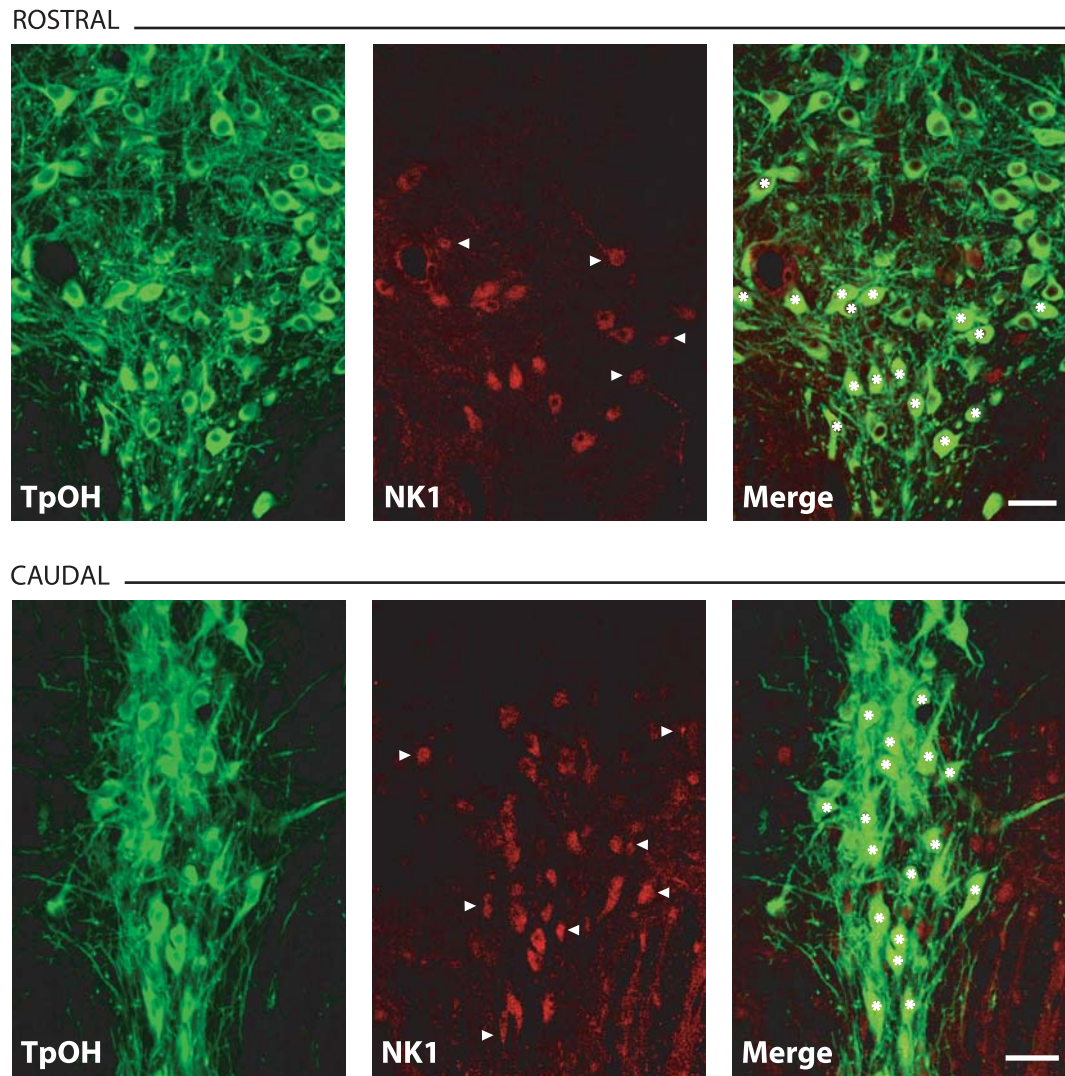


FIGURE 4 : Distinct and combined visualization of both TpOH and NK1r immunoreactivity in the ventral DRN of rat by immunofluorescence and confocal microscopy.

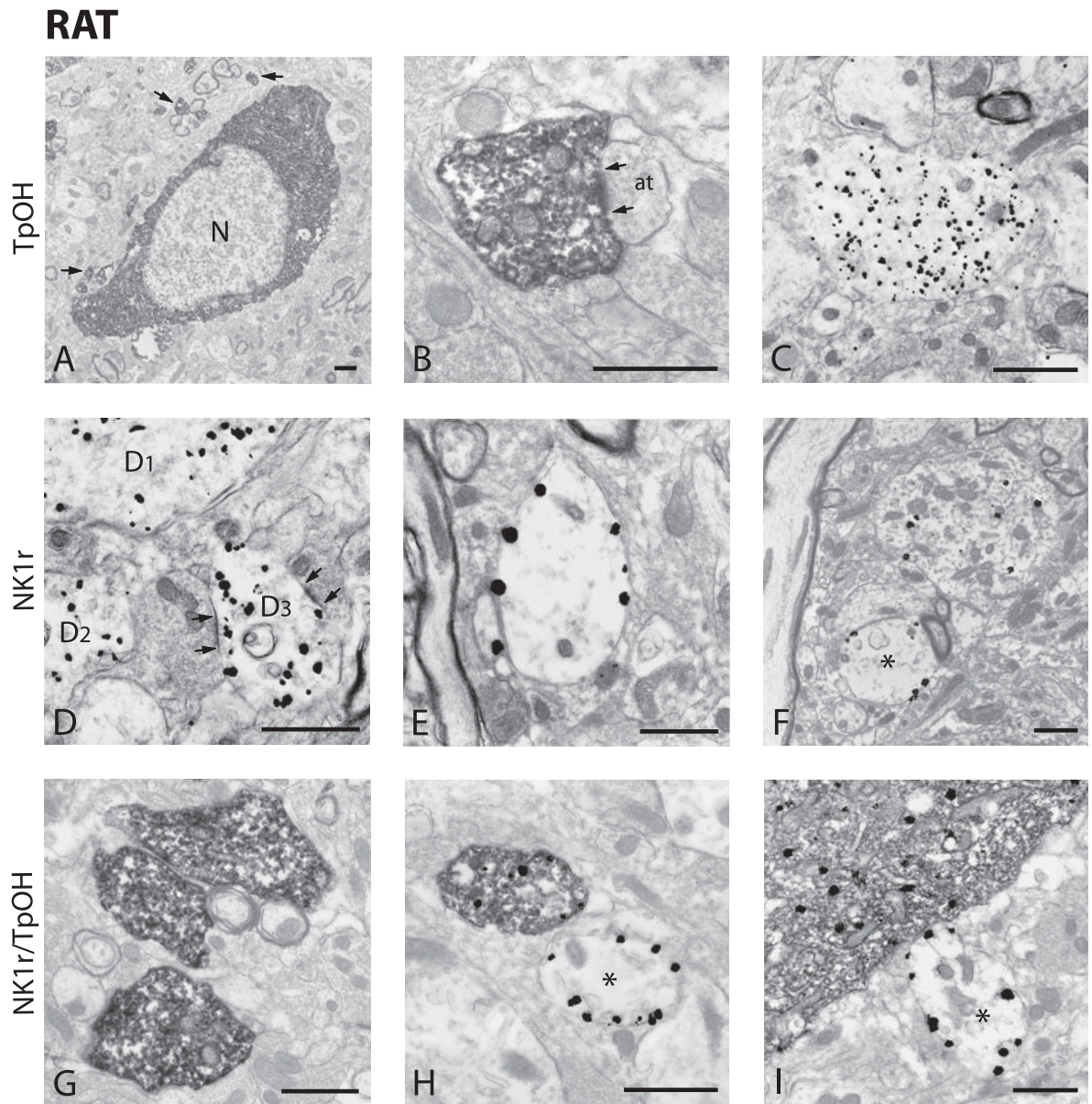


FIGURE 5 : Electron micrographs illustrating the cellular and subcellular distribution of TpOH and NK1r immunolabeling in singly and doubly labeled material from rat ventromedial DRN.

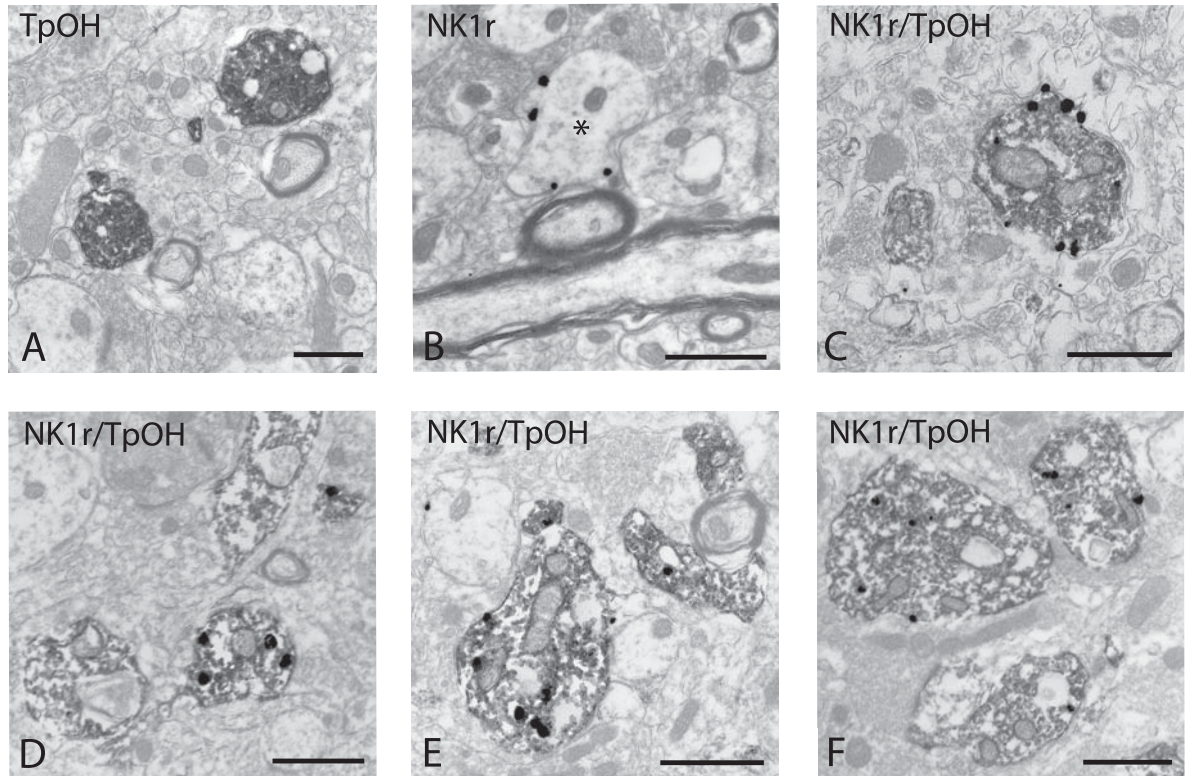
MOUSE

FIGURE 6 : Electron micrographs illustrating the cellular and subcellular distribution of TpOH and NK1r immunolabeling in singly and doubly labeled material from mouse ventromedial DRN.

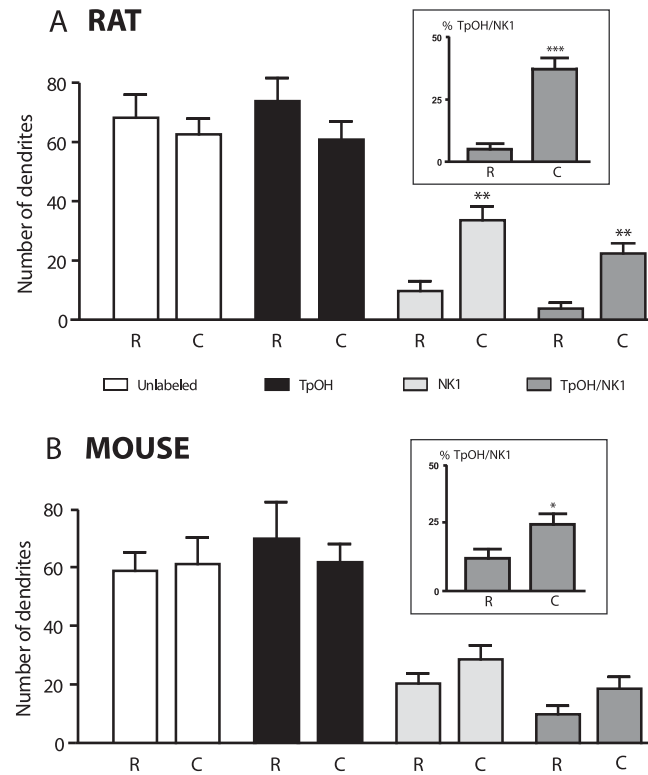


FIGURE 7 : Frequency distribution histograms of the number of unlabeled, TpOH-labeled, NK1r- labeled and doubly labeled (TpOH-NK1r) dendrites in the rostral and caudal parts of rat and mouse DRN.

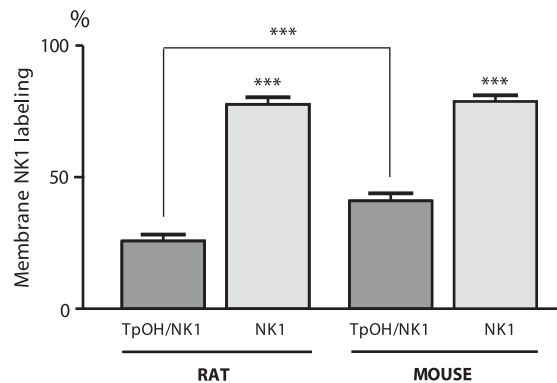


FIGURE 8 : Comparison of the relative frequency with which NK1r labeling was associated with the plasma membrane in dendrites from rat and mouse DRN also immunoreactive or not for TpOH

Deuxième article :

**TRAFFICKING OF NEUROKININ-1 RECEPTORS IN SEROTONIN
NEURONS IS CONTROLLED BY SUBSTANCE P
WITHIN THE RAT DORSAL RAPHE NUCLEUS**

Publié en 2009

dans :

The European Journal of Neuroscience 29:2303-2314

**(Baptiste LACOSTE, Mustapha RIAD, Marc-Olivier RATTÉ, Sandra M. BOYE,
Daniel LÉVESQUE et Laurent DESCARRIES)**

Trafficking of Neurokinin-1 Receptors in Serotonin Neurons is Controlled by Substance P Within the Rat Dorsal Raphe Nucleus

Baptiste LACOSTE ¹, Mustapha RIAD ¹, Marc-Olivier RATTÉ ⁴, Sandra M. BOYE ^{5,6},
Daniel LÉVESQUE ⁴, and Laurent DESCARRIES ^{1,2,3Ψ}

Departments of Pathology and Cell Biology¹ and of Physiology², Groupe de recherche sur le système nerveux central (GRSNC)³ and Department of Psychiatry⁵, Faculty of Medicine; Université de Montréal; Faculty of Pharmacy⁴, Université de Montréal; Centre de Recherche Fernand-Seguin⁶, Hôpital Louis-H. Lafontaine; Montreal, Quebec, Canada

ΨCorresponding author:

Laurent DESCARRIES, M.D.
Department of Pathology and Cell Biology
Faculty of Medicine, Université de Montréal,
2900 Blvd. Édouard-Montpetit,
Montreal (QC), Canada H3T1J4.

Running title: Trafficking of NK1rs in rat DRN

Text pages: 35; Figures: 6; Tables: 1

Words in Manuscript: 9831; in Abstract: 243; in Introduction: 487

Keywords: RP67580, deafferentation, habenula, immunocytochemistry, *in situ* hybridization

Abstract - Substance P modulates serotonin neurotransmission via neurokinin-1 receptors (NK1rs), and exerts regulatory effects on mood through habenular afferents to the dorsal raphe nucleus (DRN). We have previously demonstrated that, in the caudal DRN of rat, some serotonin neurons are endowed with NK1rs that are mostly cytoplasmic, whereas these receptors are mostly membrane bound in non serotonin neurons. Here, we first examined by double labeling immunocytochemistry the relationships between substance P axon terminals and these two categories of DRN neurons. Almost half of substance P terminals were synaptic, and many were in close contact with serotonin dendrites, but never with non serotonin dendrites. In additional double immunolabeling experiments, most if not all dendrites bearing membranous NK1rs appeared to be GABAergic. Treatment with the selective neurokinin-1 antagonist RP67580 modified the subcellular distribution of NK1rs in serotonin neurons. One hour after administration of a single dose, the receptor distribution was unchanged in both dendritic types, but after daily administration for 7 or 21 days, the plasma membrane as well as cytoplasmic density of NK1rs were increased in serotonin dendrites, without any change in non serotonin dendrites. These treatments also increased NK1r gene expression in the caudal DRN. Lastly, a marked increase in the membrane (but not cytoplasmic) density of NK1rs was measured in serotonin dendrites after bilateral habenular lesion. These results altogether suggest that the trafficking of NK1rs represents a cellular mechanism in control of the modulation of serotonin neuron activity by substance P in DRN.

INTRODUCTION

Beside their well established role in pain processing, substance P (SP) and its preferred receptor neurokinin-1 (NK1r) have been implicated in the regulation of mood (reviewed in Herpfer & Lieb, 2003; Ebner & Singewald, 2006), to which the SP projection from lateral habenula to dorsal raphe nucleus (DRN) (Neckers *et al.*, 1979) is likely to contribute. The DRN indeed contains a large population of serotonin (5-hydroxytryptamin, 5-HT) neurons involved in mood regulation (for review, see Piñeyro & Blier, 1999; Middlemiss *et al.*, 2002) via their projections to key limbic brain regions such as the hippocampus. The SP innervation of DRN is relatively dense, particularly in its ventromedial, caudal portion

(Cuello & Kanazawa, 1978; Ljungdahl *et al.*, 1978; Lacoste *et al.*, 2006). The DRN is also rich in NK1r mRNA and protein (Maeno *et al.*, 1993; Saffroy *et al.*, 1994; Vigna *et al.*, 1994), and pharmacological blockade (antagonists) or genetic disruption (knock-out, KO) of NK1r function have both been shown to modulate 5-HT neurotransmission (Froger *et al.*, 2001; Santarelli *et al.*, 2001; Ebner *et al.*, 2008; Haddjeri & Blier, 2008). Moreover, the antidepressant effects of selective 5-HT reuptake inhibitors have been shown to be potentiated by the co-administration of an NK1r antagonist (Guiard *et al.*, 2004; Gobert *et al.*, 2008).

Other studies reveal interactions between the SP and 5-HT systems within the DRN that may be important for mood processing. For instance, SP microinjection into the DRN decreases 5-HT release in the hippocampus (Gradin *et al.*, 1992), whereas systemic injection of the NK1r antagonist L-760,735 increases the electrical activity of DRN 5-HT neurons (Conley *et al.*, 2002). Furthermore, caudal DRN 5-HT neurons are selectively activated by uncontrollable stressors (Maier *et al.*, 1993; Grahn *et al.*, 1999), and enhanced 5-HT release in target regions of the caudal DRN appears essential for behavioral responsiveness to stress and anxiety (Maier *et al.*, 1995). Accordingly, bilateral lesions of the habenular nuclei have been shown to modify these behavioral responses (Murphy *et al.*, 1996; Amat *et al.*, 2001).

We recently demonstrated, in rat and mouse, the existence of NK1r in a subpopulation of 5-HT neurons mostly located in the caudal half of the DRN (Lacoste *et al.*, 2006). NK1rs were always found mainly in the cytoplasm of these neurons' soma-dendrites, whereas they predominated on the plasma membrane of non 5-HT dendrites. Here, we combined the immunocytochemical demonstration of SP, tryptophan hydroxylase and NK1r within the caudal DRN, and pharmacological treatment with an NK1r antagonist (RP67580) or bilateral habenular lesions, to test the hypothesis of a sustained internalization of NK1r in DRN 5-HT neurons, as the result of a permanent activation of these receptors by SP. Retargeting of the NK1r to the plasma membrane of 5-HT neurons might then be expected after their pharmacological blockade or following SP deafferentation, providing for a fine tuning of the responsiveness of these neurons to SP depending on the strength of the habenular input to DRN.

MATERIAL AND METHODS

Animals. Sixty six adult male Sprague Dawley rats (225-275 g) were purchased from Charles River (St Constant, QC, Canada) and used in strict accordance with the Guide to the Care and Use of Experimental Animals (Ed2) of the Canadian Council on Animal Care. The experimental protocols were approved by the Comité de Déontologie pour l'Expérimentation sur des Animaux at the Université de Montréal, QC.

Single and/or dual immunocytochemical labelings for light, confocal and electron microscopy were carried out *i)* in normal rats, to examine SP terminals in the caudal DRN and characterize their topological relationships with 5-HT and non 5-HT neurons; *ii)* in rats treated with NK1r antagonist RP67580, to examine the subcellular localization of NK1r in the caudal DRN after different schedules of treatment; *iii)* in rats previously subjected to bilateral electrolytic lesions of the habenular complex, to determine the effects of SP denervation on the NK1r subcellular localization in DRN. *In situ* hybridization was also performed to investigate the effects of RP67580 treatment on NK1r gene expression.

RP67580 treatment. The NK1r antagonist RP67580 was purchased from Tocris Bioscience (Ellisville MI, USA). RP67580 is a non peptide perhydroisoindole derivate, highly selective for the NK1r. It is a stable, brain penetrant and powerful inhibitor of SP binding, with a K_i of 4.2 nM (Garret *et al.*, 1992; Laird *et al.*, 1993; Rupniak *et al.*, 1993). Moreover, RP67580 is the most potent NK1r antagonist in rat (Beaujouan *et al.*, 1993).

Four treatment groups were studied, each comprising 5 control rats treated with vehicle solution (20% DMSO in saline), and 6 rats treated with RP67580. Groups 1 and 2: acute treatment (5 mg/kg, i.p.) with 1 h or 7 days survival, respectively. Group 3: subchronic treatment (5 mg/kg i.p., for 7 days), and sacrifice 1 h after the last injection. Group 4: chronic treatment (1 mg/kg daily, for 3 weeks) by subcutaneously implanted osmotic minipumps (Azlet[®] 2ML4 diffusing 2.5 μ l/h), and sacrifice on the 21st day.

Bilateral lesions of the habenula. The protocol for electrolytic lesioning of the habenular nuclei was modified from Morissette & Boye (2008). In animals anesthetized with isoflurane, a stainless steel wire electrode was lowered at stereotaxic flat skull coordinates AP: -3.5, L: \pm -0.6 V: -4.9 (Paxinos & Watson, 1997) and large lesions of the left and right habenula were produced sequentially by passing a direct anodal current of 0.4 mA for 45 sec with a Grass stimulator. Cathodal current was delivered to the tail. Skull was sutured

and the wound washed. Sham (no current; n = 5) and lesioned rats (n = 5) were then paired and housed together for 28 days of recovery. All rats received a first dose of analgesic (Anaphen 5 mg/kg, s.c.) during surgery, and a second dose on the following day.

Immunocytochemistry. Mouse monoclonal anti-tryptophan hydroxylase (TPH) and mouse monoclonal anti- γ -aminobutyric acid (GABA) (clone GB-69) antibodies were purchased from Sigma (Saint Louis, MI), rat monoclonal anti-substance P antibody from Accurate Chemical and Scientific (Westbury, NY), and rabbit polyclonal anti-NK1r antibody was a generous gift from Dr. James E. Krause (Neurogen Corporation, Branford, CT). The characterization and immunocytochemical specificity of these antibodies have already been described elsewhere (TPH: Haycock *et al.*, 2002; GABA: Erdo & Kiss, 1986; Okada, 1986; Erdo & Wolf, 1990; SP: Cuello *et al.*, 1979; Kelly *et al.*, 2003; NK1r: Ardelt *et al.*, 1996; Ribeiro-Da-Silva *et al.*, 2000; Lacoste *et al.*, 2006).

For light and electron microscopic immunocytochemistry, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) and perfused transcatheterially with 3% acrolein in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) (300 ml in 3 min), followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in PB (500 ml in 5 min). The brain was removed, postfixed by immersion in PFA (60 min at 4°C) and washed in phosphate buffered saline (PBS: 0.9% NaCl in 50 mM PB, pH 7.4). Transverse 50 μ m-thick sections of the midbrain were then vibratome-cut in PBS, immersed in 0.1% sodium borohydride at room temperature (22°C) for 30 min, and rinsed in PBS before immunocytochemical processing. For confocal microscopy, primary and post-fixation were carried out with 4% PFA only.

Single immunolabeling of SP for light and electron microscopy (n = 9), was performed as previously described in detail (Lacoste *et al.*, 2006). Primary incubation was in rat anti-SP antibody diluted 1:500 for light microscopy and 1:200 for electron microscopy, and the sections were processed with the immunoperoxidase-diaminobenzidine (DAB) technique in both cases. Light microscopic photomicrographs were taken with a Leitz microscope coupled to a Spot digital camera (Spot v4 for Windows, Diagnostic Instruments). Images were adjusted for framing, brightness, and contrast with Adobe Photoshop. To characterize the fine structural features of SP axon varicosities in the caudal DRN, electron micrographs (Philips CM100, Philips Electronique, St. Laurent, QC) were taken of the first 50 well preserved SP immunoreactive varicosities encountered within a narrow area of thin sections less than 10 μ m away from the tissue-resin border, in

each of 3 normal rats. The film negatives were scanned (Epson Perfection 3200), converted into a positive picture and adjusted for brightness, contrast, and sometimes for sharpness (Adobe Photoshop). In prints at a final magnification of X 24,000, these varicosity profiles were measured for size, the presence and length of synaptic junction was noted, and the synaptic incidence extrapolated from the frequency observed in single section using the formula of Beaudet & Sotelo (1981). This formula considers the varicosities as spheres, and takes into account their average size and length of junctional complexes, as well as the thickness of sections, to predict the probability of seeing a synapse. The synaptic incidence for the whole volume of varicosities is then inferred by comparison with this predicted value.

For double SP and TPH immunofluorescence labeling and confocal microscopy, midbrain sections from three other normal rats were incubated overnight at room temperature with both rat anti-SP (1:200) and mouse anti-TPH (1:1000) antibodies (Jackson ImmunoResearch). After washes in PBS, sections were further incubated for 12 h with a mix of biotinylated goat anti-rat (1:1000) and Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse (1:200) IgGs, and then overnight with a 1:200 dilution of streptavidin-conjugated Alexa Fluor 488. There was no cross reactivity of the secondary antibodies. After rinses in 0.1 M PB and distilled water, sections were mounted in Vectashield medium for fluorescence (Vector), and observed with the Leica TCS-SP1 confocal microscope (magnification from 20x to 100x) using sequential laser analysis with emission intensities of 519 nm (Alexa Fluor-488) and 580 nm (Alexa Fluor-568). Images of 1024 x 1024 pixels were produced with the Leica confocal software (v2.65) and adjusted with the Adobe Photoshop software.

For double electron microscopy immunolabeling of SP and TPH (n = 3), SP and NK1r (n = 4), and GABA and NK1r (n = 3), 48 h incubation with both primary antibodies (1:200 anti-SP + 1:1000 anti-TPH or 1:1000 anti-NK1r; 1:1000 anti-GABA + 1:1000 anti-NK1r), was followed by the labeling of TPH or NK1r with the immunogold technique (Lacoste *et al.*, 2006), and then of SP or GABA with DAB. For immunogold labeling, incubation with primary antibody was followed by incubation overnight at room temperature in goat anti-mouse IgGs conjugated to 1 nm colloidal gold particles (AuroProbe One, Amersham, Oakville, ON) diluted 1:50. The size of immunogold particles was increased by silver enhancement (IntenSE kit, Amersham, Amersham Biosciences) for ~15 min. Sections were then osmicated, dehydrated and flat-embedded in resin. After 48

hours of polymerization at 60°C, the regions of interest were excised from the slides and re-embedded at the tip of resin blocks. Ultrathin sections from these blocks were cut on a ultramicrotome (Reichert Ultracut S, Leica Canada, St. Laurent, QC), collected on bare square-meshed copper grids and stained with lead citrate. Several quantitative analyses were carried out in such doubly-labeled material.

The topological relationships between SP terminals and both types of NK1r-labeled dendrites (5-HT and non 5-HT) were examined in single thin sections. In each rat, fifty 5-HT and fifty non 5-HT dendritic profiles were photographed at a uniform working magnification of 8,900. On prints, the distance between the edge of NK1r-labeled dendrites and that of the nearest SP immunoreactive varicosity was measured manually. When SP terminals were juxtaposed or in synaptic contact with the labeled dendrite, this distance was considered as null. If no SP terminal was visible in the print, it was tabulated as greater than 6 μm (frame of picture).

To document the effect of RP67580 treatment or of bilateral habenular lesion on the subcellular localization of NK1r, electron micrographs of NK1r immunogold-labeled dendrites were obtained from the caudal DRN of 3 control and 3 treated rats from each RP67580 group, as well as from 4 sham controls and 4 successfully-lesioned rats. In each rat, visual counts of silver-intensified immunogold particles were performed on 40 dendrites labeled in the cytoplasm (5-HT) and 20 dendrites labeled on the plasma membrane (non 5-HT), for totals of 1440 dendrites in the RP67580 treatment groups, and 480 dendrites in the lesioned and sham-lesioned rats. Dendritic profiles were considered as immunoreactive when showing an accumulation of at least three silver-intensified immunogold particles. Contacting or multilobe particles were considered as single particles. We counted the number of particles over the whole surface and in direct contact with the plasma membrane and determined the proportion (%) of silver-enhanced gold particles juxtaposed to the plasma membrane as opposed to those within the cytoplasm. The surface and perimeter of each dendrite were then measured to convert the counts in overall density (particles/ μm^2) and plasma membrane density (particles per/ μm) of NK1r labeling. To minimize variations attributable to extraneous variables, and as control tissue was always processed together with experimental tissue, the labeling densities were then expressed as percent of control.

In situ hybridization. Cryostat sections (12 μm -thick) from the midbrain of 2 controls and 3 treated rats from each RP67580 group were processed for *in situ* hybridization as described in Beaudry *et al.* (2000). Specific [^{35}S]UTP-radiolabeled complementary RNA probes were used. The NK1r probe was generated from plasmid vector construct (kindly provided by J.E. Krause, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO) containing complementary DNA fragment of the rat gene (Hershey *et al.*, 1991; Stumm *et al.*, 2001), linearized with restriction enzyme Xba I to generate the antisense complementary RNA. Brain sections were fixed by immersion in 4% PFA (20 min; 4°C). Single-stranded riboprobes were synthesized and labeled using Promega riboprobe kit, ^{35}S -UTP (PerkinElmer, Waltham, MS) and the T₇ RNA polymerase. *In situ* hybridization of riboprobes with tissue sections was performed overnight at 58°C in a standard hybridization buffer. Hybridized sections were apposed to BiomaxMR radioactive sensitive films (Kodak, New Haven, CT) for 15 days of exposure. The regional density of messenger RNA (mRNA) signals was then measured in the caudal DRN and left and right inferior colliculi (IC) with the ImageJ software. These regions were delimited manually, according to their known location and shape (Paxinos and Watson, 1997), on digitized images of the autoradiographs. Optical gray densities were measured, and background subtracted, in 6 midbrain sections for each rat, and converted into nCi per gram of tissue by comparison to radioactivity standards (ARC 146A- ^{14}C ; Amersham, Oakville, ON).

Statistics. All statistical analyses were performed with the Prism 4.0 software (GraphPad, CA). Results were expressed as mean \pm S.E.M. Assumptions of normality and variance homogeneity were satisfied from all data. Unpaired Student's *t* test was used to analyze differences *i*) in dimensions of SP-immunostained varicosites, *ii*) in respective distance of NK1r-labeled dendrites from the nearest SP terminal, and *iii*) in overall, cytoplasmic, and membrane densities of NK1r labeling between sham and lesioned animals. One-way ANOVA followed by the Bonferroni's test was used for *post-hoc* comparisons between RP67580 treatment groups, to analyze differences *i*) in dimensions of NK1r-immunostained dendrites, *ii*) in NK1r labeling densities in both types of NK1r-immunolabeled dendrites, and *iii*) in regional density of NK1r *in situ* hybridization signals within DRN and IC. $P \leq 0.05$ was considered significant (* in figures). Figures were composed with Adobe Illustrator software.

RESULTS

Intimate relationship between SP terminals and 5-hydroxytryptamine neurons within the caudal dorsal raphe nucleus (Figures 1-3)

As described in previous immunocytochemical reports (Cuello & Kanazawa, 1978; Ribeiro-Da-Silva *et al.*, 2000; Lacoste *et al.*, 2006) and verified in the present study, the SP innervation of the rat DRN is relatively dense (Figs. 1A and 6C). As already reported, this punctate immunolabeling predominates in the ventral part of the caudal DRN, particularly along the inner aspects of the medial longitudinal fasciculi (Figs. 1A, 2A, 6C). After dual SP/TPH immunofluorescence labeling for confocal microscopy, SP positive axon terminals may be observed among and sometimes in the immediate vicinity of TPH positive somata and dendrites (Figs. 2A, 2B).

After single immunoperoxidase labeling for electron microscopy, SP immunoreactive axon varicosities were readily identified as relatively large axonal swellings filled with small, round vesicles, and usually one or more mitochondria (Figs. 1C, 1D). The frequency with which these immunoreactive profiles displayed a junctional complex in single thin sections was $18\% \pm 0.02$. On average, SP terminals displaying a synaptic membrane specialization were significantly larger ($0.81 \mu\text{m} \pm 0.03$; Fig. 1C) than their non synaptic counterparts ($0.69 \mu\text{m} \pm 0.02$; Fig. 1D) (Student's $t = 2.41$, $P = 0.02$).

Our previous study had clearly shown that, in the caudal half of the DRN, NK1r are mostly cytoplasmic in 5-HT neurons and plasmalemmal in non 5-HT neurons (Lacoste *et al.*, 2006). In material dually labeled for SP (immunoperoxidase) and NK1r (immunogold), the SP terminals were frequently seen (31%) to be directly apposed or in synaptic contact with 5-HT dendrites bearing cytoplasmic NK1r (Figs. 3A, 3B). This was never the case for non 5-HT dendrites, bearing membranous NK1r (Figs. 3C, 3D). After combined GABA and NK1r immunolabeling, most if not all non 5-HT dendrites appeared to be GABA-immunoreactive (Fig. 3E, 3F). Occasional GABA immunoreactive dendrites without NK1r labeling were also seen.

In material doubly labeled for NK1r and SP, the minimal distance between SP terminals and dendrites endowed with cytoplasmic NK1r was $0.72 \pm 0.17 \mu\text{m}$, whereas it was $3.10 \mu\text{m} \pm 0.17$ or more for dendrites showing mostly plasmalemmal NK1r labeling (Student's $t = 13.6$, $P < 0.001$). When considering separately the SP varicosities in contact with dendrites showing cytoplasmic NK1r labeling (5-HT) as opposed to those located

away from non 5-HT dendrites, the synaptic incidence values in single thin sections were $30\% \pm 2$ and $12\% \pm 0.5$, respectively.

Treatment with RP67580 increases the abundance of NK1r receptors and their plasma membrane density in 5-HT neurons (Figure 4)

Based on our previous (Lacoste *et al.*, 2006) and present results, it was possible to distinguish between the effects of RP67580 treatment on the subcellular distribution of NK1r in 5-HT versus non 5-HT neurons after single NK1r immunogold labeling for electron microscopy. Variations in membrane ($F_{4,10} = 22.8$; $P < 0.001$), overall ($F_{4,10} = 7.9$; $P < 0.05$) and cytoplasmic ($F_{4,10} = 8.6$; $P < 0.05$) NK1r labeling densities were observed among RP67580 treatment groups for 5-HT neurons only.

As illustrated in Fig. 4, individual *post-hoc* comparisons with controls revealed that, one hour after a single injection of RP67580 (5 mg/kg, i.p.), there was a slight, non significant increase (30%) in the overall density of NK1r labeling in 5-HT dendrites, without any change in the density of their plasma membrane labeling. One week after the same unique dose of RP67580, the density of NK1r labeling was significantly increased by 57% in 5-HT dendrites, but again without change in their plasma membrane labeling. After one week of daily administration of the antagonist (5 mg/kg/day, i.p.), the increase in overall density of NK1r labeling in 5-HT dendrites reached 65%. The density of plasma membrane labeling was then increased 2.2 fold and that of the cytoplasm by 63%. After 3 weeks of treatment (1 mg/kg/day, minipump), the overall density of NK1r labeling was increased by 91%, the plasma membrane density 2.8 fold, and the cytoplasmic density by 80%. In every condition, the NK1r labeling of non 5-HT dendrites was unaffected (Fig. 4 and Table 1).

***In situ* hybridization reveals an increase in NK1r gene expression in the caudal DRN after 7 days of RP67580 treatment (Figure 5)**

Increases in NK1r immunolabeling, as we observed after RP67580 treatment, could reflect an increased expression of the encoding gene (e.g. Wan *et al.*, 2006) or a post-transcriptional regulation without concomitant increase in mRNA (e.g. Gazzaley *et al.*, 1996). To decide between these alternatives, we quantified *in situ* hybridization signals in the caudal DRN (and inferior colliculi as a region of reference) of control rats and of rats from RP67580 treatments groups 1, 3, and 4, as described above.

As illustrated in Fig. 5, the distribution of NK1r mRNA in the caudal midbrain was consistent with previous reports (Maeno *et al.*, 1993; Nakaya *et al.*, 1994; Ribeiro-Da-Silva *et al.*, 2000). NK1r hybridization signals were strong in the lateral and dorsal central grey matter, the ventral portion of IC and the cuneiform nuclei, moderate in the dorsal IC, the median raphe nucleus, the ventral tegmental nuclei, the pontine nuclei, and only weak in the DRN.

Variations of *in situ* hybridization signals were observed among RP67580 treatment groups ($F_{3,11} = 7.8$; $P < 0.05$). Individual *post-hoc* comparisons revealed that, one hour after the single dose of RP67580, no change was observed in NK1r mRNA in the caudal DRN compared to controls (58.6 ± 6.0 nCi/g of tissue, versus 57.5 ± 4.0 in controls). However, after one week of daily RP67580 administration, a 53% increase was measured (87.9 ± 9.0 nCi/g), whereas after 3 weeks of treatment, the increase was of 35% of controls (77.6 ± 7.0 nCi/g). Interestingly, NK1r mRNA was significantly decreased in the inferior colliculi after 3 weeks of RP67580 treatment (117.5 ± 3.0 nCi/g versus controls: 138 ± 1.0 ; 1 h-treated: 131.7 ± 7 , and 7 day-treated: 138.2 ± 5.0).

SP deafferentation promotes the targetting of NK1r to the plasma membrane of caudal DRN 5-HT neurons (Figure 6)

The projection pathway from the lateral habenula to DRN provides for at least 60% of the SP innervation in this nucleus (Neckers *et al.*, 1979). To further test our hypothesis that a tonic release of SP might result in the sustained internalization of NK1r within 5-HT neurons, we examined the subcellular distribution of NK1r in these cells following the elimination of this SP projection.

Twenty-eight days after large lesions encompassing both medial and lateral habenula, as well as the fasciculus retroflexus, SP immunoreactive punctae had mostly disappeared from the whole DRN, and notably its caudal half (Figs. 6D, 6F).

As measured by electron microscopy, the overall density of NK1r immunolabeling remained unchanged in caudal DRN 5-HT dendrites from lesioned rats compared to sham controls. However, differences in membrane and cytoplasmic NK1r densities were observed between sham and controls. There was a 59% increase (Student's $t = 3.51$, $P = 0.012$) in the density of their plasma membrane labeling (Figs. 6E, 6F and graphs; see also table 1), with a concomitant lowering ($\sim 50\%$) of their cytoplasmic density (Student's $t = 2.88$, $P = 0.003$). Again, there were no changes in the NK1r labeling of non 5-HT dendrites.

DISCUSSION

Several aspects of the structural and functional relationships between SP, NK1r and 5-HT neurons of the rat DRN were disclosed by the present study, suggesting that the trafficking of neurokinin-1 receptors might represent a cellular mechanism in control of the modulation of serotonin neuron activity by substance P in DRN.

Substance P innervation of the caudal DRN: relationship with 5-HT neurons

An intimate relationship between the SP and 5-HT systems was visualized within the caudal DRN. SP fibers had already been observed in the vicinity of DRN 5-HT neuronal cell bodies by light microscopic immunocytochemistry (Ljungdahl *et al.*, 1978), but this was the first electron microscopic demonstration of the existence of close contacts between these two types of elements.

Several studies had already revealed the presence of NK1r in cellular profiles synaptically contacted by SP terminals, in spinal cord, striatum, and medulla oblongata (McLeod *et al.*, 1998, 1999; Li *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004). Intimate relationships between SP and 5-HT within the DRN could provide for local interactions (see also Commons & Valentino, 2002; Valentino *et al.*, 2003) and account for previous observations such as the increased firing of 5-HT neurons and desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors after chronic treatment with NK1r antagonists or in NK1r KO mice (Froger *et al.*, 2001; Haddjeri & Blier, 2001; Conley *et al.*, 2002; Guiard *et al.*, 2006, 2007).

The frequency with which SP axon terminals displayed a junctional complex in single thin sections (18%) suggested that 41% of these varicosities were synaptic, as extrapolated to their whole volume by the formula of Beaudet & Sotelo (1981) (see Material & Methods). Our measurement of the minimal distance between SP terminals and dendrites in the caudal DRN indicated that the SP innervation was denser around 5-HT than non 5-HT neurons, suggesting that the differential localization of NK1r in these cell types might be determined by the ambient SP concentration. When considering separately the SP varicosities in contact with 5-HT dendrites as opposed to those located away from non 5-HT dendrites, the extrapolated values of synaptic incidence were 80% and 30%, respectively, enhancing the probability of SP release onto these 5-HT neurons.

In transfected cell lines, high and low concentrations of SP have been shown to respectively enhance cytoplasmic sequestration and cell surface targetting of NK1r by translocation to different endosomal compartments (Jenkins *et al.*, 1999; Roosterman *et*

al., 2004). It may thus be speculated that the mostly cytoplasmic localization of NK1r in 5-HT dendrites *in vivo* was due to an internalization of cell surface receptors by endogenous SP, as previously proposed for somatostatin 2A receptors in regions of dense innervation by somatostatin (Dournaud *et al.*, 1998). This selective relationship between SP afferents and 5-HT neurons supported our earlier hypothesis of a tonic activation of NK1r by nearby or synaptic release of SP onto DRN 5-HT neurons (Lacoste *et al.*, 2006). It could also reflect the existence of target cues having directed the growth of SP axons, as observed, for instance, in the guidance of 5-HT axons through the forebrain (Petit *et al.*, 2005).

The examination after combined GABA and NK1r immunolabeling indicated that most of the caudal DRN dendrites endowed with plasmalemmal NK1r were GABAergic. No conclusion could be drawn from the absence of NK1r on some of GABA immunoreactive dendrites in view of the notoriously lower sensitivity of the immunogold compared with the immunoperoxidase-DAB technique. However, the lack of SP terminals in the immediate vicinity of non 5-HT neurons suggested that the GABAergic neuron activity in DRN (Nishikawa & Scatton, 1985) might be modulated by SP through diffusion rather than synaptic release of SP (Zupanc, 1996). This appeared all the more likely that these remote SP terminals were less frequently synaptic than those observed in close contact with 5-HT neurons.

Upregulation of NK1r in serotonin neurons by prolonged treatment with RP67580

After subchronic (7 days) and chronic (21 days) treatment with the non-peptide NK1r antagonist RP67580, the subcellular distribution of NK1r was significantly changed in caudal DRN 5-HT neurons: the density of receptors was increased in their cytoplasm, and even more so on their plasma membrane. Since there was no significant increase in membrane density 1 h after a single dose of RP67580, the effects of subchronic treatment on membrane density could hardly be attributed to the last daily injection. Owing to the relatively low proportion of NK1r on the membrane versus the cytoplasm of these neurons, such increases in membrane density did not necessarily represent large amounts of protein, and could result from a stimulation of gene expression, as evidenced by the increased amount of NK1r mRNA in the DRN region after 7 and 21 days of treatment. It could not be determined from the present experiments whether these increases represented a greater amount of mRNA per neuron or a greater number of neurons expressing NK1r mRNA. However, after 21 days of treatment, while the membrane density of NK1r

immunoreactivity was the highest in 5-HT neurons, the mRNA level in DRN was lower than after subchronic treatment. This could be due to some saturation of the molecular mechanism triggered in response to the antagonist, as proposed by Wan *et al.* (2006) to account for greater increases in both NK1r mRNA and protein level in cortical neurons after 48 h than 72 h of morphine treatment. However, the present increase in plasma membrane density of NK1r protein after 21 days appeared to be independent from an increase in cytoplasmic density, suggesting the contribution of an additional mechanism.

In contrast to DRN, we measured a decrease in NK1r gene expression in the IC after chronic treatment with RP67580. The IC has been shown to be densely innervated by SP immunoreactive fibers (Wynne *et al.*, 1995; Wynne & Robertson, 1997) and to contain NK1r mRNA in normal rat (Maeno *et al.*, 1993). In rat IC, and at variance with DRN, immunoreactivity to NK1r has been reported to be present in axon terminals as well as in soma-dendrites (Hafidi *et al.*, 2002), raising the possibility of a distal, autocontrol of SP release in IC. However, it is not clear how this could account for opposite effects of RP67580 treatment on NK1r gene expression in IC versus DRN, especially since it is not yet known whether other SP receptors subtypes are also present in IC.

Trafficking of NK1r in DRN after SP deafferentation

The bilateral lesion of the habenula entailed a major decrease in SP immunoreactivity in the caudal DRN, and a significant increase (59%) in the plasma membrane density of NK1r in 5-HT neurons, associated with a decrease in their cytoplasmic density. This increase in NK1r plasmalemmal density was somewhat lower than after both subchronic and chronic RP67580 treatments (120% and 180%, respectively), perhaps due to the absence of gene activation, as indicated by the lack of increase in the cytoplasmic protein level. Alternatively, it could reflect the incomplete suppression of SP from the nucleus, in which residual SP innervation could still be provided by interneurons located in the periaqueductal gray or elsewhere (Hökfelt *et al.*, 1977; Cuello & Kanazawa, 1978; Ljungdahl *et al.*, 1978).

As other G-protein-coupled receptors (Ferguson, 2001; Claing *et al.*, 2002), NK1r are very mobile and their agonists (SP and analogues) have already been shown to induce a strong and rapid desensitization by endocytosis (Garland *et al.*, 1994; Mantyh, 1995; Smith *et al.*, 1999; Jenkinson *et al.*, 1999; Harrison & Geppetti, 2001; Simmons, 2006). In spinal cord for instance, SP-induced NK1r internalization has been shown to be increased

following noxious stimulation (Allen *et al.*, 1999), and abolished in the presence of the specific NK1r antagonist, L-703,606 (Marvizón *et al.*, 1997). These studies have also led to the suggestion that internalization provides a spatial image of the magnitude and localization of SP release (Allen *et al.*, 1999). After chronic stimulation of transfected cells by SP a down-regulation of NK1r following endocytosis has also been demonstrated (Cottrell *et al.*, 2006). Knowing that SP may be released near/onto DRN 5-HT neurons, it was therefore reasonable to assume that activation by endogenous SP was responsible for a sustained internalization of NK1r in these cells.

After subchronic and chronic antagonist treatments, the increased membrane density of NK1r in 5-HT neurons was associated with an increased amount of NK1r protein in the cytoplasm, and could have therefore represented a stochastic phenomenon. After the SP denervation, however, the increase in NK1r membrane density was associated with a decrease in cytoplasmic density, ruling out such a passive event. These latter results rather suggested that, in the absence of a tonic activation by SP, NK1r was no longer internalized, and/or its trafficking to the membrane increased, thus enhancing availability at the 5-HT neuron surface. Conversely, the non 5-HT neurons of DRN, remote from SP terminals and thus endowed with membrane-bound NK1r, would not be affected by SP depletion. Differences in trafficking of NK1r between these 5-HT and non 5-HT (GABA) neurons could also depend on distinct transduction pathways, as already proposed to account for the internalization of 5-HT_{1A} receptors located on DRN 5-HT neurons (autoreceptors), as opposed to those of hippocampal (non 5-HT) neurons (heteroreceptors), after acute pharmacological treatment with the specific agonist 8-OH-DPAT (Riad *et al.*, 2001). Interestingly, differential trafficking of NK1r has already been reported in dopamine (DA) versus non-DA neurons of substantia nigra reticulata in apomorphine-treated rats subjected to intense auditory stimulation (Lessard & Pickel, 2005), a combination known to produce a significant decrease of SP release in this brain region (Shirayama *et al.*, 2000).

The molecular mechanisms through which internalization and trafficking of NK1r occur *in vivo*, as well as the differences in receptor recycling between 5-HT and non 5-HT neurons of the DRN in response to RP67580 or SP deafferentation remain to be investigated. The function of G protein-coupled receptors (GPCRs) is regulated by interactions with several molecular partners (reviewed in Ferguson, 2001; Piñeyro, 2009). In transfected cell lines, GPCR-coupled kinases (GRKs) and β -arrestins have been shown to participate in the uncoupling and endocytosis of NK1r in response to SP (McConalogue

et al., 1999; Martini *et al.*, 2002). Thus, it could be of interest to examine the subcellular distribution of GRKs and β -arrestins in NK1r immunoreactive 5-HT and non 5-HT neurons of DRN, in experimental conditions resembling those of the present study. The localization of these molecules might change after SP denervation, which affects internalization, and not after chronic antagonist treatment, which seems to trigger a distinct transduction pathway leading to increased NK1r gene expression.

Concluding remarks

Caudal DRN 5-HT neurons, expressing NK1r (Lacoste *et al.*, 2006), are selectively activated by uncontrollable stressors (Maier *et al.*, 1993; Grahn *et al.*, 1999). Projections of the caudal DRN to limbic areas have been described in the rat (Imai *et al.*, 1986; Vertes, 1991; Vertes & Kocsis, 1994), and exaggerated release of 5-HT in such target regions could be critical in processing behavioral responses to stressors (Maier *et al.*, 1995). Moreover, several studies have revealed interactions between the SP and 5-HT systems within the DRN, which might be important for mood processing (Gradin *et al.*, 1992; Santarelli *et al.*, 2001; Conley *et al.*, 2002).

The control of emotional and social behaviors has also been shown to depend on habenular function. For instance, habenular lesions modify the behavioral responses produced by uncontrollable stress (Amat *et al.*, 2001), change the state of anxiety (Murphy *et al.*, 1996), and attenuate brain stimulation reward (Morissette & Boye, 2008). In 1977, Wang and Aghajanian demonstrated a control of DRN activity by the lateral habenula, which itself receives inputs from various limbic and basal ganglia structures and projects to midbrain nuclei containing dopamine and serotonin neurons (for review see Geisler & Trimble, 2008; Hikosaka *et al.*, 2008). Brain imaging demonstration of a co-variation of activity in the habenula and DRN of depressed human patients has been taken as evidence of a convergent feedback pathway in control of 5-HT release throughout the brain (Morris *et al.*, 1999). Control of 5-HT release by the lateral habenula has also been demonstrated in rat DRN (Yang *et al.*, 2008). Taken altogether, our results therefore suggest that the trafficking of neurokinin-1 receptors might represent a cellular mechanism in control of the modulation of serotonin neuron activity in DRN by the SP projection from habenula.

ABBREVIATIONS:

5-HT: 5-hydroxytryptamin (serotonin)

DRN: dorsal raphe nucleus

GABA: γ -aminobutyric acid

IC: inferior colliculus

NK1r: neurokinin-1 receptor

SP: substance P

TPH: tryptophane hydroxylase

ACKNOWLEDGEMENTS:

This study was supported by grant MOP-3544 from the Canadian Institutes for Health Research to L.D., and by an infrastructure grant (GRSNC) from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). B.L. was recipient of studentships from the Groupe de recherche sur le système nerveux central (GRSNC) and the Faculté des études supérieures of the Université de Montréal. The authors also thank Dr. Réjean COUTURE for scientific advice, and Michel LAUZON, Denis RODRIGUE and Micheline FORTIN for technical assistance.

REFERENCES

- Allen, B.J., Li, J., Menning, P.M., Rogers, S.D., Ghilardi, J., Mantyh, P.W. & Simone, D.A. (1999) Primary afferent fibers that contribute to increased substance P receptor internalization in the spinal cord after injury. *J. Neurophysiol.*, **81**, 1379-1390.
- Amat, J., Sparks, P.D., Matus-Amat, P., Griggs, J., Watkins, L.R. & Maier, S.F. (2001) The role of the habenular complex in the elevation of the dorsal raphe nucleus serotonin and the changes in the behavioral responses produced by uncontrollable stress. *Brain Res.*, **917**, 118-226.
- Ardelt, A.A., Karpitsky, V.V., Krause, J.E. & Roth, K.A. (1996) The neostriatal mosaic: basis for the changing distribution of neurokinin-1 receptor immunoreactivity during development. *J. Comp. Neurol.*, **376**, 463-475.
- Beaudet, A. & Sotelo, C. (1981) Synaptic remodeling of serotonin axon terminals in rat agranular cerebellum. *Brain Res.*, **206**, 305-329.
- Beaudry, G., Langlois, M.C., Weppe, I., Rouillard, C. & Lévesque, D. (2000) Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor nerve growth factor-inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *J. Neurochem.*, **75**, 1694-702.
- Beaujouan, J.C., Heuillet, E., Petitet, F., Saffroy, M., Torrens, Y. & Glowinski, J. (1993) Higher potency of RP67580 in the mouse and the rat compared with other nonpeptide and peptide tachykinin NK1 antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, **108**, 793-800.
- Claing, A., Laporte, S.A., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and β -arrestin proteins. *Prog. Neurobiol.*, **66**, 61-79.
- Commons, K.G. & Valentino, R.J. (2002) Cellular basis for the effects of substance P in the periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus. *J. Comp. Neurol.*, **447**, 82-97.
- Conley, R.K., Cumberbatch, M.J., Mason, G.S., Williamson, D.J., Harrison, T., Locker, K., Swain, C., Maubach, K., O'Donnell, R., Rigby, M., Hewson, L., Smith, D. & Rupniak, N.M.J. (2002) Substance P (neurokinin 1) receptor antagonists enhance dorsal raphe neuronal activity. *J. Neurosci.*, **22**, 7730-7736.

- Cottrell, G.S., Padilla, B., Pikios, S., Roosterman, D., Steinhoff, M., Gerhinger, D., Grady, E.F. & Bunnett, N.W. (2006) Ubiquitin-dependant down-regulation of the neurokinin-1 receptor. *J. Biol. Chem.*, **281**, 27773-27783.
- Cuello, A.C. & Kanazawa, I. (1978) The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, **178**, 129–156.
- Cuello, A.C., Galfre, G. & Milstein, C. (1979) Detection of substance P in the central nervous system by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3532-3536.
- Dournaud, P., Boudin, H., Schonbrunn, A., Tannenbaum, G. & Beaudet, A. (1998) Interrelationships between somatostatin sst2A receptors and somatostatin-containing axons in rat brain : evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin. *J. Neurosci.*, **18**, 1056-1071.
- Ebner, K. & Singewald, N. (2006) The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids*, **31**, 251-272.
- Ebner, K., Singewald, G.M., Whittle, N., Ferraguti, F. & Singewald, N. (2008) Neurokinin 1 receptor antagonism promotes active stress coping via enhanced septal 5-HT transmission. *Neuropsychopharmacology*, **33**, 1929-1941.
- Erdo, S. & Kiss, B. (1986) Presence of GABA, glutamate decarboxylase and GABA transaminase in peripheral tissues: a collection of quantitative data. In Erdo, S. & Bowery, N. (eds) *GABAergic mechanisms in the mammalian periphery* Raven Press, New York, p5-17.
- Erdo, S. & Wolf, J.R. (1990) Gamma-aminobutyric acid outside the mammalian brain. *J. Neurochem.*, **54**, 363-372.
- Ferguson, S.S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.*, **53**, 1-24.
- Froger, N., Gardier, A.M., Moratalla, R., Alberti, I., Lena, I., Boni, C., De Felipe, C., Rupniak, N.M.J., Hunt, S.P., Jacquot, C., Hamon, M. & Lanfumey, L. (2001) 5-hydroxytryptamine (5-HT)1A autoreceptor adaptative changes in substance P (neurokinin 1) receptor knock-out mice mimic antidepressant-induced desensitization. *J. Neurosci.*, **21**, 8188-8197.

- Garland, A.M., Grady, E.F., Payan, D.G., Vigna, S.R. & Bunnett, N.W. (1994) Agonist-induced internalization of substance P (NK1) receptor expressed in epithelial cells. *Biochem. J.*, **303**, 177-186.
- Garret, C., Carruette, A., Fardin, V., Moussaoui, S., Peyronel, J.F., Blanchard, J.C. & Laduron, P.M. (1992) RP67580, a potent and selective substance P non-peptide antagonist. *C. R. Acad. Sci. III*, **314**, 199-204.
- Gazzaley, A.H., Weiland, N.G., McEwen, B.S. & Morrison, J.H. (1996) Differential regulation of NMDAR₁ mRNA and protein by estradiol in the rat hippocampus. *J. Neurosci.*, **16**, 6830-6838.
- Geisler, S. & Trimble, M. (2008) The lateral habenula: no longer neglected. *CNS Spectr.*, **13**, 484-489.
- Gobert, A., Brocco, M., Dekeyne, A., Di Cara, B., Bouchez, G., Lejeune, F., Gannon, R.L. & Millan, M.J. (2008) Neurokinin1 antagonists potentiate antidepressant properties of serotonin reuptake inhibitors, yet blunt their anxiogenic actions: a neurochemical, electrophysiological, and behavioral characterization. *Neuropsychopharmacology*, **34**, 1039-1056.
- Grahn, R.E., Will, M.J., Hammack, S.E., Maswood, S., McQueen, M.B., Watkins, L.R. & Maier, S.F. (1999) Activation of serotonin-immunoreactive cells of the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Res.*, **826**, 35-43.
- Gradin, K., Qadri, F., Nomilos, G.G., Hillegaart, V. & Svensson, T.H. (1992) SP injection into the DRN increases blood pressure and serotonin release in hippocampus of conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **6**, 363-367.
- Guiard, B.P., Przybylski, C., Guilloux, J.P., Seif, I., Froger, N., De Felipe, C., Hunt, S.P., Lanfumey, L. & Gardier, A.M. (2004) Blockade of substance P (neurokinin 1) receptors enhances extracellular serotonin when combined with a selective serotonin reuptake inhibitor: an in vivo microdialysis study in mice. *J. Neurochem.*, **89**, 54-63.
- Guiard, B.P., Lanfumey, L. & Gardier, A.M. (2006) Microdialysis approach to study serotonin outflow in mice following selective serotonin reuptake inhibitors and substance P (neurokinin 1) receptor antagonist administration: a review. *Curr. Drug Targets*, **7**, 187-201.

- Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Reperant, C., Hunt, S.P., Toth, M. & Gardier, A.M. (2007) Substance P neurokinin 1 receptor activation within the dorsal raphe nucleus controls serotonin release in the mouse frontal cortex. *Mol. Pharmacol.*, **72**, 1411-1418.
- Haddjeri, N. & Blier, P. (2001) Sustained blockade of neurokinin-1 receptors enhances serotonin neurotransmission. *Biol. Psychiatry.*, **50**, 191-199.
- Haddjeri, N. & Blier, P. (2008) Neurokinin-1 receptor antagonists modulate brain noradrenaline and serotonin interactions. *Eur. J. Pharmacol.*, **600**, 64-70.
- Hafidi, A., Beurg, M., Bouleau, Y. & Dulon, D. (2002) Comparative distribution of NK1, NK2, and NK3 receptors in the rat brainstem auditory nuclei. *Brain Res.*, **947**, 299-306.
- Harrison, S. & Geppetti, P. (2001) Substance P. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **33**, 555-576.
- Haycock, J.W., Kumer, S.C., Lewis, D.A., Vrana, K.E. & Stockmeier, C.A. (2002) A monoclonal antibody to tryptophan hydroxylase: applications and identification of the epitope. *J. Neurosci. Meth.*, **114**, 205-212.
- Herpfer, I. & Lieb, K. (2003) Substance P and substance P receptor antagonists in the pathogenesis and treatment of affective disorders. *World J. Biol. Psychiatry*, **4**, 56-63.
- Hershey, A.D., Dykema, P.E. & Krause, J.E. (1991) Organization, structure, and expression of the gene encoding the rat substance P receptor. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4366-4374.
- Hikosaka, O., Sesack, S.R., Lecourtier, L., & Shephard, P. (2008) Habenula: crossroad between the basal ganglia and th limbic system. *J. Neurosci.* **28**, 11825-11829.
- Hökfelt, T., Ljungdahl, A., Terenius, L., Elde, R. & Nilsson, G. (1977) Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3081-3085.
- Imai, H., Steindler, D.A. & Kitai, S.T. (1986) The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **243**, 363-380.
- Jenkinson, K.M., Southwell, B.R. & Furness, J.B. (1999) Two affinities for a single antagonist at the neuronal NK1 tachykinin receptor: evidence from quantitation of receptor endocytosis. *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 131-136.
- Kelly, L.R., Jianli, L.I., Carden, W. & Bickford, M.E. (2003) Ultrastructure and synaptic targets of tectothalamic terminals in the cat lateral posterior Nucleus. *J. Comp. Neurol.*, **464**, 472-486.

- Lacoste, B., Riad, M. & Descarries, L. (2006) Immunocytochemical evidence for the existence of substance P receptor (NK1) in serotonin neurons of rat and mouse dorsal raphe nucleus. *Eur. J. Neurosci.*, **23**, 2947-2958.
- Laird, J.M.A., Hargreaves, R.J. & Hill, R.G. (1993) Effect of RP67580, a non-peptide neurokinin1 receptor antagonist, on facilitation of a nociceptive spinal flexion reflex in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **109**, 713-718.
- Lessard, A. & Pickel, V.M. (2005) Subcellular distribution and plasticity of neurokinin-1 receptors in the rat substantia nigra and ventral tegmental area. *Neuroscience*, **135**, 1309-1323.
- Li, J.L., Wang, D., Kaneko, T., Shigemoto, R., Nomura, S. & Mizuno, N. (2000) Relationship between neurokinin-1 receptor and substance P in the striatum: light and electron microscopic immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **418**, 156-163.
- Liu, Y.Y., Wong-Riley, M.T.T., Liu, J.P., Wei, X.X., Jia, Y., Liu, H.L., Fujiyama, F. & Ju, G. (2004) Substance P and enkephalinergic synapses onto neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons in the pre-Bötzing complex of rats. *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 65-75.
- Ljungdahl, A., Hökfelt, T. & Nilsson, G. (1978) Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and terminals. *Neuroscience*, **3**, 861-943.
- Maeno, H., Kiyama, H. & Tohyama, M. (1993) Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. *Mol. Brain. Res.*, **18**, 43-58.
- Maier, S.F., Grahn, R.E., Kalman, B.A., Sutton, L.C., Wiertelak, E.P. & Watkins, L.R. (1993) The role of the amygdala and dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of inescapable shock. *Behav. Neurosci.*, **107**, 377-388.
- Maier, S.F., Grahn, R.E. & Watkins, L.R. (1995) 8-OH-DPAT microinjected in the region of the dorsal raphe nucleus blocks and reverses the enhancement of fear conditioning and interference with escape produced by exposure to inescapable shock. *Behav. Neurosci.*, **109**, 404-412.

- Mantyh, P.W. (1995) Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: Substance P-evoked internalization of its receptor in the rat striatum in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2622-2626.
- Martini, L., Hastrup, H., Holst, B., Fraile-Ramos, A., Marsh, M. & Schwartz, T.W. (2002) NK1 receptor fused to β -arrestin displays a single-component, high-affinity molecular phenotype. *Mol. Pharmacol.*, **62**, 30-37.
- Marvizón, J.C., Martinez, V., Grady, E.F., Bunnett, N.W. & Mayer, E.A. (1997) Neurokinin 1 receptor internalization in spinal cord slices induced by dorsal root stimulation is mediated by NMDA receptors. *J. Neurosci.*, **17**, 8129-8136.
- McConalogue, K., Déry, O., Lovett, M., Wong, H., Walsh, J.H., Grady, E.F. & Bunnett, N.W. (1999). Substance P-induced trafficking of β -arrestins. The role of β -arrestins in endocytosis of the neurokinin-1 receptor. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16257-16268.
- McLeod, A.L., Krause, J.E., Cuello, A.C. & Ribeiro-Da-Silva, A. (1998) Preferential synaptic relationships between substance P-immunoreactive boutons and neurokinin 1 receptor sites in the rat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15775-15780.
- McLeod, A.L., Julien, J.P., Cuello, A.C., Krause, J.E. & Ribeiro-da-Silva, A. (1999) Ectopic substance P-immunoreactive boutons are preferentially presynaptic to neurokinin-1 receptor immunoreactive dendrites in the spinal white matter of transgenic mice. *Brain Res.*, **836**, 1-8.
- Middlemiss, D.N., Price, G.W. & Watson, J.M. (2002) Serotonergic targets in depression. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2**, 18-22.
- Morris, J.S., Smith, K.A., Cowen, P.J., Friston, K.J. & Dolan, R.J. (1999) Covariation of activity in habenula and dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology*, **27**, 329-340.
- Morissette, M.C. & Boye, S.M. (2008) Electrolytic lesions of the habenula attenuate brain stimulation reward. *Behav. Brain Res.*, **187**, 17-26.
- Murphy, C.A., DiCamillo, A.M., Haun, F. & Murray, M. (1996) Lesion of the habenular efferent pathway produces anxiety and locomotor hyperactivity in rats: a comparison of the effects of neonatal and adult lesions. *Behav. Brain Res.*, **81**, 43-52.

- Nakaya, Y., Kaneko, T., Shigemoto, R., Nakanishi, S. & Mizuno, N. (1994) Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.*, **347**, 249-274.
- Neckers, L.M., Schwartz, J.P., Wyatt, R.J. & Speciale, S.G. (1979) Substance P afferents from the habenula innervate the dorsal raphe nucleus. *Exp. Brain Res.*, **37**, 619-623.
- Nishikawa, T. & Scatton, B. (1985) Inhibitory influence of GABA on central serotonergic transmission. Raphe nuclei as the neuroanatomical site of the GABAergic inhibition of cerebral serotonergic neurons. *Brain Res.*, **331**, 91-103.
- Okada, Y. (1986) Localization and function of GABA in the pancreatic islets. In Erdo, S. & Bowery, N. (eds), *GABAergic mechanisms in the mammalian periphery*. Raven Press, New York, pp. 223.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Petit, A., Kennedy, T.E., Bagnard, D. & Doucet, G. (2005) Membrane-associated guidance cue direct the innervation of forebrain and midbrain by dorsal raphe-derived serotonergic axons. *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 552-568.
- Piñeyro, G. (2009) Membrane signalling complexes: implications for development of functionally selective ligands modulating heptahelical receptor signalling. *Cell Signal.*, **21**, 179-185.
- Piñeyro, G. & Blier, P. (1999) Autoregulation of serotonin neurons: role of antidepressant drug action. *Pharmacol. Rev.*, **51**, 533-591.
- Riad, M., Watkins, K.C., Doucet, E., Hamon, M. & Descarries, L. (2001) Agonist-induced internalization of serotonin-1A receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J. Neurosci.*, **21**, 8378-8386.
- Ribeiro-da-Silva, A., McLeod, A.L. & Krause, J.E. (2000) Neurokinin receptors in the CNS. In Quirion, R., Björklund, A. & Hökfelt, T. (eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. **16**. Peptide Receptors, Part 1, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 195-240.
- Roosterman, D., Cottrell, G.S., Schmidlin, F., Steinhoff, M. & Bunnett, N.W. (2004) Recycling and resensitization of the neurokinin 1 receptor. Influence of agonist concentration and Rab GTPases. *J. Biol. Chem.*, **279**, 30670-30679.

- Rupniak, N.M.J., Boyce, S., Williams, A.R., Cook, G., Longmore, J., Seabrook, G.R., Caeser, M., Iversen, S.D. & Hill, R.G. (1993) Antinociceptive activity of NK1 receptor antagonists: non-specific effects of racemic RP67580. *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 1607-1613.
- Saffroy, M., Beaujouan, J.C., Petite, F., Torrens, Y. & Glowinski, J. (1994) Differential localization of ³H-[Pro9]SP binding sites in the guinea pig and rat brain. *Brain Res.*, **633**, 317-325.
- Santarelli, L., Gobbi, G., Debs, P.C., Sibille, E.L., Blier, P., Hen, R. & Heath, M.J.S. (2001) Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1912-1917.
- Shirayama, Y., Mitsushio, H., Takahashi, K. & Nishikawa, T. (2000) Differential effects of haloperidol on phencyclidine-induced reduction in substance P contents in rat brain regions. *Synapse*, **35**, 292-299.
- Simmons, M.A. (2006) Functional selectivity of NK₁ receptor signaling: peptide agonists can preferentially produce receptor activation or desensitization. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **319**, 907-913.
- Smith, D.W., Hewson, L., Fuller, P., Williams, A.R., Wheeldon, A. & Rupniak, N.M. (1999) The substance P antagonist L-760,735 inhibits stress-induced NK(1) receptor internalisation in the basolateral amygdala. *Brain Res.*, **848**, 90-95.
- Stumm, R.K., Culmsee, C., Schäfer, M.K.H., Kriegstein, J. & Wheihe, E. (2001) Adaptive plasticity in tachykinin and tachykinin receptor expression after focal cerebral ischemia is differentially linked to GABAergic and glutamatergic circuits and cerebrovascular endothelium. *J. Neurosci.*, **21**, 798-811.
- Valentino, R.J., Bey, V., Pernar, L. & Commons, K.G. (2003) Substance P acts through local circuits within the rat dorsal raphe nucleus to alter serotonergic neuronal activity. *J. Neurosci.*, **23**, 7155-7159.
- Vertes, R.P. (1991) A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **313**, 643-668.

- Vertes, R.P. & Kocsis, B. (1994) Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **340**, 11-26.
- Vigna, S.R., Bowden, J.J., McDonnald, D.M., Fisher, J., Okamoto, A., McVey, D.C., Payan, D.G. & Bunnett, N.W. (1994) Characterization of antibodies of the rat substance P (NK1) receptor and to a chimeric substance P receptor expressed in mammalian cells. *J. Neurosci.*, **14**, 834-845.
- Wan, Q., Douglas, S.D., Wang, X., Kolson, D.L., O'Donnell, L.A. & Ho, W.Z. (2006) Morphine upregulates functional expression of neurokinin-1 receptor in neurons. *J. Neurosci. Res.*, **84**, 1588-1596.
- Wang, R.Y. & Aghajanian, G.K. (1977) Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science*, **197**, 89-91.
- Wynne, B. & Robertson, D. (1997) Somatostatin and substance P-like immunoreactivity in the auditory brainstem of the adult rat. *J. Chem. Neuroanat.*, **12**, 259-266.
- Wynne, B., Harvey, A.R., Robertson, D. & Sirinathsinghji, D.J. (1995) Neurotransmitter and neuromodulator systems of the rat inferior colliculus and auditory brainstem studied by in situ hybridization. *J. Chem. Neuroanat.*, **9**, 289-300.
- Yang, L.M., Hu, B., Xia, Y.H., Zhang, B.L. & Zhao, H. (2008) Lateral habenula lesions improve the behavioral response in depressed rats via increasing the serotonin level in dorsal raphe nucleus. *Behav. Brain Res.*, **188**, 84-90.
- Zupanc, G.K. (1996) Peptidergic transmission: from morphological correlates to functional implications. *Micron*, **27**, 35-91.

Table 1 - Proportion (%) of NK1r immunolabeling on the plasma membrane of 5-HT and non 5-HT dendrites in caudal DRN after RP67580 treatment or bilateral habenular lesion

	RP67580 treatment					Habenular lesion	
	Controls	Single injection	Single injection	Daily injection	Osmotic minipump	Shams	Lesioned
		1 h survival	7 day survival	7 days	21 days		
5-HT neurons	11.9 ± 0.7 (0.13)	12.9 ± 1.0 (0.15)	12.0 ± 0.9 (0.14)	23.0 ± 1.0 * (0.30)	28.0 ± 3.0 * (0.40)	10.5 ± 0.7 (0.12)	19 ± 1.0 * (0.23)
non 5-HT neurons	80.0 ± 1.0 (4.0)	75.9 ± 2.0 (3.1)	76.0 ± 0.8 (3.2)	79.0 ± 1.0 (3.8)	75.0 ± 0.1 (3.0)	81.0 ± 2.0 (4.2)	82 ± 3.0 (4.5)

Data from the same rats as in Figures 4 and 6. The ratio of plasma membrane/cytoplasmic labeling is given in brackets. * $P < 0.05$, versus control/sham by Bonferroni's *post-hoc* test.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. SP innervation in rat caudal mesencephalon. **A**, Low power photomicrograph of the dorsal midbrain at the caudal transverse level where NK1r-immunolabeled 5-HT neurons are found in the dorsal raphe nucleus (DRN). At this level, the aqueduct of Sylvius (Aq) begins to enlarge into the 4th ventricle. The section was immunostained for SP. The dashed circle outlines the caudal DRN, and small white arrows point at a bilateral zone of dense SP innervation along the mediodorsal aspect of the longitudinal medial fasciculus (see enlargement in Fig. 6C). **B**, Higher magnification, confocal microscopic image of immunofluorescent SP axon varicosities (arrows) in the ventromedial DRN. **C and D**, Electron micrographs of SP immunoreactive, DAB-labeled, axon varicosities in the caudal DRN. In **C**, the SP varicosity is seen to make a synaptic junction (between small arrows) with a dendritic branch (db). In **D**, the SP varicosity is juxtaposed to an axon terminal (at) and appears to be non synaptic. Scale bars: 0.5 mm in **A**; 10 μm in **B**; 1 μm in **C,D**.

Figure 2. Relationship between SP terminals and 5-HT neurons in the caudal DRN, as visualized after dual immunolabeling of SP and TPH for confocal (**A,B**) and electron (**C,D**) microscopy. In **A** and **B**, SP is in green and TPH in red; several SP axon varicosities (arrows) are seen in the immediate vicinity of TPH cell bodies and dendrites (arrowheads). Vm, ventromedial part of caudal DRN. In **C** and **D**, SP is labeled with DAB (arrows) and TPH with immunogold (arrowheads). In **C**, the SP immunoreactive terminal is juxtaposed to the 5-HT dendrite. In **D**, the distance between the SP terminal and the 5-HT dendrite is approximately 1 μm . Scale bars: 10 μm in **A,B** and 1 μm in **C,D**.

Figure 3. Relationship between SP-immunoreactive terminals and NK1r dendrites of the caudal DRN with special reference to GABA. In **A-D**, SP was labeled with DAB and NK1r with immunogold. 5-HT dendrites (**A** and **B**) display NK1r immunoreactivity mainly in the cytoplasm, whereas the receptor is mostly located on the plasma membrane of non 5-HT dendrites (**C** and **D**). The SP terminal in **A** (asterisk) is in direct contact with the NK1r-labeled, 5-HT dendrite, whereas that in **B** (asterisk) is juxtaposed to an unlabeled cell body (cb), a few microns away from the NK1r-labeled 5-HT dendrite. In **C** and **D**, no SP terminal are visible in the vicinity of non 5-HT dendrites that are NK1r-labeled on their plasma membrane. In **E** and **F**, GABA is labeled with DAB and NK1r with immunogold.

Most if not all dendrites bearing membranous NK1r are GABAergic. Note in **C**, **E** and **F** the synaptic contacts (between small arrows) between SP-negative terminals (at) and NK1r dendrites (non 5-HT). All scale bars: 1 μ m.

Figure 4. Effect of different schedules of antagonist RP67580 treatment on the subcellular distribution of immunogold-labeled NK1r in 5-HT versus non 5-HT dendrites in the caudal DRN. The electron micrographs illustrate the subcellular localization of NK1r in 5-HT (**A-D**) and non 5-HT (**E-F**) dendrites. **A**, 1h after single injection. **B**, 7 days after single injection. **C**, Daily injection for 7 days. **D**, Minipump administration for 21 days. **E**, 1h after single injection. **F**, Minipump administration for 21 days. In **C** and **D**, arrows designate examples of immunogold particles associated with the plasma membrane. Scale bar: 1 μ m. The histograms show the effects of RP67580 treatments on the overall, plasma membrane and cytoplasmic density of NK1r immunolabeling in 5-HT and non 5-HT neurons. These results are expressed in percent of untreated controls (means + SEM from 3 rats in each group). * $P \leq 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control by Bonferroni's *post-hoc* test.

Figure 5. Effect of RP67580 treatments on NK1r gene expression in the caudal midbrain, as measured by *in situ* hybridization. The photographs and histograms illustrate the effects of RP67580 on NK1r mRNA signals in the caudal DRN (arrows) and inferior colliculi (IC). NK1r gene expression was increased in the DRN after 7 days of RP67580 treatment, and decreased in the IC after 21 days of RP67580 treatment. The results in histograms are expressed in nCi/g of tissue (means + SEM from 3 rats in each group) * $P \leq 0.05$, *** $P < 0.001$, versus other groups by Bonferroni's *post-hoc* test.

Figure 6. Effect of SP deafferentation on NK1r localization in 5-HT neurons of the caudal DRN. The micrographs **A** and **B** are from transverse sections across the dorsal diencephalon in a sham-control rat (**A**) and a rat subjected to bilateral electrolytic lesioning of the habenula (**B**). Hb: habenula; fr: fasciculus retroflexus. **C** and **D** illustrate the effect of the bilateral habenular lesion on the SP innervation in the ventromedial part of caudal DRN (*vm*). **E** and **F** are examples of the subcellular distribution of NK1r in 5-HT dendrites of the caudal DRN in a normal (**E**) and in habenular-lesioned rat (**F**) as visualized by immunoelectron microscopy. Note the greater number of NK1r immunogold particles on the plasma membrane of the labeled dendrite in **F**. The NK1r-labeled dendrite lies next to a synaptic

SP terminal (asterisk) in *E*, and next to an unlabeled axon terminal (at) in *F*. Scale bars: 0.5 mm in *A,B*; 100 μm in *C,D*; 1 μm in *E,F*. As in Fig. 4, the histogram shows the effects of the habenular lesion on the overall, plasma membrane and cytoplasmic density of NK1r immunolabeling in non 5-HT and 5-HT dendrites. These results are expressed as percent of sham controls (means \pm SEM from 4 rats per group). * $P \leq 0.05$, ** $P < 0.01$ versus sham by Student's *t* test.

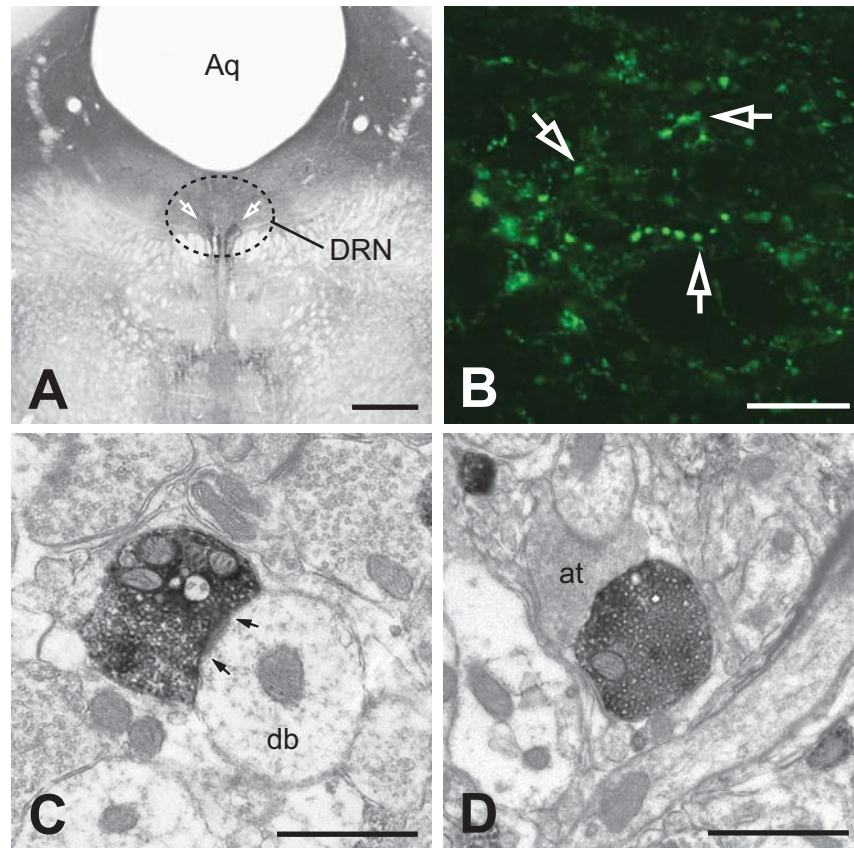


FIGURE 1 : SP innervation in rat caudal mesencephalon and DRN.

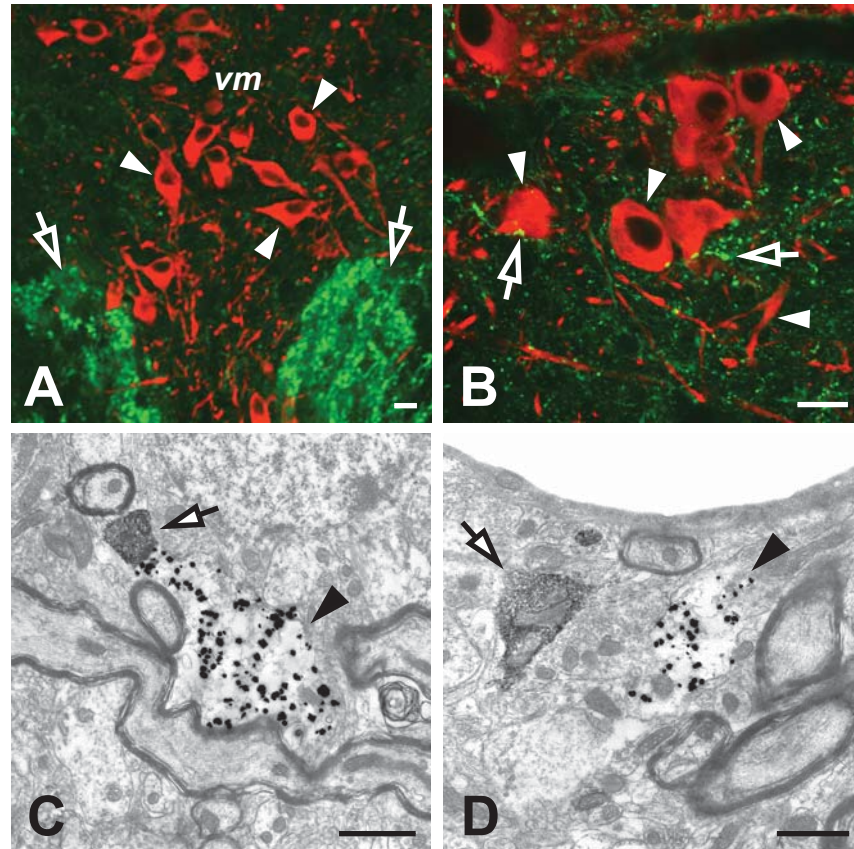


FIGURE 2 : Relationship between SP terminals and 5-HT neurons in the caudal DRN, as visualized after dual immunolabeling of SP and TPH for confocal and electron microscopy.

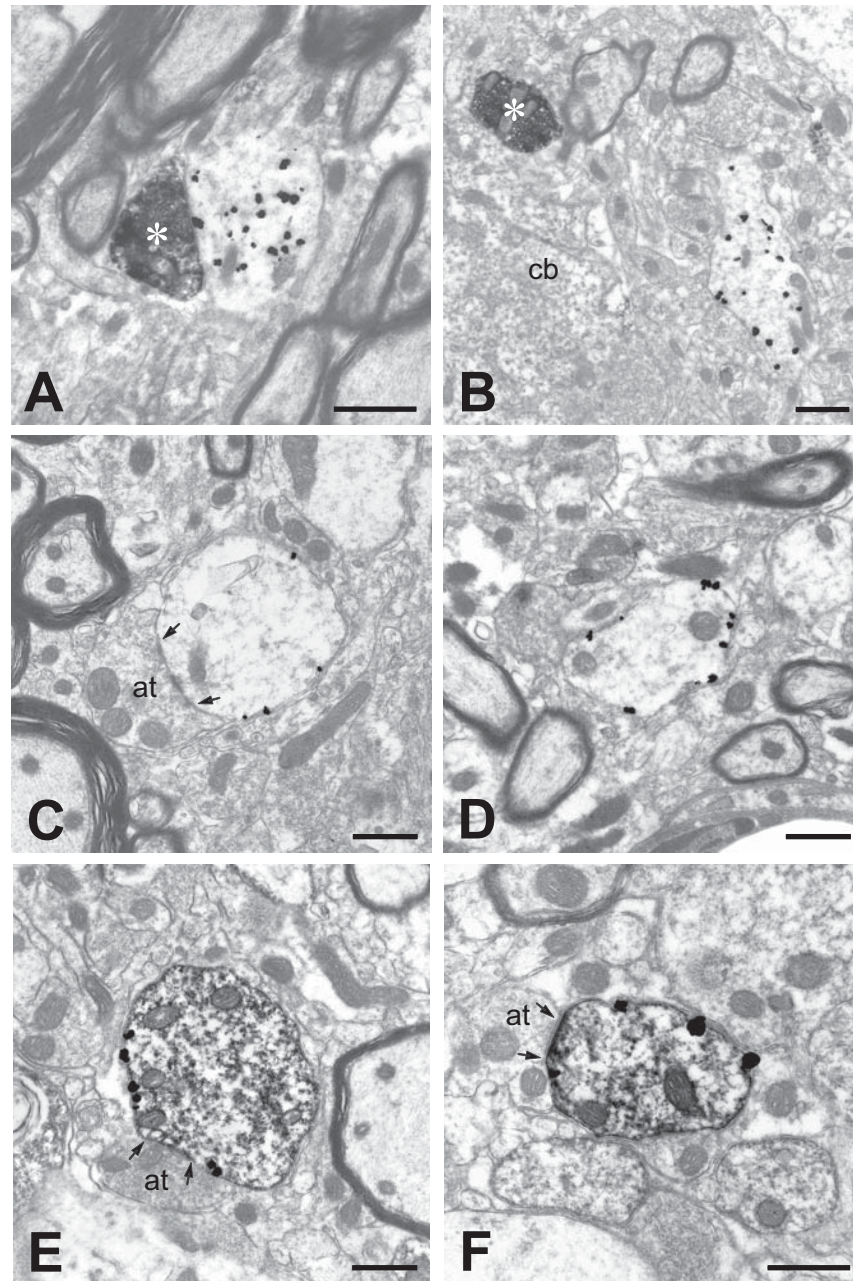


FIGURE 3 : Relationship between SP immunoreactive terminals and NK1r dendrites of the caudal DRN, with special reference to GABA.

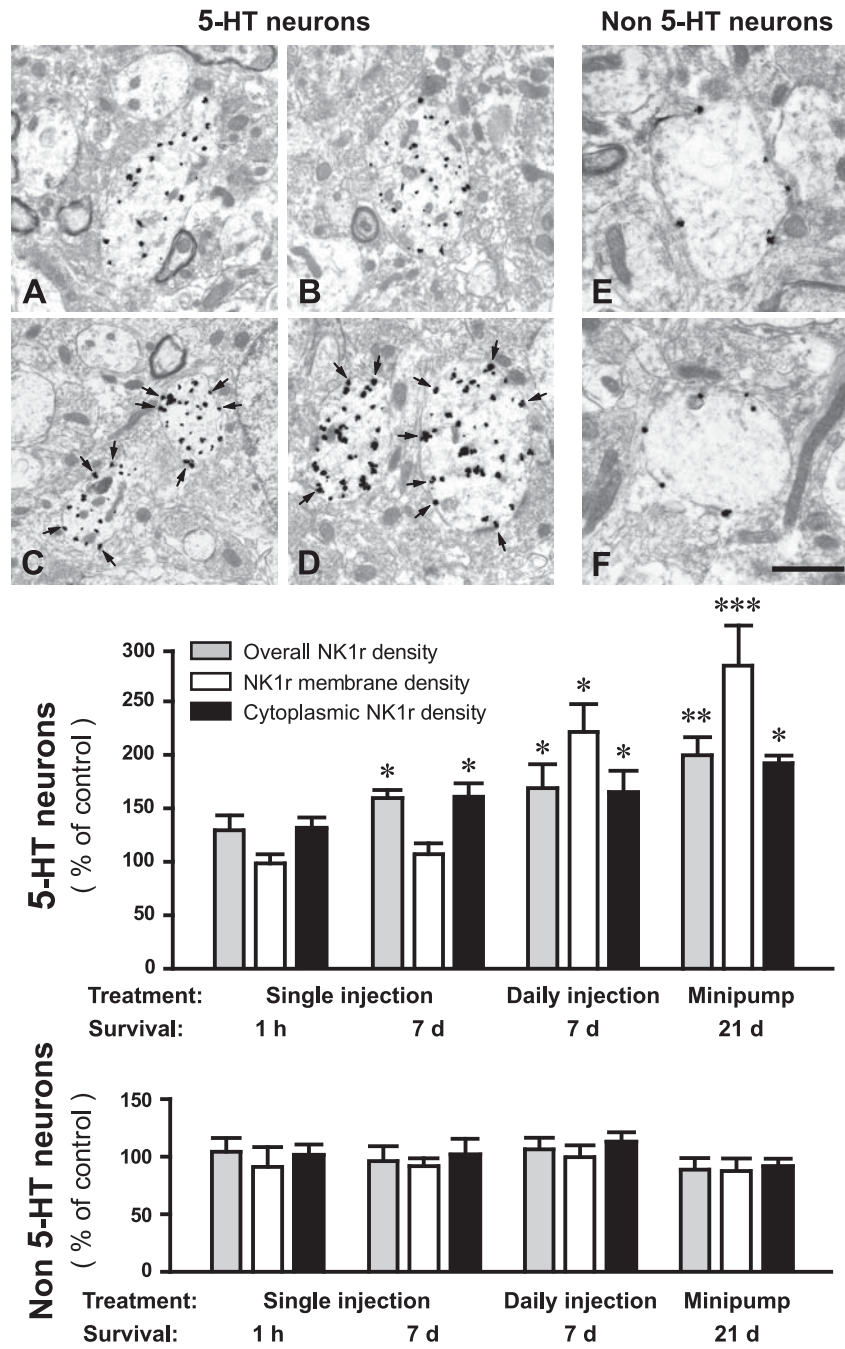


FIGURE 4 : Effect of different schedules of antagonist RP67580 treatment on the subcellular distribution of immunogold-labeled NK1r in 5-HT versus non 5-HT dendrites in the caudal DRN.

Table 1 - Proportion (%) of NK1r immunolabeling on the plasma membrane of 5-HT and non 5-HT dendrites in caudal DRN after RP67580 treatment or bilateral habenular lesion

	RP67580 treatment					Habenular lesion	
	Controls	Single injection	Single injection	Daily injection	Osmotic minipump	Shams	Lesioned
		1 h survival	7 day survival	7 days	21 days		
5-HT neurons	11.9 ± 0.7 (0.13)	12.9 ± 1.0 (0.15)	12.0 ± 0.9 (0.14)	23.0 ± 1.0 * (0.30)	28.0 ± 3.0 * (0.40)	10.5 ± 0.7 (0.12)	19 ± 1.0 * (0.23)
non 5-HT neurons	80.0 ± 1.0 (4.0)	75.9 ± 2.0 (3.1)	76.0 ± 0.8 (3.2)	79.0 ± 1.0 (3.8)	75.0 ± 0.1 (3.0)	81.0 ± 2.0 (4.2)	82 ± 3.0 (4.5)

Data from the same rats as in Figures 4 and 6. The ratio of plasma membrane/cytoplasmic labeling is given in brackets. * $P < 0.05$, versus control/sham by Bonferroni's *post-hoc* test.

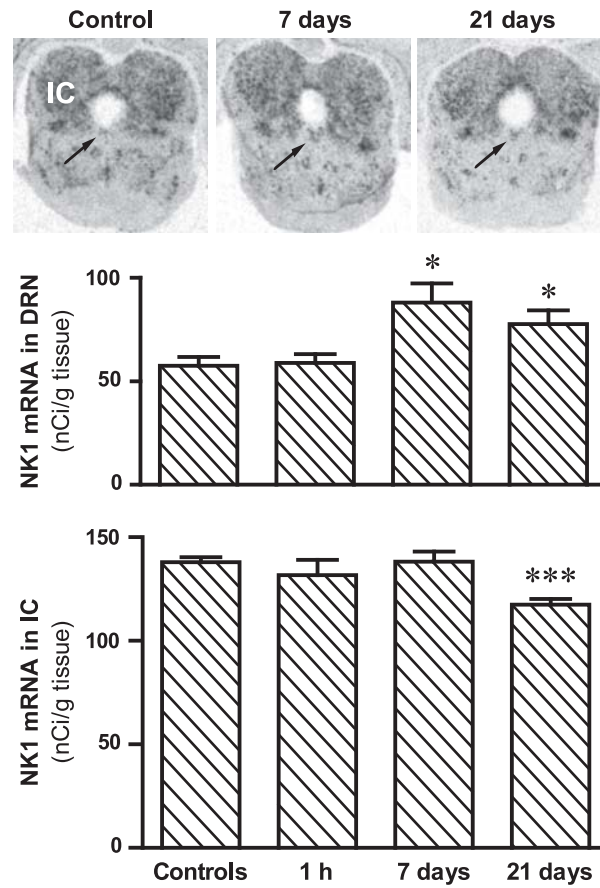


FIGURE 5 : Effect of RP67580 treatments on NK1r gene expression in the caudal midbrain, as measured by *in situ* hybridization.

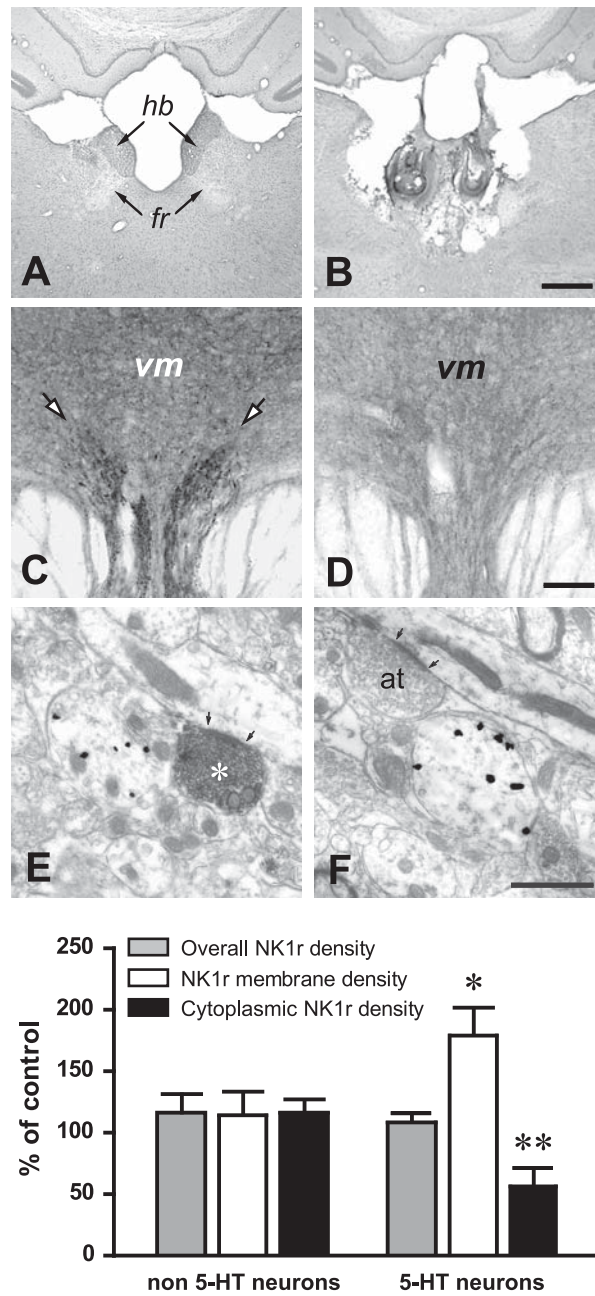


FIGURE 6 : Effect of SP deafferentation on NK1r localization in 5-HT neurons of the caudal DRN.

TROISIÈME CHAPITRE : DISCUSSION GÉNÉRALE

Les deux volets de cette thèse confortent l'hypothèse d'une activation et d'une internalisation soutenues des rNK1 par la SP dans les neurones 5-HT du NRD. L'ensemble des résultats suggère également que le trafic des rNK1 dans les neurones 5-HT du NRD pourrait représenter un mécanisme cellulaire capable d'un contrôle fin de l'activité des neurones 5-HT du NRD par les afférences SP en provenance de l'habenula.

I - Synthèse des résultats

Le but de nos travaux était de fournir la première description détaillée des relations anatomo-fonctionnelles entre un neuropeptide (la SP), son récepteur (le rNK1) et un neurotransmetteur (la 5-HT), au sein d'une région du cerveau impliquée dans la régulation de l'humeur (le NRD). Nous croyons y être parvenus dans les deux manuscrits de cette thèse.

Le premier article relate principalement la découverte d'une sous-population de neurones sérotoninergiques du NRD exprimant le rNK1 de la SP. Nous avons en effet débuté nos travaux par une description immunocytochimique (en microscopies optique, confocale, et électronique) de la distribution cellulaire et subcellulaire du rNK1 dans le NRD du rat et de la souris. Ces récepteurs sont apparus localisés à la fois sur des neurones 5-HT et non 5-HT du noyau. De plus, nous avons pu constater, chez les deux espèces, que les neurones 5-HT porteurs du rNK1 sont concentrés dans la zone ventro-médiane de la moitié caudale du NRD, et surtout que ces récepteurs sont principalement cytoplasmiques dans les neurones à 5-HT et membranaires sur les neurones non 5-HT du noyau.

Avec une approche davantage multidisciplinaire, le second article a révélé l'existence de relations intimes entre l'innervation SP et les neurones 5-HT porteurs de rNK1 dans le NRD caudal du rat. En combinant un marquage de la SP avec celui du rNK1, nous avons d'abord examiné, à l'échelon ultrastructural, les relations entre les terminaisons SP et les neurones 5-HT pourvus de rNK1. Les terminaisons SP ont été fréquemment trouvées en contact direct ou à proximité des dendrites munies de rNK1 cytoplasmiques (5-HT), mais toujours éloignées des neurones non 5-HT (porteurs de rNK1 membranaires). Nous avons en outre identifié ces neurones non 5-HT NK1-immunoréactifs comme étant GABAergiques. Ensuite, pour tester l'hypothèse d'une internalisation soutenue des rNK1

dans les neurones 5-HT du NRD, nous avons examiné la localisation subcellulaire du récepteur chez le rat traité avec l'antagoniste NK1, RP67580. La densité des rNK1 a été mesurée dans le cytoplasme et sur la membrane plasmique des deux types de dendrites : 5-HT (rNK1 cytoplasmiques) et non 5-HT (rNK1 membranaires). Nous avons alors constaté que, par suite d'un traitement subchronique ou chronique (mais non aigu) avec l'antagoniste, la densité totale et la densité membranaire du rNK1 étaient fortement augmentées dans les neurones 5-HT, mais inchangées dans les neurones non 5-HT. L'hybridation *in situ* nous a montré que ces traitements accroissaient conjointement la quantité (protéines) et l'expression (ARNm) du rNK1 dans le NRD. Par ailleurs, après une lésion bilatérale de l'habenula (région à l'origine de l'innervation SP du noyau), nous avons mesuré une hausse marquée de la densité membranaire du rNK1 sur les neurones 5-HT du NRD, sans hausse de la densité cytoplasmique.

II - Faits saillants de l'étude

II-1 : À propos de la localisation du récepteur NK1 dans le mésencéphale et de sa relation avec les neurones à sérotonine

Alors que la distribution des neurones 5-HT nous a semblé très similaire dans le mésencéphale du rat et de la souris, de grosses différences sont apparues entre les deux espèces concernant la distribution anatomique du rNK1 dans l'ensemble du cerveau. Dans le NRD, plus particulièrement, nous avons constaté certaines distinctions dans la localisation du récepteur entre ces deux espèces, ce qui pourraient traduire l'existence de différences d'organisation intrinsèque, de composition cellulaire, voire de l'innervation SP des noyaux du raphé.

La distribution exclusivement somatodendritique du rNK1, que nous avons observée dans le NRD et les autres noyaux immunoréactifs du mésencéphale, est en accord avec le patron de distribution de son ARNm (Maeno *et al.*, 1993) et de ses sites de liaison (Saffroy *et al.*, 1994), ainsi qu'avec certaines données immunocytochimiques antérieures (Ribeiro-Da-Silva *et al.*, 2000; Commons & Valentino, 2002). De manière générale, nous n'avons pas constaté de discordance entre la distribution régionale du rNK1 et celle des terminaisons nerveuses SP dans le NRD, malgré les nombreuses observations en ce sens (revu par Herkenham, 1987).

Une sous-population de neurones 5-HT apparaît donc dotée de rNK1. Compte-tenu de nos conditions expérimentales, nous ne saurions garantir la détection de tous les neurones 5-HT porteurs de rNK1 dans le NRD, surtout à l'échelon ultrastructural. En effet, lors des marquages doubles, le récepteur a été marqué avec des particules d'or et cette technique est notoirement moins sensible que celle de l'immunopéroxydase (DAB), pouvant ainsi conduire à une sous-estimation. Nous pouvons cependant conclure qu'une proportion non négligeable de neurones 5-HT du NRD caudal exprime le rNK1 chez le rat et la souris (37% et 26%, respectivement). Ce résultat a pu d'ailleurs être confirmé en microscopie confocale.

Chez le singe (Charara & Parent, 1998) et chez l'homme (Baker *et al.*, 1991; Sergejev *et al.*, 1999), environ 50% des neurones 5-HT du NRD co-expriment la SP. Par contre, aucune co-existence de SP et 5-HT n'a été démontrée dans le NRD du rat et de la souris (Chan-Palay *et al.*, 1978; Hökfelt *et al.*, 1978; Björklund *et al.*, 1979). On peut en déduire que, chez les rongeurs, l'activation des rNK1 sur les neurones 5-HT (et non 5-HT) du NRD est assurée par la SP en provenance d'afférences, notamment de l'habenula (Neckers *et al.*, 1979; Reisine *et al.*, 1982), mais peut-être aussi, par diffusion, à partir de sites de relâche situés à proximité (Barbaresi, 1998; Liu *et al.*, 2004).

L'examen en microscopie électronique du matériel doublement marqué pour le rNK1 et la TPH a révélé une localisation essentiellement cytoplasmique du récepteur dans les neurones à 5-HT, et principalement membranaire sur les neurones non 5-HT du NRD. Cette observation était d'autant plus intéressante que, dans la plupart des régions du SNC explorées jusque là, le rNK1 a toujours été décrit comme membranaire et somatodendritique (Mantyh, 1995; Ribeiro-Da-Silva *et al.*, 2000; Commons & Valentino, 2002). Nos résultats n'allaient pas véritablement à l'encontre des observations de Commons et Valentino (2002), qui avaient rapporté la présence du rNK1 sur la membrane de certains neurones glutamatergiques du NRD, mais très peu de neurones 5-HT dotés de rNK1. En effet, pour la microscopie électronique, ces auteurs s'étaient contentés d'échantillonner la partie plus rostrale du noyau, où les neurones 5-HT dotés de rNK1 nous sont apparus beaucoup moins nombreux.

On ne peut exclure que le rNK1 soit constitutivement cytoplasmique dans les neurones 5-HT du NRD, à l'instar des récepteurs 5-HT_{2A} de la 5-HT (Cornea-Hébert *et al.*, 1999) ou δ -opioïdes (Cahill *et al.*, 2001a; Patwardhan *et al.*, 2005) dans la plupart des neurones centraux. Cependant, la localisation ultrastructurale différentielle du rNK1 dans

les neurones 5-HT et non 5-HT pourrait aussi dépendre de l'existence de voies de transduction distinctes entre ces deux types cellulaires. C'est une des explications que Lessard et Pickel (2005) ont invoqué pour rendre compte d'un trafic différentiel du rNK1 dans les neurones dopaminergiques et non dopaminergiques de la substance noire de rats soumis à une stimulation auditive intense. On sait également que des constructions couplant le rNK1 avec la pG_q ou la pG_s, transfectées dans des cellules COS-7, présentent des propriétés pharmacologiques distinctes en termes d'affinité pour les agonistes ou de renouvellement des seconds messagers (Holst *et al.*, 2001). C'est d'ailleurs ce type de différences qui a été proposé pour rendre compte de l'internalisation des récepteurs 5-HT_{1A} dans les neurones 5-HT du NRD (autorécepteurs) et non dans les neurones cibles de l'hippocampe (hétérorécepteurs), lors du traitement aigu avec un agoniste ou un ISRS (Riad *et al.*, 2001, 2004).

II-2 : À propos de l'innervation SP du NRD et de sa relation avec les neurones à sérotonine

La présence de fibres et terminaisons SP a déjà été décrite dans le NRD du rat (Cuello & Kanazawa, 1978; Ljungdahl *et al.*, 1978), mais ces études ne suggéraient pas de distribution différentielle de ces afférences entre les composantes du noyau. Pour notre part, nous avons observé chez le rat une innervation SP plus dense de la partie la plus ventrale du NRD caudal, reflétant une fois de plus la sectorisation de ce noyau. Une spécificité des projections afférentes du NRD a été décrite chez le rat (Vertes, 1991; Vertes & Kocsis, 1994). Ces études de traçage antérograde ont montré que la moitié caudale du NRD se projette davantage sur les aires limbiques, incluant l'hippocampe, alors que la moitié rostrale du noyau se projette plus densément sur la quasi-totalité des aires néocorticales. Ceci appuie une implication particulière du NRD caudal dans la régulation des fonctions limbiques.

Nous avons observé des relations préférentielles de proximité entre les neurones SP et 5-HT du NRD caudal. Des fibres SP avaient été aperçues au voisinage immédiat de neurones 5-HT du NRD en microscopie de fluorescence (Ljungdahl *et al.*, 1978), mais nous avons été les premiers à constater, en microscopie électronique, l'existence de contacts étroits entre ces deux types d'éléments. La présence de rNK1 sur des cellules contactées synaptiquement par des terminaisons SP avait cependant fait l'objet d'observations

antérieures, dans la moelle épinière et le striatum chez le rat (McLeod *et al.*, 1998, 1999; Li *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004).

Les relations intimes que nous avons démontrées entre la SP et la 5-HT dans le NRD pourraient être à l'origine d'interactions locales entre les deux systèmes (voir aussi Commons & Valentino, 2002; Valentino *et al.*, 2003) et rendre compte d'observations antérieures comme l'augmentation de la décharge des neurones 5-HT et la désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} par suite d'un traitement chronique avec un antagoniste NK1 ou chez la souris KO rNK1 (Froger *et al.*, 2001; Haddjeri & Blier, 2001; Conley *et al.*, 2002; Guiard *et al.*, 2006, 2007).

Nos mesures de la distance minimale moyenne entre terminaisons SP et dendrites rNK1-positives dans le NRD caudal ont indiqué que l'innervation SP était plus dense autour des neurones 5-HT que des neurones non 5-HT, suggérant que la localisation subcellulaire du rNK1 dans ces deux types cellulaires pourrait être déterminée par la teneur ambiante en SP. Dans certaines lignées de cellules transfectées, il a été montré que de fortes concentrations en SP peuvent provoquer la séquestration du rNK1 dans le cytoplasme, alors que de faibles concentrations favorisent son adressage membranaire (Roosterman *et al.*, 2004). Ceci nous a conduit à suggérer que la localisation cytoplasmique du rNK1 dans les neurones 5-HT *in vivo* soit due à l'internalisation soutenue de ces récepteurs en raison d'une activation tonique par la SP endogène, tel que précédemment proposé pour les récepteurs SS2A dans les régions cérébrales fortement innervées par la somatostatine (Dournaud *et al.*, 1998).

L'étroite proximité entre les afférences SP et les neurones 5-HT du NRD appuie donc notre hypothèse d'une activation tonique des rNK1 sous l'effet d'une libération synaptique (ou voisine) de SP sur ces neurones. Elle pourrait aussi refléter l'existence de signaux de guidage ayant dirigé la croissance des axones SP spécifiquement vers cette population de neurones. Un tel phénomène a été décrit dans le cas des axones 5-HT innervant le prosencéphale (Petit *et al.*, 2005).

Enfin, nous avons identifié la plupart des neurones non 5-HT porteurs de rNK1 membranaire comme étant GABAergiques. Sachant que les terminaisons SP ne sont jamais trouvées à proximité de ces neurones, cette donnée suggère que, dans le NRD, le contrôle GABAergique de l'activité des neurones 5-HT (Nishikawa & Scatton, 1985) pourrait être modulé par une transmission volumique de la SP (Zupanc, 1996). Ceci semble d'autant

plus plausible que les terminaisons éloignées des neurones non 5-HT se sont avérées moins souvent synaptiques.

II-3 : À propos des manipulations de la distribution et de l'expression du récepteur NK1 dans le NRD caudal

Pour donner suite à notre premier article, il fallait évidemment chercher à mieux comprendre la prédominance du rNK1 dans le cytoplasme des neurones 5-HT et sur la membrane des neurones non 5-HT du NRD. Connaissant les relations topologiques et synaptiques préférentielles entre terminaisons axonales SP et neurones 5-HT dans le NRD, nous voulions aussi étoffer l'hypothèse d'une action soutenue du neuropeptide endogène comme responsable d'une internalisation du rNK1 dans ces neurones.

Après un traitement subchronique (7 jours) et chronique (21 jours) avec l'antagoniste NK1, RP67580, la distribution du rNK1 est apparue significativement modifiée dans les neurones 5-HT du NRD caudal : la densité de ces récepteurs était augmentée dans leur cytoplasme, et même davantage sur leur membrane plasmique. Sachant qu'aucune hausse de densité membranaire n'a été observée 1 h après une injection unique de RP67580, les effets du traitement subchronique pouvaient difficilement être attribués à la dernière injection (7^{ème} jour).

Ces augmentations de densité du récepteur ont pu être reliées à la stimulation de l'expression du gène codant pour le rNK1 dans le NRD, tel que mis en évidence par l'hybridation *in situ* après 7 et 21 jours de traitement. L'augmentation d'expression pouvait refléter le déclenchement d'une cascade moléculaire impliquant l'activation de CREB ayant stimulé le promoteur du gène du rNK1 via sa séquence régulatrice CRE (ex: Seybold *et al.*, 2003). Cependant, à la suite de l'administration chronique de l'antagoniste (où la hausse de densité membranaire atteignait un pic), nous avons mesuré des niveaux de transcription moins élevés qu'après 7 jours de traitement. Ceci pouvait traduire la saturation d'un mécanisme moléculaire déclenché en réponse à la fixation de l'antagoniste, tel que proposée par Wan *et al.* (2006) pour expliquer la plus grande augmentation de transcription et de traduction du gène du rNK1 dans les neurones corticaux après 72 h qu'après 48 h de traitement avec la morphine. Une telle augmentation de densité membranaire du rNK1 (sans hausse de production du récepteur dans le cytoplasme) suggérait fortement l'intervention

d'un mécanisme d'adressage à la membrane, tel que sont venues le confirmer les observations après lésion habénulaire.

En effet, la lésion bilatérale de l'habenula, qui a éliminé une grande partie de l'immunoréactivité SP dans le NRD caudal, s'est accompagnée d'une hausse significative (59%) de la densité membranaire du rNK1 dans les neurones 5-HT, sans augmentation de la densité cytoplasmique. Il est possible que cette augmentation de densité membranaire ait été moins importante que celle observée après le traitement subchronique (120%) et chronique (180%) avec l'antagoniste en raison de l'absence d'activation du gène du rNK1, telle que reflétée par la quantité moindre de protéine dans le cytoplasme. Elle pouvait aussi dépendre d'une dénervation SP incomplète du noyau, puisqu'il existe d'autres sources minoritaires de SP pour le NRD, comme les neurones de la PAG (Hökfelt *et al.*, 1977; Cuello & Kanazawa, 1978; Ljungdahl *et al.*, 1978). La perte d'un ou de plusieurs transmetteurs autres que la SP pourrait également être en cause. En effet, une partie des afférences habénulaires du NRD sont cholinergiques (Ljungdahl *et al.*, 1978; Neckers, 1979; Gallardo & Pasquier, 1980) et l'activité des neurones 5-HT du NRD pourrait être régulée par l'ACh, puisque ces neurones sont dotés de récepteurs nicotiniques fonctionnels (Commons, 2008; Galindo-Charles *et al.*, 2008).

À l'instar de nombreux autres RCPG, le rNK1 est très mobile, et ses agonistes (SP et dérivés) sont connus pour induire une désensibilisation persistante par endocytose (Garland *et al.*, 1994; Mantyh, 1995; Smith *et al.*, 1999; Ferguson, 2001; Harrison & Geppetti, 2001; Simmons, 2006). Par exemple, Mantyh a montré en 1995 qu'environ 60% des rNK1 du striatum de rat sont internalisés dans la minute suivant une injection stéréotaxique de SP. Pour leur part, Smith et collaborateurs ont observé une forte internalisation du rNK1 dans l'amygdale de la gerbille après 1 h de stress de contention, effet bloqué par un prétraitement avec l'antagoniste NK1 L-760,735. Dans la moelle épinière par exemple, l'internalisation induite par la SP est augmentée lors d'une stimulation douloureuse (Allen *et al.*, 1999) et abolie en présence de l'antagoniste L-703,606 (Marvizón *et al.*, 1997). Ces études ont conduit notamment à la suggestion que l'internalisation du rNK1 fournisse une image spatiale de la localisation et de l'intensité de la libération de SP. Une *down-regulation* par dégradation du rNK1 a aussi été observée *in vitro* après stimulation chronique avec la SP (Cottrell *et al.*, 2006). Sachant maintenant que la SP est libérée sur/à proximité des neurones 5-HT du NRD, il est raisonnable de croire qu'une activation tonique par la SP pourrait être responsable de l'internalisation soutenue des rNK1 dans cette population

cellulaire chez l'animal normal. Une telle hypothèse a déjà été envisagée par Henry et collaborateurs (1999) pour expliquer l'activation tonique des rNK1 dans la corne dorsale de la moelle épinière durant la deuxième phase d'hyperalgésie du test à la formaline chez le rat.

Nos résultats suggèrent qu'en l'absence d'activation par la SP, le rNK1 ne serait plus internalisé et/ou verrait son trafic vers la membrane stimulé, augmentant ainsi sa disponibilité à la surface des neurones 5-HT. Par contre, les neurones non 5-HT du NRD (éloignés des terminaisons SP et porteurs de rNK1 membranaires) ne seraient pas affectés par la suppression de l'*input* SP. Les différences de trafic du rNK1 observées entre neurones 5-HT et neurones non 5-HT (GABA) du NRD pourraient aussi traduire l'existence de voies de transduction distinctes, tel qu'il a déjà été proposé pour rendre compte de l'internalisation des récepteurs 5-HT_{1A} dans les neurones 5-HT du NRD mais pas dans les neurones non 5-HT de l'hippocampe, par suite d'un traitement aigu avec l'agoniste spécifique 8-OH-DPAT (Riad *et al.*, 2001). De manière intéressante, un trafic différentiel du rNK1 a aussi été observé dans les neurones DA versus non-DA de la substance noire chez des rats traités à l'apomorphine et soumis à une stimulation auditive intense (Lessard & Pickel, 2005), protocole expérimental connu pour entraîner une baisse de la libération de SP dans la substance noire (Shirayama *et al.*, 2000).

Les mécanismes moléculaires à travers lesquels l'internalisation et le trafic du rNK1 se produisent *in vivo*, ainsi que les différences de recyclage du récepteur dans les neurones 5-HT et non 5-HT du NRD en réponse au RP67580 ou à la désafférentation SP, restent à élucider. Tel que nous l'avons vu dans l'introduction générale, la fonction des RCPG est régulée par des interactions avec une variété de partenaires moléculaires (revu dans Ferguson, 2001; Piñeyro, 2009). Dans des lignées de cellules transfectées, il a été montré que les kinases couplées aux RCPG (GRKs) ainsi que les β -arrestines participent au découplage et à l'endocytose du rNK1 en réponse à la SP (McConalogue *et al.*, 1999; Martini *et al.*, 2002; Jorgensen *et al.*, 2008). Il serait donc très intéressant d'examiner la localisation subcellulaire des GRKs et des β -arrestines dans les neurones du NRD immunoréactifs pour le rNK1 (5-HT et non 5-HT), en utilisant des conditions expérimentales similaires à celle de notre second article. La localisation de ces molécules devrait changer après dénervation SP du NRD, qui affecte apparemment l'internalisation, mais non après un traitement chronique avec le RP67580, qui semble déclencher une voie de transduction distincte.

Si l'on en revient à l'hypothèse de rNK1 constitutivement cytoplasmiques, une autre possibilité reste à examiner. Au sein des neurones 5-HT du NRD caudal, les rNK1 pourraient être confinés à des compartiments intracellulaires en attente d'adressage membranaire, tel que proposé dans le cas des récepteurs δ -opioïdes soumis à des stimuli prolongés (Cahill *et al.*, 2001; Gendron *et al.*, 2006). Plusieurs conditions comme l'inflammation chronique, la douleur neuropathique, le traitement prolongé à la morphine ou encore le stress induisent en effet le trafic membranaire des récepteurs δ -opioïdes (revu dans Bie & Pan, 2007). En lien avec cette alternative, il faut aussi considérer la notion de 'chaperons pharmacologiques'. Ce concept (revu par Bernier *et al.*, 2004) implique l'existence de ligands, principalement des antagonistes, capables de prénéter dans le neurone et d'y faciliter la maturation et l'adressage membranaire d'un RCPG en cours de synthèse. Dans notre cas, l'antagoniste NK1, RP67580, pourrait jouer ce rôle de chaperon pharmacologique, augmentant ainsi la disponibilité des rNK1 à la membrane plasmique.

III - Intégration aux circuits de l'humeur

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'influence des antagonistes du rNK1 sur l'activité des neurones 5-HT du NRD, comme la modulation par la SP des neurones NA du locus coeruleus (Blier *et al.*, 2004; Haddjeri & Blier, 2008), des neurones enképhalinerigiques de la PAG et des neurones à glutamate du NRD (Baraban & Aghajanian, 1981; Commons & Valentino 2002; Liu *et al.*, 2002; Commons *et al.*, 2005). Nous pouvons maintenant ajouter que les propriétés antidépressives des antagonistes du rNK1 pourraient impliquer une combinaison d'effets directs et indirects sur l'activité des neurones 5-HT du NRD. Sachant l'existence d'une sous-population de neurones 5-HT exprimant le rNK1 dans le NRD caudal du rongeur, il devient vraisemblable que ces neurones soient impliqués dans la régulation de l'humeur par la SP, de même que dans ses perturbations imputées à un dysfonctionnement du système 5-HT.

En consultant la littérature, il est intéressant de constater que les neurones 5-HT présents dans la moitié caudale du NRD sont sélectivement activés par des conditions de stress incontrôlable (Maier *et al.*, 1993; Grahn *et al.*, 1999). De plus, les projections du NRD caudal sur les aires cérébrales limbiques (Vertes, 1991; Vertes & Kocsis, 1994) et la libération accrue de 5-HT dans ces régions pourraient être indispensables à la préparation des réponses comportementales aux conditions de stress (Maier *et al.*, 1995). Ainsi, c'est

dans cette portion caudale du NRD que la SP pourrait intervenir directement dans la régulation sérotoninergique des émotions.

Il a aussi été proposé que le contrôle des comportements émotionnels et sociaux puisse dépendre du fonctionnement de l'habenula. Par exemple, les lésions de l'habenula modifient les réponses comportementales aux stress incontrôlables (Amat *et al.*, 2001), changent l'état d'anxiété (Murphy *et al.*, 1996) et atténuent la stimulation cérébrale de récompense (Morissette & Boye, 2008). En 1977, Wang et Aghajanian ont montré un contrôle de l'activité du NRD par l'habenula latérale, qui reçoit elle-même des afférences provenant de plusieurs aires limbiques (Geisler & Trimble, 2008; Hikosaka *et al.*, 2008). De plus, certaines études d'imagerie cérébrale démontrent une co-variation d'activité dans le NRD et l'habenula chez les patients déprimés (Morris *et al.*, 1999). Un contrôle de la libération de 5-HT dans le NRD par l'habenula a aussi été démontré récemment chez le rat (Yang *et al.*, 2008). En démontrant un mécanisme moléculaire possiblement impliqué dans la modulation de l'activité des neurones 5-HT par la SP, nos résultats confortent ainsi l'hypothèse d'un rôle particulier des projections SP de l'habenula sur le NRD dans la régulation de l'humeur.

IV - Projets complémentaires

Nous avons vu que les antagonistes du rNK1, au même titre que les ISRS, entraînent une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} dans le NRD, ainsi que des effets comportementaux antidépresseurs. On sait aussi que la désensibilisation (internalisation) persistante des autorécepteurs 5-HT_{1A}, ainsi que le maintien de la sensibilité des hétérorécepteurs 5-HT_{1A}, sont nécessaires à l'obtention d'un effet thérapeutique dépendant d'une augmentation de la neurotransmission 5-HT. On se rappellera que Haddjeri et Blier (2001) ont montré chez le rat qu'un traitement aigu ou chronique avec un antagoniste NK1 augmente la fréquence de décharge des neurones 5-HT du NRD. Dans l'hippocampe, ces mêmes auteurs ont observé une augmentation de l'activation des hétérorécepteurs 5-HT_{1A} après le traitement chronique avec l'antagoniste NK1. Chez la souris et le cobaye, l'administration d'une dose unique d'un tel antagoniste semble également augmenter le taux de décharge des neurones 5-HT du NRD (Santarelli *et al.*, 2001; Conley *et al.*, 2002). De plus, chez la souris KO pour le rNK1, on observe une augmentation du taux de décharge spontanée des neurones 5-HT du NRD, comme lors de l'administration systémique d'un

antagoniste NK1 chez la souris (Santarelli *et al.*, 2001) ou chez le rat (Haddjeri & Blier, 2001). Chez les souris KO rNK1, les autorécepteurs 5-HT_{1A} sont apparus désensibilisés, conduisant à une diminution de la réponse neuronale lors de l'administration d'agonistes (Santarelli *et al.*, 2001), ainsi qu'à une potentialisation de l'efflux cortical de 5-HT après traitement avec un ISRS (Froger *et al.*, 2001). Une telle désensibilisation constitutive de l'autorécepteur 5-HT_{1A} chez la souris KO rNK1 pourrait représenter un phénomène adaptatif, comme le suggèrent une baisse de l'ARNm et du nombre des sites de radioliation 5-HT_{1A} dans le NRD (Froger *et al.*, 2001). Lors de divers tests comportementaux, les souris KO rNK1 présentent aussi des réponses « d'anxiété » amoindries comparativement à leurs congénères sauvages (Santarelli *et al.*, 2001). Dans ce contexte, on peut envisager deux perspectives d'avenir où une stratégie expérimentale comparable à celle utilisée au cours de nos travaux pourrait livrer des informations nouvelles quant à l'interaction des systèmes SP/rNK1 et 5-HT lors du traitement aux antidépresseurs.

Connaissant la localisation cellulaire et subcellulaire des autorécepteurs 5-HT_{1A} dans le NRD (Riad *et al.*, 2000; 2001), il serait intéressant d'examiner leur distribution en immunocytochimie quantitative par suite de traitements aigu et chronique avec un antagoniste du rNK1. Cet examen devrait montrer si l'association désensibilisation/internalisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} se manifeste aussi sous l'action des antidépresseurs de type anti-rNK1. Une internalisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} soulignerait l'importance de ce phénomène comme déterminant de l'efficacité thérapeutique des antidépresseurs. Il serait aussi possible d'examiner les effets d'une combinaison des deux types de traitement ISRS et anti-rNK1; l'information ainsi recueillie pourrait s'avérer importante en vue de la définition des conditions d'un traitement conjoint avec ces deux composés.

Il serait également intéressant d'examiner la distribution ultrastructurale de l'autorécepteur 5-HT_{1A} chez la souris KO pour le rNK1. On pourrait s'attendre à ce que l'autorécepteur 5-HT_{1A} soit internalisé chez le mutant nul, puisqu'il apparait désensibilisé et que le taux de décharge spontanée des neurones 5-HT du NRD est augmenté chez ces souris. Ces résultats pourraient alors être comparés à ceux obtenus après un traitement chronique avec un antagoniste des rNK1, pour savoir si le blocage constitutif des récepteurs NK1 équivaut à un traitement prolongé ou précoce avec l'antagoniste. Ici encore, la démonstration d'une internalisation apporterait une preuve formelle de l'association désensibilisation/internalisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A}.

V – Conclusion générale

On peut s'interroger sur la possibilité d'effectuer un jour chez l'humain des études comparables à celles présentées dans le présent ouvrage. À l'heure actuelle, des méthodes d'imagerie cérébrale sont en cours de développement pour la visualisation et la mesure du potentiel de liaison des rNK1, non seulement chez l'animal mais aussi chez l'humain (ex : Bergström *et al.*, 2004; Haneda *et al.*, 2008). Comme on a pu le faire avec le [¹⁸F]MPPF dans le cas du récepteur 5-HT_{1A} de la 5-HT (Aznavour & Zimmer, 2007; Aznavour *et al.*, 2009), il est concevable que la tomographie par émission de positons (PET) permette un jour de mesurer avec une certaine précision le potentiel de liaison d'un radioligand spécifique du rNK1 dans une région anatomique aussi petite que le NRD. Dans le cas d'un trafic massif du récepteur, il se pourrait que des changements du potentiel de liaison soient alors détectables, comme pour l'internalisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} par suite de l'administration d'un comprimé de fluoxétine à des volontaires sains (Sibon *et al.*, 2008). Cependant, il faudra sans doute attendre encore longtemps avant qu'une méthode d'imagerie ne puisse démontrer des changements de localisation aussi subtils que ceux que nous avons pu mettre en évidence par immunocytochimie ultrastructurale et qui, selon toute vraisemblance, affectent uniquement une sous-population de neurones 5-HT du DRN.

Cette thèse et son annexe s'inscrivent ainsi dans un cadre général qu'on pourrait définir comme celui de l'implication des neuropeptides et de leur(s) récepteur(s) dans les pathologies mentales et leur traitement. Reposant principalement sur l'utilisation de l'immunocytochimie en microscopies photonique et électronique, elles mettent en lumière divers aspects cellulaires et moléculaires de la neuromodulation peptidergique *in vivo*. Ce faisant, au-delà des aspects descriptifs des résultats présentés ici, nous espérons avoir ainsi montré qu'une approche morphologique visant à préciser la localisation de molécules neuroactives dans divers contextes fonctionnels peut conduire à la découverte de principes neurobiologiques fondamentaux, susceptibles de contribuer à l'identification et la caractérisation de cibles thérapeutiques potentielles.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

(Introduction et discussion générales)

- Acsády L, Katona I, Gulyás AI, Shigemoto R et Freund TF (1997) Immunostaining for substance P receptor labels GABAergic cells with distinct termination patterns in the hippocampus. *J Comp Neurol* 378:320-336.
- Adelson D, Lao L, Zhang G, Kim W et Marvizón JCG (2009) Substance P release and neurokinin-1 receptor activation in the rat spinal cord increase with the firing frequency of C-fibers. *Neuroscience* 161:538-553.
- Allen BJ, Li J, Menning PM, Rogers SD, Ghilardi J, Mantyh PW et Simone DA (1999) Primary afferent fibers that contribute to increased substance P receptor internalization in the spinal cord after injury. *J Neurophysiol* 81:1379-1390.
- Amat J, Sparks PD, Matus-Amat P, Griggs J, Watkins LR et Maier SF (2001) The role of the habenular complex in the elevation of the dorsal raphe nucleus serotonin and the changes in the behavioral responses produced by uncontrollable stress. *Brain Res* 917:118-226.
- Ardelt AA, Karpitsky VV, Krause JE et Roth KA (1996) The neostriatal mosaic: basis for the changing distribution of neurokinin-1 receptor immunoreactivity during development. *J Comp Neurol* 376:463-475.
- Azmitia EC et Segal M (1978) An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 179:641-668.
- Aznavour N et Zimmer L (2007) [¹⁸F]MPPF as a tool for the in vivo imaging of 5-HT_{1A} receptors in animal and human brain. *Neuropharmacology* 52:695-707.
- Aznavour N, Benkelfat C, Gravel P, Aliaga A, Rosa-Neto P, Bedell B, Zimmer L et Descarries L (2009) MicroPET imaging of 5-HT_{1A} receptors in rat brain: a test-retest [¹⁸F]MPPF study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 3:53-62.
- Baker KG, Halliday GM et Tork (1990) Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* 301:147-161.

- Baker KG, Halliday GM, Hornung JP, Geffen LB, Cotton RG et Tork I (1991) Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 42:757-775.
- Baraban JM et Aghajanian GK (1981) Noradrenergic innervation of serotonin neurons in the dorsal raphe: Demonstration by electron microscopic autoradiography. *Brain Res* 204:1-11.
- Barbaresi P (1998) Immunocytochemical localization of substance P receptor in rat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopy study. *J Comp Neurol* 398:473-490.
- Bargmann W, Lindner E et Andres KH (1967) Über synapsen an endokrinen epithelzellen und die definition sekretorischer neurone – Untersuchungen am Zwischenlappen der katzen hypophyse. *Z. Zellforsch* 77:282-298.
- Bassi GS, Nobre MJ, de Araújo JE et Brandão ML (2007) Anxiogenic effects of activation of NK-1 receptors of the dorsal periaqueductal grey as assessed by the elevated plus-maze, ultrasound vocalizations and tail-flick tests. *Neuropeptides* 41:365-374.
- Baumann B, Bielau H, Krell D, Agelink MW, Diekmann S, Wurthmann C, Trubner K, Bernstein HG, Danos P et Bogerts B (2002) Circumscribed numerical deficit of dorsal raphe neurons in mood disorders. *Psychol Med* 32:93-103.
- Beaudet A et Descarries L (1976) Quantitative data on serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* 111:301-309.
- Beaudet A et Descarries L (1978) The monoamine innervation of rat cerebral cortex: synaptic and nonsynaptic axon terminals. *Neuroscience* 3:851-860.
- Beaudet A et Descarries L (1987) Ultrastructural identification of serotonin neurons. In H.W.M. Steinbusch (Ed.), *Methods in the Neuroscience, Monoaminergic Neurons: Light Microscopy and Ultrastructure*, John Wiley & Sons, Chicester, pp. 265-313.
- Beaujouan JC, Heuillet E, Petitet F, Saffroy M, Torrens Y et Glowinski J (1993) Higher potency of RP67580 in the mouse and the rat compared with other nonpeptide and peptide tachykinin NK1 antagonists. *Br J Pharmacol* 108:793-800.

- Beer M, Kennett GA et Curzon G (1990) A single dose of 8-OH-DPAT reduces raphe binding of [³H]8-OH-DPAT and increases the effect of raphe stimulation on 5-HT metabolism. *Eur J Pharmacol* 178:179-187.
- Bergström M, Hargreaves RJ, Burns HD, Goldberg MR, Sciberras D, Reines SA, Petty KJ, Ogren M, Antoni G, Langstrom B, Eskola O, Scheinin M, Solion O, Majumdar AK, Constanzer ML, Battisti WP, Bradstreet TE, Gargano C et Hietala J (2004) Human positron emission tomography studies of brain neurokinin 1 receptor occupancy by aprepitant. *Biol Psychiatry* 55:1007-1012.
- Bernier V, Bichet DG et Bouvier M (2004) Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol* 4:528-533.
- Bie B et Pan ZZ (2007) Trafficking of central opioid receptors and descending pain inhibition. *Mol Pain* 3:37, pp.1-7.
- Björklund A, Emson PC, Gilbert RF et Skagerberg G (1979) Further evidence for the possible coexistence of 5 hydroxytryptamine and substance P in medullary raphe neurones of rat brain. *Brit J Pharmacol* 66:112-113.
- Blier P, Piñeyro G, el Mansari M, Bergeron R et De Montigny C (1998) Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Ann NY Acad Sci* 861:204-216.
- Blier P et De Montigny C (1994) Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci* 15:220-226.
- Blier P, Gobbi G, Haddjeri N, Santarelli L, Mathew G et Hen R (2004) Impact of substance P receptor antagonism on the serotonin and norepinephrin systems: relevance to the antidepressant/anxiolytic response. *J Psychiatry Neurosci* 29:208-218.
- Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ et Arango (2005) More tryptophane hydroxylase in the brainstem dorsal raphe nucleus in depressed suicides. *Brain Res* 1041:19-28.
- Bondy B, Baghai TC, Minov C, Schüle C, Schwartz MJ, Zwanzger P, Rupprecht R et Möller HJ (2002) Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results. *Biol Psychiatry* 53:38-542.
- Brodin E, Rosén A, Schott E et Brodin K (1994) Effects of sequential removal of rats from group a cage, and of individual housing of rats, on substance P, cholecystokinin and

somatostatin levels in the periaqueductal grey and limbic regions. *Neuropeptides* 26:253-260.

- Brownstein MJ, Mroz EA, Kizer JS, Palkovits M et Leeman SE (1976) Regional distribution of substance P in the brain of the rat. *Brain Res* 116:299-305.
- Caberlotto L, Hurd YL, Murdock P, Wahlin JP, Melotto S, Corsi M et Carletti R (2003) Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain. *Eur J Neurosci* 17:1736-1746.
- Cahill CM, McClellan KA, Morinville A, Hoffert C, Hubatsch D, O'Donnell D et Beaudet A (2001a) Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors in the rat central nervous system: evidence for somatodendritic labeling and antigen-specific cellular compartmentalization. *J Comp Neurol* 440:65-84.
- Cahill CM, Morinville A, Lee MC, Vincent JP, Collier B et Beaudet A (2001b) Prolonged morphine treatment targets δ opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances δ -mediated antinociception. *J Neurosci* 21:7598-7607.
- Cellier E, Barbot L, Iyengar S et Couture R (1999) Characterization of central and peripheral effects of septide with the use of five tachykinin NK1 receptor antagonists in the rat. *British J Pharmacol* 127:717-728.
- Chan-Palay V, Jonsson G et Palay SL (1978) Serotonin and substance P coexist in neurons of the rat's central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:1582-1586.
- Chang MM et Leeman SE (1970) Isolation of sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J Biol Chem* 245:4784-4790.
- Charara A et Parent A (1998) Chemoarchitecture of the primate dorsal raphe nucleus. *J Chem Neuroanat* 15:111-127.
- Cheeta S, Tucci S, Sandhu J, Williams AR, Rupniak NMJ et File SE (2001) Anxiolytic actions of the substance P (NK1) receptor antagonist L-760735 and the 5-HT_{1a} agonist 8-OH-DPAT in the social interaction test in gerbils. *Brain Res* 915:170-175.
- Commons KG et Valentino RJ (2002) Cellular basis for the effects of substance P in the periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* 447:82-97.

- Commons KG, Beck SG et Bey VW (2005) Two populations of glutamatergic axons in the rat dorsal raphe nucleus defined by the vesicular glutamate transporters 1 and 2. *Eur J Neurosci* 21:1577-1586.
- Commons KG (2008) Alpha4 containing nicotinic receptors are positioned to mediate postsynaptic effects on 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 153:851-859.
- Conley RK, Cumberbatch MJ, Mason GS, Williamson DJ, Harrison T, Locker K, Swain C, Maubach K, O'Donnell R, Rigby M, Hewson L, Smith D et Rupniak NMJ (2002) Substance P (neurokinin 1) receptor antagonists enhance dorsal raphe neuronal activity. *J Neurosci* 22:7730-7736.
- Cottrell GS, Padilla B, Pikios S, Roosterman D, Steinhoff M, Gehring D, Grady EF et Bunnett NW (2006) Ubiquitin-dependant down-regulation of the neurokinin-1 receptor. *J Biol Chem* 281:27773-27783.
- Cuello AC et Kanazawa I (1978) The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 178:129-156.
- Czachura JF et Rasmussen K (2000) Effects of acute and chronic administration of fluoxetine on the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362:266-275.
- Czéch B, Fuchs E et Simon M (2006) NK1 receptor antagonists under investigation for the treatment of affective disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 15:479-486.
- Dableh LJ, Yashpal K, Rochford J et Henry JL (2005) Antidepressant-like effects of neurokinin receptor antagonists in the forced swim test in the rat. *Eur J Pharmacol* 507:99-105.
- Dahlström A et Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20:398-399.
- Dam TV, Escher E et Quirion R (1990) Visualization of neurokinin-3 receptor sites in rat brain using the highly selective ligand [³H]senktide. *Brain Res* 506:175-179.
- David DJ, Froger N, Guiard B, Przybylski C, Jego G, Boni C, Hunt SP, De Felipe C, Hamon M, Jacquot C, Gardier AM et Lanfumey L (2004) Serotonin transporter in substance P (neurokinin 1) receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol* 492:41-48.

- Descarries L, Beaudet A et Watkins KC (1975) Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* 100:563-588.
- Descarries L, Watkins KC et Lapierre Y (1977) Noradrenergic axon terminals in the cerebral cortex of rat. III. Topometric ultrastructural analysis. *Brain Res* 133:197-222.
- Descarries L, Watkins KC, Garcia S et Beaudet A (1982) The serotonin neurons in dorsal raphe nucleus of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol* 207:239-254.
- Descarries L, Berthelet F, Garcia S et Beaudet A (1986) Dopaminergic projection from nucleus raphe dorsalis to neostriatum in the rat. *J Comp Neurol* 249:511-520.
- Descarries L, Riad M et Parent M (2009) Ultrastructure of the serotonin innervation in mammalian central nervous system. In *The Behavioural Neurobiology of Serotonin*, C.P. Muller and B. Jacobs eds. Elsevier, Amsterdam, sous presse.
- Dong J, de Montigny C et Blier P (1997) Effect of acute and repeated versus sustained administration of the 5-HT_{1A} receptor agonist ipsapirone: electrophysiological studies in the rat hippocampus and dorsal raphe. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol* 356:303-311.
- Dournaud P, Boudin H, Schonbrunn A, Tannenbaum G et Beaudet A (1998) Interrelationships between somatostatin sst_{2A} receptors and somatostatin-containing axons in rat brain : evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin. *J Neurosci* 18:1056-1071.
- Duggan AW (2000) Neuropeptide spread in the brain and spinal cord. *Prog Brain Res* 125:369-380.
- Dugovic C (2001) Role of serotonin in sleep mechanisms. *Rev Neurol* 157(Pt2):S16-19.
- Ebner K et Singewald N (2006) The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids* 31:251-272.
- Ebner K, Sartori SB et Singewald N (2009) Tachykinin receptors as therapeutic targets in stress-related disorders. *Curr Pharm Des* 15:1647-1674.
- Euler US et Gaddum JH (1931) An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 72:74-87.

- Feldman JM et Lee EM (1985) Serotonin content of foods: effect on urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid. *Am J Clin Nutr* 42:639-643.
- Ferguson SSG (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1-24.
- Fong TM, Yu H et Strader CD (1992) Molecular basis for the species selectivity of the neuokinin-1 antagonists CP-96,345 and RP67580. *J Biol Chem* 267:25668-25671.
- Fong TM, Yu H et Strader CD (1992) The extracellular domain of substance P (NK1) receptor comprises part of the ligand binding site. *Biophys J* 62:29-60.
- Froger N, Gardier AM, Moratalla R, Alberti I, Lena I, Boni C, De Felipe C, Rupniak NMJ, Hunt SP, Jacquot C, Hamon M et Lanfumey L (2001) 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A} autoreceptor adaptative changes in substance P (neurokinin 1) receptor knock-out mice mimic antidepressant-induced desensitization. *J Neurosci* 21:8188-88197.
- Galindo-Charles L, Hernandez-Lopez S, Galarraga E, Tapia D, Bargas J, Garduno J, Frias-Dominguez C, Drucker-Colin R et Mihailescu S (2008) Serotonergic dorsal raphe nucleus neurons possess functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Synapse* 62:601-615.
- Gallardo MRGP et Pasquier DA (1980) Increase in activity of choline acetyltransferase in the dorsal raphe nucleus following habenular deafferentation. *Brain Res* 194:578-582.
- Garland AM, Grady EF, Payan DG, Vigna SR et Bunnett NW (1994) Agonist-induced internalization of substance P (NK1) receptor expressed in epithelial cells. *Biochem J* 303:177-186.
- Garret C, Carruette A, Fardin V, Moussaoui S, Peyronel JF, Blanchard JC et Laduron PM (1992) RP67580, a potent and selective substance P non-peptide antagonist. *C R Acad Sci III* 314:199-204.
- Geisler S et Trimble M (2008) The lateral habenula: no longer neglected. *CNS Spectr* 13: 484-489.
- Gendron L, Lucido AL, Mennicken F, O'Donnell D, Vincent JP, Stroh T et Beaudet A (2006) Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of δ -opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci* 26:953-962.

- Genicot C, Christophe B, Collart P, Gillard M, Goossens L, Hénichart JP, Lassoie MA, Moureau F, Neuwels M, Nicolas JM, Pasau P, Quéré L, Ryckmans T, Stiernet F, Taverne T et Van Keulen BJ (2003) Discovery of orally bioavailable NK1 receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Letters* 13:437-442.
- Gerhardt CC, Leysen JE, Planta RJ, Vreugdenhil E et Van Heerikhuizen H (1997) Functional characterisation of a 5-HT₂ receptor cDNA cloned from *Lymnaea stagnalis*. *Eur J Pharmacol* 311:249-258.
- Gobert A, Brocco M, Dekeyne A, Di Cara B, Bouchez G, Lejeune F, Gannon RL et Millan MJ (2008) Neurokinin1 antagonists potentiate antidepressant properties of serotonin reuptake inhibitors, yet blunt their anxiogenic actions: a neurochemical, electrophysiological, and behavioral characterization. *Neuropsychopharmacology* (sous presse).
- Gobbi G, Cassano T, Radja F, Morgese MG, Cuomo V, Santarelli L, Hen R et Blier P (2007) Neurokinin 1 receptor antagonism requires norepinephrine to increase serotonin function. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:328-338.
- Gouarderes C, Jhamandas K, Cridland R, Cros J, Quirion R et Zajac JM (1993) Opioid and substance P receptor adaptations in the rat spinal cord following sub-chronic intrathecal treatment with morphine and naloxone. *Neuroscience* 54:799-807.
- Gozlan H, El Mestikawy S, Pichat L, Glowinsky J et Hamon M (1983) Identification of presynaptic serotonin receptors using a new ligand: ³H-PAT. *Nature* 305:140-142.
- Grahn RE, Will MJ, Hammack SE, Maswood S, McQueen MB, Watkins LR et Maier SF (1999) Activation of serotonin-immunoreactive cells of the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Res* 826:35-43.
- Guiard BP, Przybylski C, Guilloux JP, Seif I, Froger N, De Felipe C, Hunt SP, Lanfumey L et Gardier AM (2004) Blockade of substance P (neurokinin 1) receptors enhances extracellular serotonin when combined with a selective serotonin reuptake inhibitor: an in vivo microdialysis study in mice. *J Neurochem* 89:54-63.
- Guiard BP, Lanfumey L, Gardier AM (2006) Microdialysis approach to study serotonin outflow in mice following selective serotonin reuptake inhibitors and substance P

(neurokinin 1) receptor antagonist administration: a review. *Curr Drug Targets* 7:187-201.

- Guiard BP, Guilloux JP, Reperant C, Hunt SP, Toth M et Gardier AM (2007) Substance P neurokinin 1 receptor activation within the dorsal raphe nucleus controls serotonin release in the mouse frontal cortex. *Mol Pharmacol* 72:1411-1418.
- Guy J, Vaudry H et Pelletier G (1982) Further studies on the identification of neurons containing immunoreactive alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) in the rat brain. *Brain Res* 239:265-270.
- Haddjeri N et Blier P (2001) Sustained blockade of neurokinin-1 receptors enhances serotonin neurotransmission. *Biol Psychiatry* 50:191-199.
- Haddjeri N et Blier P (2008) Neurokinin-1 antagonists modulate brain noradrenaline and serotonin interactions. *Eur J Pharmacol* 600:64-70.
- Hagan RM, Beresford IJM, Stables J, Dupere J, Stubbs CM, Elliott PJ, Sheldrick RLG, Chollet A, Kawashima E, McElroy AB et Ward P (1993) Characterization, CNS distribution and function of NK₂ receptors studied using potent NK₂ receptors antagonists. *Regul Pept* 46:9-19.
- Haneda E, Higuchi M, Maeda J, Inaji M, Okauchi T, Ando K, Obayashi S, Nagai Y, Narazaki M, Ikehira H, Nakao R, Zhang MR, Suzuki K, Suzuki H et Suhara T (2007) In vivo mapping of substance P receptors in brains of laboratory animals by high-resolution imaging systems. *Synapse* 61:205-215.
- Harrison S et Geppetti P (2001) Substance P. *Int J Biochem Cell Biol* 33:555-576.
- Hasenöhrl RU, De Souza-Silva MA, Nikolaus S, Tomaz C, Brando ML, Schwarting RKW et Huston JP (2000) Substance P and its role in neural mechanisms governing learning, anxiety and functional recovery. *Neuropeptides* 34:272-280.
- Haycock JW, Kumer SC, Lewis DA, Vrana KE et Stockmeier CA (2002) A monoclonal antibody to tryptophan hydroxylase: applications and identification of the epitope. *J Neurosci Meth* 114:205-212.
- Henry JL (1976) Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. *Brain Res* 114:439-451.

- Henry JL, Yashpal K, Pitcher GM, Chabot JG et Coderre TJ (1999) Evidence for tonic activation of NK-1 receptors during the second phase of the formalin test in the rat. *J Neurosci* 19:6588-6598.
- Herkenham M (1987) Mismatches between neurotransmitter and receptor localizations in brain : observations and implications. *Neuroscience* 23:1-38.
- Herpfer I et Lieb K (2003) Substance P and substance P receptor antagonists in the pathogenesis and treatment of affective disorders. *World J Biol Psychiatry* 4:56-63.
- Hershey AD, Dykema PE et Krause JE (1991) Organization, structure, and expression of the gene encoding the rat substance P receptor. *J Biol Chem* 266:4366-4374.
- Héry F, Faudon M et Ternaux JP (1982) In vivo release of serotonin in two raphe nuclei (raphe dorsalis and magnus) of the cat. *Brain Res Bull* 8:123-129.
- Hikosaka O, Sesack SR, Lecourtier L et Shephard P (2008) Habenula: crossroad between the basal ganglia and th limbic system. *J Neurosci* 28:11825-11829.
- Holst B, Hastrup H, Raffetseder U, Martini L et Schwartz TW (2001) Two active molecular phenotypes of the tachykinin NK1 receptor revealed by G-protein fusions and mutagenesis. *J Biol Chem* 276:19793-19799.
- Hökfelt T (2009) Coexistence of neuromessenger molecules - a perspective. In R Gutierrez (Ed), *Co-Existence and Co-Release of Classical Neurotransmitters*, Springer Science, Berlin.
- Hökfelt T, Ljungdahl A, Terenius L, Elde R et Nilsson G (1977) Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3081-3085.
- Hökfelt T, Ljungdahl A, Steinbusch H, Verhofstad A, Nilsson G, Brodin E, Pernow B et Goldstein M (1978) Immunohistochemical evidence of substance P-like immunoreactivity in some 5-hydroxytryptamine-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 3:517-538.
- Hökfelt T, Millhorn D, Seroogy K, Tsuruo Y, Ceccatelli S, Lindh B, Meister B, Melander T, Schalling M, Bartfai T et Terenius L (1987) Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. *Experientia* 43:768-780.

- Hökfelt T, Broberger C, Xu ZD, Sergeev V, Ubink R et Diez M (2000) Neuropeptides – an overview. *Neuropharmacology* 39:1337-1356.
- Hökfelt T, Bartfai T et Bloom F (2003) Neuropeptides: opportunities for drug discovery. *Lancet Neurol* 2:463-472.
- Holst B, Hastrup H, Raffetseder U, Martini L et Schwartz TW (2001) Two active molecular phenotypes of the tachykinin NK1 receptor revealed by G-protein fusions and mutagenesis. *J Biol Chem* 276:19793-19799.
- Hornung JP (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat* 26:331-343.
- Imai H, Steindler DA et Kitai ST (1986) The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 243:363-380.
- Jones BJ et Blackburn TP (2002) The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav* 71:555-568.
- Jorgensen R, Holliday ND, Hansen JL, Vrecl M, Heding A, Schwartz TW et Elling CE (2008) Characterization of G-protein coupled receptor kinase interaction with the Neurokinin-1 receptor using bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol* 73:349-358.
- Kennett GA, Marcou M, Dourish CT et Curzon G (1987) Single administration of 5-HT_{1A} agonists decreases 5-HT_{1A} presynaptic, but not postsynaptic receptor-mediated responses: relationship to antidepressant-like action. *Eur J Pharmacol* 138:53-60.
- King PJ, Widdowson PS, Doods HN et Williams G (1999) Regulation of neuropeptide Y release by neuropeptide Y receptor ligands and calcium channel antagonists in hypothalamic slices. *J Neurochem* 73:641-646.
- Kirby LG, Pernar L, Valentino RJ et Beck SG (2003) Distinguish characteristics of the serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience* 116:669-638.
- Knowles F et Vollrath L (1965) Synaptic contacts between neurosecretory fibres and pituicytes in the pituitary of the eel. *Nature* 206:1168-1169.

- Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, Reines SA, Liu G, Snavely D, Wyatt-Lnowles Hale JJ, Mills SG, MacCoss M, Swain CJ, Harrison T, Hill RG, Hefti F, Scolnick EM, Cascieri MA, Chichi GG, Sadowski S, Williams A.R., Hewson L, Smith D, Carlson EJ, Hargreaves RJ et Rupniak NMJ (1998) Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 281:1640-1645.
- Kramer MS, Winokur A, Kelsey J, Preskorn SH, Rothschild AJ, Snavely D, Ghosh K, Ball WA, Reines SA, Munjack D, Apter JT, Cunningham L, Kling M, Bari M, Getson A et Lee Y (2004) Demonstration of the efficacy and safety of a novel substance P (NK1) receptor antagonist in major depression. *Neuropsychopharmacology* 29:385-392.
- Kreiss DS et Lucki I (1995) Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 274:866-876.
- Kroeze WK et Roth BL (1998) The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis. *Biol Psychiatry* 44:1128-1142.
- Kubale V, Abramovic Z, Pogacnik A, Sentjure M et Milka Vrecl. Evidence for a role of caveolin-1 in neurokinin-1 receptor plasma-membrane localization, efficient signaling, and interaction with β -arrestin. *Cell Tissue Res* 330:231-245.
- Kuteeva E, Wardi T, Hokfelt T et Orgen SO (2007) Galanine enhances and a galanin antagonist attenuates depression-like behaviour in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:64-69.
- Laird JM, Hargreaves RJ et Hill RG (1993) Effect of RP67580, a non-peptide neurokinin1 receptor antagonist, on facilitation of nociceptive spinal flexion reflex in the rat. *Br J Pharmacol* 109:713-718.
- Léger L, Gay N et Cespuglio R (2002) Neurokinin NK1- and NK3-immunoreactive neurons in serotonergic cell groups in the rat brain. *Neurosci Lett* 323:146-150.
- Lembeck F (1953) Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse, III. Mitteilung. Das Vorkommen und die Bedeutung der Substance P in den dorsalen Wurzeln des Rückenmarks. *Naunyn- Schmiedebergs Arch Pharmacol* 219:197-213.

- Le Poul E, Laaris N, Doucet E, Laporte AM, Hamon M et Lanfumey L (1995) Early desensitization of somato-dendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352:141-148.
- Le Poul E, Boni C, Hanoun N, Laporte AM, Laaris N, Chauveau J, Hamon M et Lanfumey L (2000) Differential adaptation of brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology* 39:110-122.
- Lessard A et Pickel VM (2005) Subcellular distribution and plasticity of neurokinin-1 receptors in the rat substantia nigra and ventral tegmental area. *Neuroscience* 135:1309-1323.
- Leysen JE, Niemegeers CJ, Tollenaere JP et Laduron PM (1978) Serotonergic component of neuroleptic receptors. *Nature* 272:168-171.
- Li H, Leeman SE, Slack BE, Hauser G, Saltsman WS, Krause JE, Blusztajn JK et Boyd ND (1997) A substance P (neurokinin-1) receptor mutant carboxyl-terminally truncated to resemble a naturally occurring receptor isoform displays enhanced responsiveness and resistance to desensitization. *PNAS* 94:9475-9480.
- Li, JL, Wang D, Kaneko T, Shigemoto R, Nomura S et Mizuno N (2000) Relationships between neurokinin-1 receptor and substance P in the striatum: light and electron microscopic immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 418:156-163.
- Li Q, Muma NA et van de Kar LD (1996) Chronic fluoxetine induces a gradual desensitization of 5-HT_{1A} receptors: reductions in hypothalamic and midbrain G_i and G_o proteins and in neuroendocrine responses to a 5-HT_{1A} agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 279:1035-1042.
- Lisi C (2006) The Erspamer archive. *Med Secoli* 18:115-120.
- Liu R, Ding Y et Aghajanian GK (2002) Neurokinins activate local glutamatergic inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* 27:329-340.
- Liu YY, Wong-Riley MTT, Liu JP, Wei XY, Jia Y, Liu HL, Fujiyama F et Ju G (2004) Substance P and enkephalinergic synapses onto neurokinin-1 receptor-

- immunoreactive neurons in the pre-Botzinger complex of rats. *Eur J Neurosci* 19:65-75.
- Lovick TA et Hunt SP (1983) Substance P-immunoreactive and serotonin-containing neurones in the ventral brainstem of the cat. *Neurosci Lett* 36:223-228.
- Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ et Shekhar A (2008) Serotonergic system, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann NY Acad Sci* 1148:86-94.
- Ljungdahl A, Hökfelt T et Nilsson G (1978) Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and terminals. *Neuroscience* 3:861-943.
- Ma QP et Bleasdale C (2002) Modulation of brain monoamines and γ -aminobutyric acid by NK1 receptors in rats. *NeuroReport* 13:1809-1812.
- Maier SF, Grahn RE, Kalman BA, Sutton LC, Wiertelak EP et Watkins LR (1993) The role of the amygdala and dorsal raphe nucleus in mediating the behavioral consequences of inescapable shock. *Behav Neurosci* 107:377-388.
- Maier SF, Grahn RE et Watkins LR (1995) 8-OH-DPAT microinjected in the region of the dorsal raphe nucleus blocks and reverses the enhancement of fear conditioning and interference with escape produced by exposure to inescapable shock. *Behav Neurosci* 109:404-412.
- Maeno H, Kiyama H et Tohyama M (1993) Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. *Mol Brain Res* 18:43-58.
- Mannoury la Cour C, Boni C, Hanoun N, Lesch KP, Hamon M et Lanfumey L (2001) Functional consequences of 5-HT transporter gene disruption on 5-HT(1a) receptor-mediated regulation of dorsal raphe and hippocampal cell activity. *J Neurosci* 21:2178-2185.
- Mantyh PW (1995) Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: Substance P-evoked internalization of its receptor in the rat striatum in vivo. *PNAS* 92:2622-2626.
- Mantyh PW (2002) Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *J Clin Psychiatry* 63:6-10.

- Martini L, Hastrup H, Holst B, Fraile-Ramos A, Marsh M et Schwartz TW (2002) NK1 receptor fused to β -arrestin displays a single-component, high affinity molecular phenotype. *Mol Pharmacol* 62:30-37.
- Marvizón JC, Martínez V, Grady EF, Bunnett NW et Mayer EA (1997) Neurokinin 1 receptor internalization in spinal cord slices induced by dorsal root stimulation is mediated by NMDA receptors. *J Neurosci* 17:8129-8136.
- Marvizón JC, Wang X, Lao L et Song B (2003) Effect of peptidases on the ability of exogenous and endogenous neurokinins to produce neurokinin-1 receptor internalization in the rat spinal cord. *Br J Pharmacol* 140:1389-1398.
- Masson J, Sagné C, Hamon M et El Mestikawy S (1999) Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51:439-464.
- Massu Y, Nakayama K, Tamaki H, Harada Y, Kuno M et Nakanishi S (1987) cDNA cloning of bovine substance-P receptor through oocyte expression system. *Nature* 329:836-838.
- McCarson KE et Krause JE (1994) NK-1 and NK-3 type tachykinin receptor mRNA expression in the rat spinal cord dorsal horn is increased during adjuvant or formalin-induced nociception. *J Neurosci* 14:712-720.
- McCarson KE et Krause JE (1995) The formalin-induced expression of tachykinin peptide and neurokinin receptor messenger RNA in rat sensory ganglia and spinal cord is modulated by opiate preadministration. *Neuroscience* 64:729-739.
- McConlogue K, Déry O, Lovett M, Wong H, Walsh JH, Grady EF et Bunnett NW (1999) Substance P-induced trafficking of β -arrestins. The role of β -arrestins in endocytosis of the neurokinin-1 receptor. *J Biol Chem* 274:16257-16268.
- McLeod AL, Krause JE, Cuello AC et Ribeiro-da-Silva A (1998) Preferential synaptic relationships between substance P-immunoreactive boutons and neurokinin 1 receptor sites in the rat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15775-15780.
- McLeod AL, Julien JP, Cuello AC, Krause JE et Ribeiro-da-Silva A (1999) Ectopic substance P-immunoreactive boutons are preferentially presynaptic to neurokinin-1 receptor immunoreactive dendrites in the spinal white matter of transgenic mice. *Brain Res* 836:1-8.

- Mechawar N, Lacoste B, Yu WF, Srivastava LK et Quirion R (2007) Developmental profile of neuregulin receptor ErbB4 in postnatal rat cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience* 148:126-139.
- Middlemiss DN, Price GW et Watson JM (2002) Serotonergic targets in depression. *Curr Opin Pharmacol* 2:18-22.
- Michelsen KA, Schmitz Christoph et Steinbush HWM (2007) The dorsal raphe nucleus- From silver stainings to a role in depression. *Brain Res Rev* 55:329-342.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.
- Monastyrskaya K, Hostettler A, Buergi S et Draeger A (2005) The NK1 receptor localizes to the plasma membrane microdomains, and its activation is dependent on lipid raft integrity. *J Biol Chem* 280:7135-7146.
- Mongeau R, Blier P et de Montigny C (1997) The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Rev* 23:145-195.
- Morissette MC et Boye SM (2008) Electrolytic lesions of the habenula attenuate brain stimulation reward. *Behav Brain Res* 187:17-26.
- Morris JS, Smith KA, Cowen PJ, Friston KJ et Dolan RJ (1999) Covariation of activity in habenula and dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* 27:329-340
- Murphy CA, DiCamillo AM, Haun F et Murray M (1996) Lesion of the habenular efferent pathway produces anxiety and locomotor hyperactivity in rats: a comparison of the effects of neonatal and adult lesions. *Behav Brain Res* 81:43-52.
- Nakata Y, Kusaka Y, Yajima H et Segawa T (1981) Active reuptake of substance P carboxy-terminal heptapeptide (5-11) into rat brain and rabbit spinal cord slices. *J Neurochem* 37:1529-1534.
- Nakaya Y, Kaneko T, Shigemoto R, Nakanishi S et Mizuno N (1994) Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of adult rat. *J Comp Neurol* 347:249-274.

- Nattie EE, Li A, Richerson G et Lappi DA (2004) Medullary serotonergic neurones and adjacent neurons that express neurokinin-1 receptors are both involved in chemoreception in vivo. *J Physiol* 556:235-253.
- Naughton M, Mulrooney JB et Leonard BE (2000) A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 15:397-415.
- Neckers LM, Schwartz JP, Wyatt RJ et Speciale SG (1979) Substance P afferents from the habenula innervate the dorsal raphe nucleus. *Exp Brain Res* 37:619-623.
- Nichols DE et Nichols CD (2008) Serotonin receptors. *Chem Rev* 108:1614-1641.
- Nishikawa T et Scatton B (1985) Inhibitory influence of GABA on central serotonergic transmission. Raphe nuclei as the neuroanatomical site of the GABAergic inhibition of cerebral serotonergic neurons. *Brain Res* 331:91-103.
- Otsuka M et Yoshioka K (1993) Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev* 73:229-308.
- Palkovits M (1980) Topography of chemically identified neurons in the central nervous system: progress in 1977-1979. *Med Biol* 58:188-227.
- Papp M, Vassout A et Gentsch C (2000) The NK1-receptor antagonist NKP608 has an antidepressant-like effect in the chronic mild stress model of depression in rats. *Behav Brain Res* 115:19-23.
- Paré M, Descarries L et Quirion R (1992) Up-regulation of 5-hydroxytryptamine and neurokinin-1 receptors associated with serotonin/substance P hyperinnervation in the rat inferior olive. *Neuroscience* 51:97-106.
- Parent A, Descarries L et Beaudet A (1981) Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [3H]5-hydroxytryptamine. *Neuroscience* 6:115-138.
- Paris JM et Cunningham KA (1994) Habenula lesions decrease the responsiveness of dorsal raphe serotonin neurons to cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 49:555-560.
- Patwardhan AM, Berg KA, Akopain AN, Jeske NA, Gamper N, Clarke WP et Hargreaves KM (2005) Bradykinin-induced functional competence and trafficking of the δ -opioid receptor in trigeminal nociceptors. *J Neurosci* 25:8825-8832.

- Pelletier G, Leclerc R, Puviani R et Polak JM (1981) Electron immunocytochemistry in vasoactive intestinal peptide (VIP) in the rat brain. *Brain Res* 210:356-360.
- Peroutka SJ et Snyder SH (1979) Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiroperidol. *Mol Pharmacol* 16:687-699.
- Petit A, Kennedy TE, Bagnard D et Doucet G (2005) Membrane-associated guidance cue direct the innervation of forebrain and midbrain by dorsal raphe-derived serotonergic axons. *Eur J Neurosci* 22:552-568.
- Pfeiffer M, Kirscht S, Stumm R, Koch T, Wu D, Laugsch M, Schröder H, Höllt et Schulz S (2003) Heterodimerization of substance P and μ -opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization. *J Biol Chem* 278:51630-51637.
- Piñeyro G et Blier P (1999) Autoregulation of serotonin neurons: role of antidepressant drug action. *Pharmacol Rev* 51:533-591.
- Piñeyro G (2009) Membrane signalling complexes: implications for development of functionally selective ligands modulating heptahelical receptor signalling. *Cell Signal* 21:179-185.
- Pirot S (1999) Un nouvel antidépresseur agit en bloquant les récepteurs de la substance P de type NK1. *Neuropsychiatrie, tendances et débats* 4:60-61.
- Powell KJ, Quirion R et Jhamandas K (2003) Inhibition of neurokinin-1-substance P receptor and prostanoid activity prevents and reverses the development of morphine tolerance in vivo and the morphine-induced increase in CGRP expression in cultured dorsal root ganglion neurons. *Eur J Neurosci* 18:1572-1583.
- Quirion R, Shults CW, Moody TW, Pert CB, Case TN et O'Donohue TL (1983) Autoradiographic distribution of substance P receptors in rat central nervous system. *Nature* 303:714-716.
- Quirion R, Dam TV et Guard S (1991) Selective neurokinin receptor radioligands. *Ann NY Acad Sci* 632:137-144.
- Rapport MM, Green, AA et Page IH (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 176:1243-51.

- Reisine TD, Soubrié P, Artaud F et Glowinski J (1982) Involvement of lateral habenula-dorsal raphe nucleus neurons in the differential regulation of striatal and nigral serotonergic transmission in cats. *J Neurosci* 2:1062-1071.
- Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, El Mestikawy S, Hamon M et Descarries L (2000) Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417:181-194.
- Riad M, Watkins KC, Doucet E, Hamon M et Descarries L (2001) Agonist-induced internalization of serotonin-1A receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J Neurosci* 21:8378-8386.
- Riad M, Zimmer L, Rbah L, Watkins KC, Hamon M et Descarries L (2004) Acute treatment with antidepressant fluoxetine internalizes 5-HT_{1A} autoreceptors and reduces the in vivo binding of the PET radioligand [¹⁸F] MPPF in the dorsal raphe nucleus of rat. *J Neurosci* 24:5420-5426.
- Ribeiro-Da-Silva A et Hokfelt T (2000) Neuroanatomical localisation of substance P in CNS and sensory neurons. *Neuropeptides* 34:256-271.
- Ribeiro-Da-Silva A, McLeod AL et Krause JE (2000) Handbook of Chemical Neuroanatomy. Quirion R, Björklund A, Hökfelt T (eds), Neurokinin receptors in the CNS. Vol. 16: Peptide Receptors, Part 1, 195-240.
- Roosterman D, Cottrell GS, Schmidlin F, Steinhoff M, Bunnett NW (2004) Recycling and resensitization of the neurokinin 1 receptor. Influence of agonist concentration and Rab GTPases. *J Biol Chem* 279:30670-30679.
- Rosén A, Brodin K, Eneroth P et Brodin E (1992) Short-term restraint stress and s.c. saline injection alter the tissue levels of substance P and cholecystinin in the periaqueductal grey and limbic regions of rat brain. *Acta Physiol Scand* 146:341-348.
- Rueter LE, de Montigny C et Blier P (1998) In vivo electrophysiological assessment of the agonistic properties of flibanserin at pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the rat brain. *Synapse* 29:392-405.
- Rutter JJ et Auerbach SB (1993) Acute uptake inhibition increases extracellular serotonin in the rat forebrain. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1319-1324.

- Rutter JJ, Gundlach C et Auerbach SB (1995) Systemic uptake inhibition decreases serotonin release via somatodendritic autoreceptor activation. *Synapse* 20:225-233.
- Rupniak NMJ et Kramer MS (1999) Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 20:485-490.
- Rupniak NMJ, Webb JK, Fisher A, Smith D et Boyce S (2003) The substance P (NK1) receptor antagonist L-760735 inhibits fear conditioning in gerbils. *Neuropharmacology* 44:516-523.
- Ryckmans T, Balançon L, Berton O, Genicot C, Lamberty Y, Lallemand B, Pasau P, Pirlot N, Quéré L et Talaga P (2002) First dual NK1 antagonists-serotonin reuptake inhibitors: synthesis and SAR of a new class of potential antidepressants. *Bioorg Med Chem Letters* 12:261-264.
- Saffroy M, Beaujouan JC, Petite F, Torrens Y et Glowinski J (1994) Differential localization of ³H-[Pro9]SP binding sites in the guinea pig and rat brain. *Brain Res* 633:317-325.
- Sakai K, Salvert D, Touret M et Jouvét M (1977) Afferent connections of the nucleus raphe dorsalis in the cat as visualized by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res* 137:11-35.
- Saria A (1999) The tachykinin NK1 receptor in the brain: pharmacology and putative functions. *Eur J Pharm* 375:51-60.
- Santarelli L, Gobbi G, Debs PC, Sibille EL, Blier P, Hen R et Heath MJS (2001) Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1912-1917.
- Scharrer E et Scharrer B (1954) Hormones produced by neurosecretory cells. *Recent Progr Horm Res* 10:183-240.
- Schröder P, Abele C, Gohr P, Stuhlfauth-Roisch U et Grosse W (1999) Latest on enzymology of serotonin biosynthesis in walnut seeds. *Adv Exp Med Biol* 467:637-644.
- Sergeyev V, Hökfelt T et Hurd Y (1999) Serotonin and substance P co-exist in dorsal raphe neurons of the human brain. *NeuroReport* 10:3967-3970.

- Seybold VS, McCarson KE, Mermelstein PG, Groth RD et Abrahams LG (2003) Calcitonin gene-related peptide regulates expression of neurokinin₁ receptors by rat spinal neurons. *J Neurosci* 23:1816-1824.
- Sharp T, Umbers V et Hjorth S (1996) The role of 5-HT_{1A} autoreceptors and alpha 1-adrenoceptors in the inhibition of 5-HT release--II NAN-190 and SDZ 216-525. *Neuropharmacology* 35:735-41.
- Shirayama Y, Mitsushio H, Takashima M, Ichikawa H et Takahashi K (1996) Reduction of substance P after chronic antidepressant treatment in the striatum, substantia nigra and amygdala of the rat. *Brain Res* 739:70-78.
- Shirayama Y, Mitsushio H, Takahashi K et Nishikawa T (2000) Differential effects of haloperidol on phencyclidine-induced reduction in substance P contents in rat brain regions. *Synapse* 35:292-299.
- Shults CW, Quirion R, Chronwall CW, Chase TN et O'Donohue TL (1984) A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. *Peptides* 5:1097-1128.
- Sibon I, Benkelfat C, Gravel P, Aznavour N, Costes N, Mzengeza S, Booij L, Baker G, Soucy JP, Zimmer L et Descarries L (2008) Decreased [¹⁸F]MPPF binding potential in the dorsal raphe nucleus after a single oral dose of fluoxetine: a positron-emission tomography study in healthy volunteers. *Biol Psychiatry* 63:1135-1140.
- Siever LJ (2008) Neurobiology of aggression and violence. *Am J Psychiatry* 165:429-42.
- Simmons MA (2006) Functional selectivity of NK₁ receptor signaling: peptide agonists can preferentially produce receptor activation or desensitization. *J Pharmacol Exp Therap* 319:907-913.
- Singewald N, Chicchi GG, Thurner CC, Tsao KL, Spetea M, Schmidhammer H, Streepathi HK, Ferraguti F, Singewald GM et Ebner K (2008) Modulation of basal and stress-induced amygdaloid substance P release by the potent and selective receptor antagonist L-822429. *J Neurochem* 106:2476-2488.
- Sloviter RS, Ali-Akbarian L, Horvath KD et Menkens KA (2001) Substance P receptor expression by inhibitory interneurons of the rat hippocampus: enhanced detection

using improved immunocytochemical methods for the preservation and colocalization of GABA and other neuronal markers. *J Comp Neurol* 430:283-305.

Smith DW, Hewson L, Fuller P, Williams AR, Wheeldon A et Rupniak NM (1999) The substance P antagonist L-760,735 inhibits stress-induced NK(1) receptor internalisation in the basolateral amygdala. *Brain Res* 848:90-95.

Sodhi MS et Sanders-Bush E (2004) Serotonin and brain development. *Int Rev Neurobiol* 59:111-74.

Soghomonian JJ, Beaudet A et Descarries L (1988) Ultrastructural relationships of central serotonin neurons. In N.N. Osborne and M. Hamon (Eds), *Neuronal Serotonin*, John Wiley & Sons, Chicester, pp. 57-92.

Steinbusch HWM, Nieuwenhuys R, Verhofstad AAJ et Van Der Kooy D (1984) The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. A combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study. *J Physiol* 77:157-174.

Steinbusch HVM (1984) Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. In A. Björklund, T. Hökfelt and M.J. Kuhar (Eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 3, Classical Transmitters and Transmitter Receptors in the CNS, Part II*, Elsevier, Amsterdam, pp. 68-125.

Stewart JM et Hall ME (1993) Neuropeptide processing in pathophysiology. *Agents Actions Suppl* 42:211-226.

Stoessl AJ, Dourish CT et Iversen SD (1988) The NK-3 tachykinin receptor agonist senktide elicits 5-HT-mediated behavior following central or peripheral administration in mice and rats. *Br J Pharmacol* 94:285-287.

Stoessl AJ & Hill DR (1990) Autoradiographic visualization of NK-3 tachykinin binding sites, utilizing [³H]senktide. *Brain Res* 534:1-7.

Stout SC, Owens MJ et Nemeroff CB (2001) Neurokinin1 receptor antagonists as potential antidepressants. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:877-906.

Stroh T et Zupanc GKH (1995) Somatostatin in the prepacemaker nucleus of weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus* : evidence for a nonsynaptic function. *Brain Res* 674:1-14.

- Sur C, Betz H et Schloss P (1996) Immunocytochemical detection of the serotonin transporter in rat brain. *Neuroscience* 73:217-231.
- Tao-Cheng JH et Zhou FC (1999) Differential polarization of serotonin transporters in axons versus soma-dendrites: an immunogold electron microscopy study. *Neuroscience* 94:821-830.
- Tebbe JJ, Tebbe CG, Mronga S, Ritter M et Schafer MKH (2005) Central neuropeptide Y receptors are involved in 3rd ventricular ghrelin induced alteration of colonic transit time in conscious fed rats. *BMC Gastroenterology* 5:5, pp.1-8.
- Teixeira RM, Duarte FS et De Lima TC (2004) Behavioral and immunological effects of substance P in female and male mice. *Pharmacol Biochem Behav* 79:1-9.
- Tsai YJ, Lin CT, Huang CT, Wang HY, Tien LT, Chen SH et Lue JH (2009) Neuropeptide Y modulates C-Fos protein expression in the cuneate nucleus and contributes to mechanical hypersensitivity following rat median nerve injury. *J Neurotrauma* 26:1-13.
- Twarog BM et Page IH (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* 175(1):157-61.
- Ungerstedt U (1971) Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl* 367:1-48.
- Valentino RJ, Bey V, Pernar L et Commons KG (2003) Substance P acts through local circuits within the rat dorsal raphe nucleus to alter serotonergic neuronal activity. *J Neurosci* 23:7155-7159.
- Vanderhorst VGJM et Ulfhake B (2006) The organization of the brainstem and spinal cord of the mouse: Relationships between monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems. *J Chem Neuroanat* 31:2-36.
- Varga V, Kocsis B et Sharp T (2003) Electrophysiological evidence for convergence of inputs from the medial prefrontal cortex and the lateral habenula on single neurons in the dorsal raphe nucleus. *Eur J Neurosci* 17:280-286.
- Vertes RP (1991) A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 313:643-668.

- Vertes RP et Kocsis B (1994) Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol* 340:11-26.
- Vigna SR, Bowden JJ, McDonnald DM, Fisher J, Okamoto A, McVey DC, Payan DG et Bunnett NW (1994) Characterization of antibodies of the rat substance P (NK1) receptor and to a chimeric substance P receptor expressed in mammalian cells. *J Neurosci* 14:834-845.
- Walsh DM, Stratton SC, Harvey FJ, Beresford IJ et Hagan RM (1995) The anxiolytic-like activity of GR159897, a non-peptide NK2 receptor antagonist, in rodent and primate models of anxiety. *Psychopharmacology* 121:186-191.
- Wan Q, Douglas SD, Wang X, Kolson DL, O'Donnell LA et Ho WZ (2006) Morphine upregulates functional expression of neurokinin-1 receptor in neurons. *J Neurosci Res* 84:1588-1596.
- Wirz SA, Davis CN, Lu X, Zal T et Bartfai T (2005) Homodimerization and internalization of galanin type 1 receptor in living CHO cells. *Neuropeptides* 39:535-546.
- Wong DT, Bymaster FP et Engleman EA (1995) Prozac (fluoxétine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sciences* 57:411-441.
- Yang LM, Hu B, Xia YH, Zhang BL et Zhao H (2008) Lateral habenula lesions improve the behavioral response in depressed rats via increasing the serotonin level in dorsal raphe nucleus. *Behav Brain Res* 188:84-90.
- Zhou FC, Xu Y, Bledsoe S, Lin R et Kelley MR (1996) Serotonin transporter antibodies: production, characterization, and localization in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 43:267-278.
- Zocchi A, Varnier G, Arban R, Griffante C, Zanetti L, Bettelini L, Marchi M, Gerrard PA et Corsi M (2003) Effects of antidepressant drugs and GR 205171, an neurokinin-1 (NK1) receptor antagonist, on the response in the forced swim test and on monoamine extracellular levels in the frontal cortex of the mouse. *Neurosci Lett* 345:73-76.
- Zubrzycka M et Janecka A (2000) Substance P : transmitter of nociception (minireview). *Endocr Regul* 34:195-201.

Zupanc GK (1996) Peptidergic transmission: from morphological correlates fo functional implications. *Micron* 27:35-91.

ANNEXE

Présentation de l'annexe :

En cours de doctorat, j'ai participé à une autre étude s'inscrivant dans le domaine de la modulation neuropeptidique des fonctions cérébrales.

Cet article est le résultat d'une collaboration avec le Dr Naguib Mechawar, de l'Université McGill (Institut Douglas), où mon expertise de la neurocytologie moléculaire a été mise en oeuvre pour une première description de la localisation cellulaire et subcellulaire du récepteur ErbB4 des neurégulines (NRGs) au cours du développement postnatal du cortex cérébral et de l'hippocampe chez le rat. À l'aide de l'immunocytochimie en microscopies optique, confocale et électronique, nous avons pu montrer que ErbB4 est associé *in vivo* à des marqueurs neuronaux somato-dendritiques (NeuN, MAP2), et que sa localisation est en partie nucléaire, suggérant une implication des NRGs dans la maturation de ces populations cellulaires. ErbB4 n'a été retrouvé ni sur la glie radiaire au cours du développement, ni sur les astrocytes chez l'adulte, contrairement à certaines observations antérieures *in vitro*. Le Dr Mechawar a rédigé le manuscrit. Pour ma part, j'ai réalisé la majorité des expérimentations et préparé les 12 figures, ce qui m'a valu une place de co-premier auteur.

L'ANNEXE

**DEVELOPMENTAL PROFILE OF NEUREGULIN RECEPTOR ERBB4
IN POSTNATAL RAT CEREBRAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS**

Publié en 2007

Neuroscience 148:126-139

(N. MECHAWAR, B. LACOSTE, W. YU, L.K. SRIVASTAVA and R. QUIRION)

**DEVELOPMENTAL PROFILE OF NEUREGULIN RECEPTOR ERBB4 IN
POSTNATAL RAT CEREBRAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS**

Naguib MECHAWAR^{1*}, Baptiste LACOSTE^{2*}, Wenfeng YU¹, Lalit K. SRIVASTAVA¹
and Rémi QUIRION¹

Affiliations : ¹ Douglas Hospital Research Centre, McGill University, Dept of Psychiatry, 6875 LaSalle Blvd, Verdun (Montréal), Québec, Canada H4H 1R3; ² Université de Montréal, Département de pathologie et biologie cellulaire, CP 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, QC, Canada H3C 3J7.

[* : These authors contributed equally to the study]

Abbreviated title : ErbB4 in developing cortex and hippocampus

Section Editor : David A. Lewis

Corresponding author : Naguib MECHAWAR, Douglas Hospital Research Centre, McGill University, Dept of Psychiatry, 6875 LaSalle Blvd, Verdun (Montréal), Québec, Canada H4H 1R3.

Support : Supported by CIHR operating grant to R. Q., CRSN studentship to B. L., and CIHR fellowship to N. M.

Acknowledgements : The authors are grateful to Nicole Leclerc for her generous gift of anti-MAP2 antibody and for fruitful discussions, to Laurent Descarries for kindly granting them access to his laboratory, and to anonymous reviewer #2 for many insightful comments.

ABBREVIATIONS

BSA:	bovine serum albumin
DAB:	3,3'-diaminobenzidine
GABA:	gamma-aminobutyric acid
GAD67:	glutamate decarboxylase 67
GFAP:	glial fibrillary acidic protein
IR:	immunoreactivity
MAP2:	microtubule associated protein 2
NeuN:	neuronal nuclei
NGS:	normal goat serum
NMDA:	N-methyl-D-aspartic acid
NRG:	neuregulin
PB:	phosphate buffer
PBS:	phosphate buffered saline
PFA:	paraformaldehyde
PSD:	postsynaptic density
RT:	room temperature
TBST:	Tris buffer with 0.1% Tween 20

ABSTRACT

We investigated the cellular and subcellular distributions of neuregulin tyrosine kinase receptor ErbB4 in the postnatal rat frontal cortex and hippocampus by light-, confocal- and electron-microscopic immunocytochemistry. At birth, ErbB4-immunoreactivity (ErbB4-IR) was prominent in the apical cytoplasm and dendrites of cortical plate neurons and hippocampal pyramidal cells. Throughout postnatal development and in adulthood, ErbB4-IR in both regions remained confined to the somatodendritic compartment of neurons, which increased in number to reach the adult pattern by the end of the first postnatal month (P30). At all ages examined, double-labeling experiments revealed that ErbB4-IR always co-localized with the neuronal marker NeuN and never with glial markers Nestin or GFAP. Immunoperoxidase labeling at the ultrastructural level confirmed the exclusive localization of ErbB4-IR in somatodendrites, and notably in dendritic spines. Immunogold labeling showed preponderant ErbB4-IR in the cytoplasm, where it was associated with microtubules. Furthermore, ErbB4-IR was abundant in the nucleus of adult cortical and hippocampal neurons, suggesting a role for ErbB4 nuclear signaling in the brain beyond embryonic development. Taken together, these results show that ErbB4 is expressed by neuronal somatodendrites in cerebral cortex and hippocampus from birth to adulthood, and support a role for neuregulins in dendritic growth and plasticity.

Key words : Corticogenesis, Development, Dendrite, Schizophrenia, Electron microscopy

INTRODUCTION

The neuregulin (NRG) family of growth and differentiation factors is encoded by at least four genes (*nrg1-nrg4*) and composed of a wide variety of soluble and membrane-bound proteins homologous to epidermal growth factor (Talmage and Role, 2004). This diversity, arising mainly from alternative splicing, is particularly well documented for NRG-1, which includes at least fifteen different isoforms, including acetylcholine receptor inducing activity (ARIA), glial growth factor, heregulin and neu-differentiation factor. The many biological effects of NRGs are mediated by the tyrosine kinase receptors ErbB2-ErbB4 (Olayioye et al., 2000). Upon ligand binding (ErbB3 or ErbB4), these receptors

associate as heterodimers or homodimers (ErbB4 only), undergo tyrosine autophosphorylation and activate various classical intracellular signaling pathways (reviewed in Buonanno and Fischbach, 2001). ErbB4, which is enriched in the neuronal post-synaptic density (PSD) and co-localizes with PSD markers (Garcia et al., 2000; Huang et al., 2000; Ma et al., 2003) can also act directly as a transcription factor, at least in embryonic brain neural precursor cells (Sardi et al., 2006).

Widespread interest in NRG signaling has recently been generated by studies linking the *nrg1* and *ErbB4* genes to schizophrenia (Stefansson et al., 2002; Nicodemus et al., 2006; Silberberg et al., 2006; Law et al., 2007). Our current knowledge on NRG-1/ErbB4 signaling in the brain indicates prominent roles for this pathway during development. This is all the more interesting when considering that schizophrenia is a developmental disorder. Thus, in the cerebral cortex, NRG-1/ErbB4 signaling orchestrates major events of prenatal development, such as cell fate determination (Sardi et al., 2006) and thalamocortical axon guidance (Lopez-Bendito et al., 2006). Moreover, by inducing the elongation of radial glia (Anton et al., 1997; Schmid et al., 2003; Gierdalski et al., 2005) and participating in the migration of neurons born in the ganglionic eminences (Yau et al., 2003; Flames et al., 2004) NRG-1 proteins respectively promote the placement of principal neurons and interneurons in the cerebral cortex. Accumulating evidence also points to an involvement of ErbB4 in the maturation of postnatal cortical circuitries. In cerebellar cortex, it has been implicated in the regulation of granule cell dendritic growth (Rieff and Corfas, 2006) and in the modulation of postsynaptic NMDA (Ozaki et al., 1997) and GABA (Rieff et al., 1999) receptor expression. Similar influences seem to be at play in forebrain cortical regions, as NRG-1 promotes neuritic growth of cultured hippocampal neurons (Gerecke et al., 2004) and modulates the expression of NMDA (Gu et al., 2005) and $\alpha 7$ nicotinic receptors (Liu et al., 2001) in the prefrontal cortex and hippocampus, respectively. Taken together with evidence that GABAergic, glutamatergic and cholinergic transmission in these regions are altered in schizophrenia (reviewed in Freedman et al., 2000; Lewis et al., 2003, 2004), these data further implicate ErbB4 in the aetiology of this mental disorder.

Despite these advances, our understanding of the physiological and pathological roles played by ErbB4 in the brain is limited by the lack of detailed cellular and subcellular information on the localization of this receptor during postnatal development. In the present

study, we describe the distribution of ErbB4-expressing cells and their phenotype during postnatal development in the rat frontal cortex and hippocampus using light- and confocal-microscopic immunocytochemistry (ICC). In addition, we used electron microscopic-ICC to describe the ultrastructural distribution of ErbB4 in both regions in the adult. Preliminary reports of this work have been presented in abstract forms (Mechawar et al., 2005, 2006).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

All experiments followed the policies and guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the regulations of McGill University's Animal Care Committee. Efforts were always made to minimize the number of animals sacrificed, as well as their suffering. Pregnant Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River (St-Constant, Qc, Canada) and juvenile rats kept with their lactating mothers until sacrifice.

Immunoblotting

Brain tissues from male rats at P5 and >P60 (adults) were homogenized in 19 volumes of ice-cold HES buffer (20 mM HEPES, pH 7.4 / 1 mM EDTA / 250 mM sucrose) containing 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin and 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Protein concentration was measured using bicinchoninic acid (Pierce, Rockford, IL), with bovine serum albumin (BSA; Sigma, Oakville, ON, Canada) as a standard. Samples were separated on 4 to 20% SDS-polyacrylamide gels, and the resolved proteins were transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes by electroblotting overnight at 30 mA in transfer buffer (25 mM Tris, pH 8.3 / 0.192 M glycine / 20% methanol). Equivalent transfers of proteins were verified by probed membranes with an anti-β-actin antibody (Sigma). Nonspecific binding was blocked by preincubating membranes overnight at 4°C in Tris buffer with 0.1% Tween 20 (TBST) containing 5% nonfat dry milk. Blots were incubated for 1 hour at room temperature (RT) in a solution of polyclonal rabbit anti-ErbB4 antibody (sc-283; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted 1/500 in TBST containing 1% nonfat dry milk. This affinity purified antibody was raised against a peptide mapping at the carboxy terminus of the receptor of human origin. Blots were then incubated for 1 hour at RT in a solution of horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit antibody (Santa Cruz) diluted 1/3000 in TBST. Enhanced chemiluminescence

(Pierce; Rockford, IL) was used to label immunoreactive species, which were subsequently visualized by exposure to Kodak XAR-5 film (Eastman Kodak, Rochester, NY).

Tissue processing for immunocytochemistry

At P0 and postnatal days P5, P10, P15, P30 and >P60, three male rats per age were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.), and perfused through the heart with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS; 50 mM; pH 7.4; 5-50 ml) followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4; 4° C; 100-500 ml). The brain was then rapidly removed, postfixed overnight in PFA alone at 4°C. After postfixation, brains were washed in PBS, embedded in 10% agar (for ages P0-P15) and cut in cold PBS into consecutive 50 µm-thick transverse sections with a vibratome. Sections at levels equivalent to the adult rat stereotaxic planes A-11.2 (frontal cortex) and A-7.2 (dorsal hippocampus) were then selected with the aid of stereotaxic atlases of the developing and adult rat brain (Paxinos and Watson, 1986; Paxinos et al., 1991), and processed for ErbB4 light- or fluorescent-ICC.

For electron microscopy, adult rats (n=3) were perfused with a solution of 3% acrolein in 0.1 M PB, followed by 4% PFA in the same buffer. Brains were then postfixed by immersion in PFA alone for 60 min at 4°C and then rapidly processed for ErbB4-ICC.

Light-microscopic ErbB4 immunocytochemistry

Free-floating sections were thoroughly rinsed in PBS and pre-incubated for 90 min at RT in a blocking solution of PBS containing 10% normal goat serum (NGS; Vector, Burlingame, CA), 0.01% BSA and 0.25% Triton X-100. They were then incubated overnight at RT in this same solution containing 0.4 µg/ml of the affinity purified anti-ErbB4 antibody. After rinses in PBS, sections were incubated for 90 min in biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), diluted 1:500 in PBS containing 0.01% BSA, followed by the avidin-biotin complex procedure (ABC Kit, Vectastain Elite; Vector) for 90 min. The immunoperoxidase labeling was revealed for 3 min in a 0.05% solution of 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma) to which 0.005% hydrogen peroxide was added. Sections were then rinsed several times with PBS, air-dried on gelatin-coated slides, dehydrated with ethanol, cleared with toluene and mounted with DPX (Fluka; Sigma). Controls included parallel experiments with omission of the anti-ErbB4 antibody or by incubating the sections with the anti-ErbB4 antibody pre-

adsorbed for 2 hours under constant agitation at RT with its blocking peptide (Santa Cruz) 100-fold in excess.

Confocal-microscopic double-labeling immunofluorescence

All steps were carried out at RT. Free-floating sections were thoroughly rinsed in PBS and pre-incubated for 2 h in a blocking solution of PBS containing 10% normal donkey serum (Vector), 0.6% cold water fish skin gelatin (Sigma) and 0.3% Triton X-100. They were then incubated for two nights in the same solution containing the anti-ErbB4 antibody diluted as above, together with either one of the following mouse monoclonal antibodies : anti-rat nestin (BD Pharmingen, San Diego; 1/500), anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; Chemicon, Temecula, CA; 1/500), anti-NeuN (Chemicon; 1/500), anti-microtubule associated protein 2 (MAP2; Sigma; 1/200). After several PBS rinses, sections were then incubated for 3 h with biotinylated goat anti-mouse IgGs diluted 1/1000 in blocking solution, rinsed some more and then incubated overnight in blocking solution containing Cy-3-conjugated donkey anti-rabbit (1/100) and Alexa fluor 488-conjugated streptavidin (1/200). There was no cross reactivity of the secondary antibodies. After several rinses in PB, sections were mounted with Vectashield mounting medium (Vector) and observed at the confocal microscope (Leica, TCS-SP1) using sequential laser analysis with emission intensities of 519 nm (Alexa Fluor) and 570 nm (Cy3). Images were produced with the Leica confocal software (LCS v2.65) and adjusted for brightness and contrast with the Adobe Photoshop software.

Electron-microscopic ErbB4 immunocytochemistry

Immunoperoxidase staining (DAB) was carried-out as above, with the exception that Triton X-100 was not used for permeabilization. For single immunogold labeling, sections were incubated with the anti-ErbB4 antibody as above, and then incubated overnight at RT in goat anti-rabbit IgGs conjugated to 1 nm colloidal gold particles (AuroProbe One, Amersham, Oakville, ON, Canada) diluted 1:50 in blocking solution. The size of these particles was then increased by silver enhancement (IntenSE kit, Amersham Biosciences) for 15 min. Sections were rinsed in 0.1 M PB, postfixed for 30 min in 1% osmium tetroxide in PB, washed in PB, dehydrated through the graded series of ethanol followed by propylene oxide, infiltrated with Durcupan (Fluka) overnight, and flat-embedded in this resin between a glass slide and plastic coverslip (Rinzl, Thomas

Scientific, Swedesboro, NJ). After 48 hours of polymerization at 60°C, the coverslips were removed, and regions of interest, selected by light microscopy, were excised from the slides and re-embedded at the tip of resin blocks. Ultrathin (60-80 nm) sections from these blocks were cut with an ultramicrotome (Reichert Ultracut S, Leica Canada, St-Laurent, QC, Canada), collected on 150-mesh copper grids, stained with lead citrate, and examined with a Philips CM100 electron microscope. Background staining was consistently low; for immunogold labeling, it appeared occasionally, on random structures, as a single particle. Cellular profiles were considered as immunoreactive when showing unequivocal DAB immunoprecipitate or an accumulation of silver-intensified immunogold particles (at least three per profile in the case of smaller structures such as dendritic spines and axon terminals).

RESULTS

ErbB4 immunodetection

Total lysates of cerebral cortex and hippocampus immunoblotted with the affinity purified anti-ErbB4 antibody yielded the same immunoreactive species in both regions : major bands were detected at 185, 80, 55 and 25 kD (Fig. 1). These bands were also detected at P5, but were less intense in the case of the 185 kD and especially 80 kD bands, and more intense in the case of the 55 and 25 kD bands. Interestingly, the 55 and 25 kD bands were more intense in the immature compared to adult tissues. The other age-related difference came from the detection of a 42 kD band in adult tissues alone (Fig. 1). Immunostaining fixed brain sections revealed neuronal profiles at all ages (see below), and omitting or pre-incubating the anti-ErbB4 antibody with its immunogenic peptide always completely abolished all immunostaining (Fig. 2).

Developmental distribution of ErbB4

Frontal cortex : Lightly ErbB4-immunostained cell bodies were observed at birth (P0) across the cortical plate. At this age, the most prominent staining consisted of a densely packed band of radial fibres contained entirely within the marginal zone (Figs 3a and 4a). A similar pattern was observed at P5, but the overall staining intensity had increased (Figs 3b and 4b). Five days later, at P10, immunoreactive cell bodies and their

many processes were clearly observed throughout the cortical thickness beneath layer I, the lower limit of which was bordered by a light, patchy band (Figs 3c and 4c). At P15, strongly immunoreactive somata and emerging neurites of bipolar and multipolar neurons were distributed within the same layers (Figs 3d and 4d). The overall adult pattern of ErbB4-immunoreactivity (Figs 3f and 4f) was attained by P30 (Figs 3e and 4e), with densely packed pyramidal and non-pyramidal neurons and their proximal dendrites being distributed across layers II-VI. This developmental sequence was observed in all neocortical areas examined, such as the primary somatosensory and visual cortex (not shown).

Dorsal hippocampus : A similar ErbB4-immunostaining pattern was observed in CA1-CA3 regions throughout postnatal development (Figs 5 and 6). At birth, a network of immunoreactive fibers and sparse cell bodies were present in all layers, but were most abundant in the presumptive *stratum oriens* and pyramidal cell layer (Fig. 6a). The latter was outlined by a dense immunoreactive band comparable to that observed in the neocortical marginal zone. At P5, multipolar cells were observed across all layers, particularly in the immediate vicinity of the pyramidal cell layer, which remained highlighted by a dark band (Figs 5b and 6b). Between P10 and P30, the density of immunoreactive cells and processes gradually increased in the pyramidal cell layer and decreased in the surrounding neuropil (Fig. 5c-f). The packing density in this layer increased substantially between P30 and adulthood (Fig. 6e,f). In the dentate gyrus, the salient feature at birth was a dense band composed mainly of thin fibers outlining the granule cell layer (Fig. 5a). At P5 and P10, few scattered ErbB4-IR cells were observed in the hilus and in the adjacent portion of the granule cell layer (Fig. 5b,c). By P15, the ErbB4-IR band in the granule cell layer had diminished in intensity and the number of neurons in the hilus increased in number (Fig. 5d). At P30, the adulthood pattern was observed, with several darkly stained cells in the hilus, mainly distributed along the granule cell layer (Fig. 5e,f). In the latter ErbB4-IR cells were restricted to the subgranular region (Fig. 5e,f).

Phenotype of ErbB4-immunoreactive cells

In order to specify the nature of ErbB4-IR in early postnatal development, double-labeling immunofluorescent experiments were performed using the anti-ErbB4 antibody together with antibodies raised against radial glial (Nestin) or neuronal (NeuN and MAP2) markers. Nestin-IR at birth revealed a glial scaffold entirely distinct from ErbB4-

immunoreactive cells (Fig. 7a,b). The latter were identified as neurons, as they always displayed NeuN-IR (Fig. 7c). A closer examination of ErbB4/NeuN double-labeling allowed to establish that the intense ErbB4-immunoreactive band observed during the first postnatal week was composed of juxtaposed apical neurites extending from upper cortical plate neurons (Fig. 7d). ErbB4/MAP2 double-labeling showed that these immature apical neurites were not MAP2-immunoreactive (Fig. 8). In contrast, punctate ErbB4-IR was found to co-localize with MAP2-IR along thick dendrites originating mostly from earlier-born neurons in the lower cortical plate (Fig. 8, inset). Double-staining experiments during the second postnatal week showed that ErbB4-IR remained neuronal, as it did not co-localize with GFAP-IR astrocytes (Fig. 9a,b) and was consistently co-localized with NeuN-IR (Fig. 9c,d). Furthermore, ErbB4-IR could be strikingly different from one neuron to the other, i.e. from completely absent to very intense staining (Fig. 9d). In the adult, the overall staining pattern was maintained in both regions (Fig. 10).

Ultrastructural distribution of ErbB4-IR

The subcellular distribution of ErbB4 was identical in adult prefrontal cortex (layers V; Fig. 11a-c,g-i) and hippocampus (CA1, *stratum radiatum*; Fig. 11d-f). In both regions, immunoperoxidase (Fig. 11a,b,d,e) as well as immunogold labeling (Fig. 11c,f,g-i) were associated with dendritic spines and branches. In dendritic spines, DAB accumulated along the post-synaptic density (Fig. 11a,b,e). The majority of silver-enhanced gold particles were localized in the cytoplasm and were closely associated with microtubules, as illustrated for the cerebral cortex in Fig. 11g-i. ErbB4-IR was also occasionally observed at the plasma membrane (e.g. Fig. 11c). No axon terminal was ever labeled. We then examined the subcellular distribution of ErbB4 in frontal cortex layer V and CA1 pyramidal cell layer to seek evidence that this receptor (or its cleavage products) can translocate to the nucleus in mature neurons. Intense ErbB4-IR was indeed found in the nuclear compartment of ErbB4-IR neurons in both regions (Fig. 12).

DISCUSSION

We have examined the cellular and subcellular distributions of neuregulin tyrosine kinase receptor ErbB4 in the developing and adult rat frontal cortex and hippocampus. Our

principal findings are that ErbB4-IR is : (i) confined to neurons throughout postnatal development and adulthood, and never associated with glial cells or blood vessels; (ii) prominently localized, during early development, to growing apical dendrites; (iii) restricted at all ages to the somatodendritic compartment; (iv) present in the nucleus and associated with microtubules in the cytoplasm of adult neurons.

The specificity of the affinity-purified anti-ErbB4 antibody used here was established in previous studies of rat, mouse, monkey and human brain tissue (e.g. Anton et al., 1997; Eilam et al., 1998; Garcia et al., 2000; Gerecke et al., 2001; Ma et al., 2003; Hahn et al., 2006; Sardi et al., 2006; Thompson et al., 2007) and further confirmed under our experimental conditions. This antibody was raised against the C-terminus region of ErbB4, and was thus expected to recognize the full receptor as well as the cytosolic 80 kD ErbB4 fragment described to result from secretase cleavage (Ni et al., 2001). This was confirmed here by immunoblotting cortical and hippocampal tissues, which allowed to detect the full 185 kDa form as well as the cleaved 80 kD fragment. These immunoreactive species were detected with more intensity in adult than in immature (P5) brains, particularly in the case of the 80 kDa fragment. Additional immunoreactive species of lower molecular weight (55 and 25 kD) were also detected in all samples, and were more intense at P5 than in the adult. Finally, a 42 kD band was detected in adult tissues alone. Multiple bands visualized with this and other anti-ErbB4 antibodies have been previously reported (e.g. Pearson and Carroll, 2004; Hahn et al., 2006; Thompson et al., 2007). In particular, the recent study by Thompson and collaborators presents a strikingly similar immunoblotting pattern obtained with nuclear and cytoplasmic extracts of monkey dorsolateral prefrontal cortex (Thompson et al., 2007). As suggested by these authors, the immunoreactive bands below 80 kD likely reflect additional ErbB4 processing *en route* to the nucleus, and the present study indicates that such a phenomenon also occurs in rat brain neurons. Although they remain to be described, the molecular mechanisms involved in the generation of these fragments are likely to play a role in brain development, as suggested here by the importance of the 55 and 25 kD bands detected in immature cerebral cortex and hippocampus.

ErbB4 has been implicated in mediating the effects of NRG-1 on the tangential migration of cortical GABAergic neurons during embryonic corticogenesis (Yau et al., 2003; Flames et al., 2004) but little is known about the localization and roles played by ErbB4 signaling in postnatal corticogenesis. As suggested by a recent *in situ* hybridization

analysis of mouse postnatal cortex and hippocampus, interneurons are unlikely to represent the only ErbB4-expressing cells during ontogeny (Fox and Kornblum, 2005). This study showed that ErbB4 mRNA displays a prominent and widespread distribution across all neocortical and hippocampal layers during the first week of life, and that only a proportion (~ 60%) of ErbB4 mRNA-positive cells in P7 neocortex also express GAD-67 mRNA (Fox and Kornblum, 2005). Furthermore, ErbB4 expression at P1 was found by these authors to be most abundant in the upper neocortical layers; a pattern corresponding to the ErbB4 protein distribution reported here at birth. As inferred from their localization and morphological attributes (i.e. apical dendrite), these ErbB4-IR cortical cells are presumed to become layer II/III pyramidal neurons. The punctate ErbB4-IR distributed along apical dendrites originating from lower cortical layers further suggests an expression by pyramidal neurons. Thus, during ontogeny, ErbB4 is expressed by projection neurons in addition to interneurons, an observation consistent with a recent immunocytochemical description of ErbB4 distribution in late embryonic human cerebral cortex (Bernstein et al., 2006) and with the presence of cortical and hippocampal ErbB4-IR pyramidal neurons in the adult, as also previously reported in rat (Gerecke et al., 2001), monkey (Thompson et al., 2007) and human (Hahn et al., 2006).

Given that ErbB4-immunoreactive radial glia and astrocytes have been described in rodent cortical cultures (Anton et al., 1997; Schmid et al., 2003), we sought to determine if these cell types could also be immunolabeled in sections of developing and adult rat cortex and hippocampus, but found no such evidence. This could signify that astrocytes and their progenitors have the capacity to express ErbB4 under certain conditions, at least *in vitro*. Interestingly, a recent RT-PCR and immunoblotting analysis has shown that cultured human cortical astrocytes express ErbB1, ErbB2 and ErbB3, but not ErbB4 (Sharif et al., 2006). This is somewhat at odds with previous immunocytochemical reports presenting evidence of ErbB4-immunoreactive satellite glia in the dorsolateral prefrontal cortex (Law, 2003) and of some reactive astrocytes associated with hippocampal neuritic plaques in Alzheimer's disease (Chaudhury et al., 2003). Thus, the issue of ErbB4 expression by astrocytes in human cortical regions remains to be settled. The present study largely confirms what others have found in the rat (Gerecke et al., 2001) as well as other non-human species (e.g. Thompson et al., 2007), namely that astrocytes do not express ErbB4 in

mature uninjured cerebral cortex and hippocampus. Furthermore, it provides the first evidence showing that this is also the case during postnatal development.

During early development, ErbB4-IR was strongly associated with apical dendrites. In the cortical plate, MAP2-immunoreactive dendrites emerging from earlier-born neurons were adorned with punctate ErbB4-IR. In contrast, the more immature upper cortical plate neurons displayed a concentration of ErbB4-IR in the proximal segment of their apical neurite. These observations strongly suggest a role for ErbB4 in dendritic growth and plasticity. This is supported by recent studies showing that NRG-1 promotes ErbB4-mediated neuritic growth and arborization in cultured hippocampal neurons (Gerecke et al., 2004) and dendritic growth in cerebellar granule cells (Rieff and Corfas, 2006). It is thus increasingly clear that NRGs are not only involved in the placement of cells in laminar structures, but also in post-migratory neuron maturation. This includes the establishment and maturation of CNS synapses, a role first established for NRG-1 at the neuromuscular junction (Martinou et al., 1991). Indeed, there is mounting evidence that NRGs modulate synaptic plasticity of cortical and hippocampal neurons by regulating the expression of diverse neurotransmitter receptors involved in fast synaptic transmission, such as NMDA (Gu et al., 2005) and $\alpha 7$ nicotinic (Liu et al., 2001) receptors. These effects are thought to rely, at least in part, on the interaction of ErbB4 with post-synaptic density proteins, a phenomenon well documented for PSD-95 (Garcia et al., 2000; Huang et al., 2000). In particular, the only other electron microscopic report on ErbB4 in the brain has presented evidence for ErbB4/PSD-95 co-localization on dendritic spines in the adult rat parietal cortex (Ma et al., 2003). Using post-embedding immunogold with tissues exposed to a detergent solution, these authors reported that gold particles were mainly localized on post-synaptic dendritic specializations, but that some were also observed inside dendrites and dendritic spines. After employing the pre-embedding immunogold technique, we observed ErbB4-IR mainly in the cytoplasmic compartment and, more rarely, at the plasma membrane of somatodendrites. Since the same antibody was used in both studies, the discrepancies between our immunogold results and those of Ma and collaborators (2003) are likely due to differences in methodology/sensitivity. This is made all the more likely by the fact that we confirmed the association of ErbB4-IR with post-synaptic densities following highly sensitive immunoperoxidase stainings.

The functional significance of the intracellular pool of ErbB4 receptors remains to be explored. It can be speculated that it represents a mix of newly synthesized receptor and of nuclear-bound cleaved fragments, traveling the length of dendrites along microtubules. Cleaved ErbB4 fragments are thought to regulate gene transcription through their conserved intrinsic tyrosine kinase activity. Recently, Sardi and collaborators reported that this phenomenon also occurs in neural precursor cells in the embryonic brain, with secretase-dependent nuclear signaling regulating the timing of astrogenesis by repressing the expression of astrocytic genes (Sardi et al., 2006). Our finding that nuclei of ErbB4-immunoreactive – but not adjacent immunonegative – somas in the adult frontal cortex and hippocampus contained immunogold particles provides the first ultrastructural data suggesting that ErbB4 nuclear signaling also occurs in the adult brain.

Much interest in NRG signaling in the central nervous system has recently been sparked by studies linking the *nrg-1* gene to schizophrenia in several world populations (reviewed in Harisson and Weinberger, 2005). A significant difference in the expression of ErbB4 SNPs in schizophrenic brains has also been reported (Silberberg et al., 2006). By using a postmortem tissue-stimulation approach, Hahn and colleagues (2006) have measured ErbB4 hyperactivity, and linked it to NMDA hypoactivity in the prefrontal cortex of schizophrenic subjects. In accordance with these findings, NRG-1 and ErbB4 heterozygote mice display some of the cognitive and neurochemical phenotypes found in animal models of schizophrenia : both strains are hyperactive and display reduced prepulse inhibition compared to wild-types, and these behaviors are partially reversible by clozapine, an atypical neuroleptic (Stefansson et al., 2002). Schizophrenia is widely believed to be a neurodevelopmental disorder of altered cortico-limbic connectivity (Winterer and Weinberger, 2004). In agreement with this hypothesis, NRG-1/ErbB4 signaling has been described as a key pathway in migratory events during embryonic corticogenesis (Anton et al., 1997; Rio et al., 1997; Schmid et al., 2003). In the present study, ErbB4 was localized to immature neocortical and hippocampal pyramidal cell dendrites, the principal sites of selection and integration of newly formed synaptic inputs. It can be speculated that perturbed NRG-1/ErbB4 signaling could alter this key aspect of postnatal corticogenesis. Future investigations aimed at characterizing the influence of NRG-1 on dendritic growth and maturation, as well as identifying the genes directly targeted by nuclear ErbB4

translocation in the postnatal and adult brain should shed light on the mechanisms linking this receptor to normal and pathological cortical and hippocampal function.

REFERENCES

- Anton ES, Marchionni MA, Lee K-F, Rakic P (1997) Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development* 124:3501-3510.
- Bernstein HG, Lendeckel U, Bertram I, Bukowska A, Kanakis D, Dobrowolny H, Stauch R, Krell D, Mawrin C, Budinger E, Keilhoff G, Bogerts B (2006) Localization of neuregulin-1 (heregulin-1) and one of its receptors, ErbB-4 tyrosine kinase, in developing and adult human brain. *Brain Res Bull* 69:546-559.
- Buonanno A, Fischbach GD (2001) Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Cur Op Neurobiol* 11:287-296.
- Chaudhury AR, Gerecke KM, Wyss JM, Morgan DG, Gordon MN, Carroll SL (2003) Neuregulin-1 and ErbB4 immunoreactivity is associated with neuritic plaques in Alzheimer disease brain and in transgenic model of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 62 :42-54.
- Eilam R, Pinkas-Kramarski R, Ratzkin BJ, Segal M, Yarden Y (1998) Activity-dependent regulation of neu differentiation factor/neuregulin expression in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1888-1893.
- Flames N, Long JE, Garratt AN, Fischer TM, Gassmann M, Birchmeier C, Lai C, Rubenstein JLR, Marin O (2004) Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* 44:251-261.
- Fox IJ, Kornblum HI (2005) Developmental profile of ErbB receptors in murine central nervous system: implications for functional interactions. *J Neurosci Res* 79:584-597.
- Freedman R, Adams CE, Leonard S (2000) The $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor and the pathology of hippocampal interneurons in schizophrenia. *J Chem Neuroanat* 20 :299-306.

- Garcia RAG, Vasudevan K, Buonanno A (2000) The neuregulin receptor ErbB4 interacts with PDZ-containing proteins at neuronal synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3596-3601.
- Gerecke KM, Wyss JM, Carroll SL (2004) Neuregulin-1 induces neurite extension and arborization in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 27:379-393.
- Gerecke KM, Wyss JM, Karavanova I, Buonanno A, Carroll SL (2001) ErbB transmembrane tyrosine kinase receptors are differentially expressed throughout the adult rat central nervous system. *J Comp Neurol* 433:86-100.
- Gierdalski M, Sardi SP, Corfas G, Juliano SL (2005) Endogenous neuregulin restores radial glia in a (ferret) model of cortical dysplasia. *J Neurosci* 25:8498-8504.
- Gu Z, Jiang Q, Fu AK, Ip NY, Yan Z (2005) Regulation of NMDA receptors by neuregulin signaling in prefrontal cortex. *J Neurosci* 25:4974-4984.
- Hahn CG, Wang HY, Cho DS, Talbot K, Gur RE, Berrettini WH, Bakshi K, Kamins J, Borgmann-Winter KE, Siegel SJ, Gallop RJ, Arnold SE (2006) Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nat Med* Jun 11; [Epub ahead of print].
- Harrison PJ, Weinberger DR (2005) Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10:40-68.
- Huang YZ, Won S, Ali DW, Wang Q, Tanowitz M, Du QS, Pelkey KA, Yang DJ, Xiong WC, Salter MW, Mei L (2000) Regulation of neuregulin signaling by PSD-95 interacting with ErbB4 at CNS synapses. *Neuron* 26:443-455.
- Law A (2003) Neuregulin-1 in the human brain. *Am J Psychiatry* 160 :1392.
- Law AJ, Kleinman JE, Weinberger DR, Weickert CS (2007) Disease-associated intronic variants in the *ErbB4* gene are related to altered *ErbB4* splice-variant expression in the brain in schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 16 :129-141.
- Lewis DA, Cruz D, Egan S, Erickson S (2004) Postnatal development of prefrontal inhibitory circuits and the pathophysiology of cognitive dysfunction in schizophrenia. *Ann NY Acad Sci.* 1021 :64-76.
- Lewis DA, Glantz LA, Pierri JN, Sweet RA (2003) Altered cortical glutamate neurotransmission in schizophrenia. *Ann NY Acad Sci.* 1003 :102-112.

- Liu Y, Ford B, Mann MA, Fischbach GD (2001) Neuregulins increase $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and enhance excitatory synaptic transmission in GABAergic interneurons of the hippocampus. *J Neurosci.* 21:5660-5669.
- Lopez-Bendito G, Cautinat A, Sanchez JA, Bielle F, Flames N, Garratt AN, Talmage DA, Role LW, Charnay P, Marin O, Garel S (2006) Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for Neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell* 125:127-142.
- Ma L, Huang YZ, Pitcher GM, Valtschanoff JG, Ma YH, Feng LY, Lu B, Xiong WC, Salter MW, Weinberg RJ, Mei L (2003) Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J Neurosci* 23:3164-3175.
- Martinou JC, Falls DL, Fischbach GD, Merlie JP (1991) Acetylcholine receptor-inducing activity stimulates expression of the epsilon-subunit gene of the muscle acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7669-7673.
- Mechawar N, Lacoste B, Srivastava LK, Quirion R (2006) Neuronal localization of neuregulin receptor ErbB4 in the postnatal rat cerebral cortex and hippocampus. Program No. 125.18. 2006 Neuroscience meeting planner. Atlanta, GA.
- Mechawar N, Srivastava LK, Quirion R (2005) Developmental distribution of ErbB4 receptor in the postnatal rat brain. Program No. 709.5. 2005 Neuroscience meeting planner. Washington, DC.
- Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G (2001) α -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 294:2179-2181.
- Nicodemus KK, Luna A, Vakkalanka R, Goldberg T, Egan M, Straub RE, Weinberger DR (2006) Further evidence for association between ErbB4 and schizophrenia and influence on cognitive intermediate phenotypes in healthy controls. *Mol Psychiatry* 11 :1062-1065.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19:3159-3167.
- Ozaki M, Sasner M, Yano R, Lu HS, Buonanno A (1997) Neuregulin-1 induces expression of an NMDA-receptor subunit. *Nature* 390:691-694.
- Paxinos G and Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edn. Academic, Orlando, FL.

- Paxinos G, Törk I, Tecott LH and Valentino KL (1991) *Atlas of the Developing Rat Brain*, Academic, San Diego, CA.
- Pearson Jr. R, Carroll SL (2004) ErbB transmembrane tyrosine kinase receptors are expressed by sensory and motor neurons projecting into sciatic nerve. *J Histochem Cytochem* 52 :1299-1311.
- Rieff HI, Corfas G (2006) ErbB receptor signalling regulates dendrite formation in mouse cerebellar granule cells *in vivo*. *Eur J Neurosci* 23:2225-2229.
- Rieff HI, Raetzman LT, Sapp DW, Yeh HH, Siegel RE, Corfas G (1999) Neuregulin induces GABA(A) receptor subunit expression and neurite outgrowth in cerebellar granule cells. *J Neurosci* 19:10757-10766.
- Rio C, Rieff HI, Qi P, Corfas G (1997) Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 19:39-50.
- Sardi SP, Murtie J, Koirala S, Patten BA, Corfas G (2006) Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of asrogenesis in the developing brain. *Cell* 127 :185-197.
- Schmid RS, McGrath B, Berechid BE, Boyles B, Marchionni M, Sestan N, Anton ES (2003) Neuregulin 1-erbB2 signaling is required for the establishment of radial glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4251-4256.
- Sharif A, Duhem-Tonnelle V, Allet C, Baroncini M, Loyens A, Kerr-Conte J, Blond S, Ojeda S, Junier M, Prevot V (2006) Characterization of ligand-activated erbB signaling pathways in human astrocytes. Program No. 733.11. 2006 Neuroscience meeting planner. Atlanta, GA.
- Silberberg G, Darvasi A, Pinkas-Kramarski R, Navon R (2006) The involvement of ErbB4 with schizophrenia: association and expression studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 141:142-148.
- Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT, Hjaltason O, Birgisdottir B, Jonsson H, Gudnadottir VG, Gudmundsdottir E, Bjornsson A, Ingvarsson B, Ingason A, Sigfusson S, Hardardottir H, Harvey RP, Lai D, Zhou M, Brunner D, Mutel V, Gonzalo A, Lemke G, Sainz J, Johannesson G, Andresson T, Gudbjartsson D, Manolescu A, Frigge ML, Gurney ME, Kong A, Gulcher JR, Petursson H, Steffansson

- K (2002) Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71:877-892.
- Talmage DA, Role LW (2004) Multiple personalities of neuregulin gene family members. *J Comp Neurol* 472:134-139.
- Thompson M, Lauderdale S, Webster MJ, Chong VZ, McClintock B, Saunders R, Weickert CS (2007) Widespread expression of ErbB2, ErbB3 and ErbB4 in non-human primate brain. *Brain Res*, doi :10.1016/j.brainres.2006.11.047
- Winterer G, Weinberger DR (2004) Genes, dopamine and cortical signal-to-noise ratio in schizophrenia. *Trends Neurosci* 27 :683-690.
- Yau H-J, Wang H-F, Lai C, Liu F-C (2003) Neural development of the neuregulin receptor ErbB4 in the cerebral cortex and the hippocampus : preferential expression by interneurons tangentially migrating from the ganglionic eminences. *Cer Cortex* 13:252-264.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. *Immunoblotting of ErbB4 expression in developing and adult frontal cortex and hippocampus.* Total lysates (40 μ g protein/lane) of immature (P5) and adult (>P60) cerebral cortex (left lanes) and hippocampus (right lanes) immunoblotted with the affinity purified anti-ErbB4 antibody. Equivalent loading was verified by b-actin immunodetection.

Fig. 2. *Immunocytochemical control experiments.* (a) Immunoperoxidase staining pattern observed in adult rat dorsal hippocampus incubated with polyclonal antibody directed against the carboxy-terminal portion of ErbB4 receptor. Immunostaining was completely abolished by pre-incubating this antibody with its antigenic peptide (b) or by omitting it from the procedure (c). See *Experimental procedures* for detailed protocols. Scale bar : 500 μ m

Fig. 3. *Distribution of ErbB4-immunoreactive elements in the frontal cortex during postnatal development.* (a) At birth (P0), immunostaining appeared mostly concentrated in the upper cortical plate (CP), just beneath the marginal zone (MZ), in the form of a dark band parallel to the cortical surface. (b) Five days later (P5), several faintly ErbB4-immunoreactive cells became visible in the deeper layers. (c) At P10, the labeled band parallel to the cortical surface had decreased in intensity and were now observed throughout the cortical thickness beneath layer I. (d) Two weeks after birth (P15), ErbB4-immunoreactive cell bodies displayed multiple emerging processes. (e) The number and density of ErbB4-immunoreactive cells increased over the next two weeks and reached the adult pattern of distribution (f) by the end of the first postnatal month (P30). Scale bar : 100 μ m

Fig. 4. *Salient features of ErbB4-IR observed in the frontal cortex during postnatal development.* (a) Fibrous elements resembling neuritic extensions composed the immunoreactive band in the upper cortical plate at birth. (b) Some faintly ErbB4-immunoreactive cells observed at P5 in the deeper layers are indicated (arrows). Multipolar cells (arrows) are shown in cortical layer II/III at P10 (c) and layer IV at P15 (d). Densely packed cells observed in upper layer V at P30 (e) and in adult (f).

Note that many of these cells have a pyramidal cell morphology (arrowheads in **e,f**) and that their apical dendrite is often clearly visible (arrows in **e,f**). Scale bars : 50 μm

Fig. 5. *Distribution of ErbB4-immunoreactive elements in the dorsal hippocampus during postnatal development.* **(a)** At birth (P0), somewhat diffuse ErbB4-IR was observed in all layers of the dentate gyrus (DG) and hippocampus proper. In CA1-CA3 fields, it was most prominent in the pyramidal layer. At P5 and P10, ErbB4-IR cells seemed more concentrated within the confines of the pyramidal cell layer. Scattered ErbB4-IR cells were also seen in the hilus and granule cell layer from P5 **(b)**, and their number increased steadily until the end of the first month **(c-f)**. **(d)** At P15, the number of darkly labeled cells was increased in the pyramidal layer in CA1-CA3, but continued to be present in lesser numbers in the other layers. **(e)** Cell packing in the pyramidal cell layer had increased at P30 and continued to do so until adulthood **(f)**. In the adult, the pyramidal layer in CA fields and hilus in the dentate gyrus had the high density of ErbB4-immunoreactive cells, with sparse cells being also found in other layers **(f)**. Scale bars : 500 μm

Fig. 6. *Salient features of ErbB4-IR observed in the CA1 field of the dorsal hippocampus during postnatal development.* **(a)** Fibrous elements resembling those observed in the neocortical cortical plate were immunostained within and dorsal to the pyramidal cell layer (arrows). Numerous faintly ErbB4-IR cells were observed within and surrounding the pyramidal cell layer at P5 **(b)**, which were more neatly defined and more tightly packed at P10 **(c)**. Between P15 and adulthood **(d-f)**, the number and packing of cells were greatly increased within the pyramidal cell layer. Scattered ErbB4-immunoreactive cells were also present in the *stratum oriens* and *stratum radiatum* (arrow in **f**). **Or** : *stratum oriens*; **Py** : pyramidal cell layer; **Rad** : *stratum radiatum*. Scale bars : 50 μm

Fig. 7. *ErbB4-IR is exclusively neuronal in the newborn cortex.* At birth, ErbB4-IR cells are distinct from those immunostained for the radial glial marker nestin, both in the frontal cortex **(a)** and dorsal hippocampus **(b)**. **(c)** ErbB4-immunoreactive processes are double-stained for the neuron-specific marker NeuN, and clearly emerge from neuronal cell bodies in the upper cortical plate (arrows in **d**). Scale bars : 50 μm

Fig. 8. *ErbB4-IR in cortical plate apical dendrites.* At birth, ErbB4-IR is mainly observed in the apical cytoplasm and neurites of upper cortical plate neurons. As illustrated by the thick arrows, the regions of strongest ErbB-IR do not overlap with MAP2-immunoreactive elements. However, as shown in the inset (magnification of the area adjacent to the star) ErbB4- and MAP2-IR co-localize on thicker dendrites originating from the lower cortical layers. Note the punctate distribution of ErbB4-IR on these dendrites (thin arrows). Scale bar : 50 μ m.

Fig. 9. *ErbB4-IR is not astrocytic and remains neuronal in the developing cortex (P10).* In the immature frontal cortex, ErbB4-immunoreactive cells in the upper **(a)** and lower **(b)** cortical layers are clearly distinct from GFAP-immunoreactive astrocytes (arrow in **a**), and never associated with blood vessels, such as the one delineated by astrocytic end-feet (arrows) in **(b)**. **(c)** ErbB4-immunoreactive cells are double-labeled for the neuron-specific marker NeuN in all CA1 layers of the hippocampus, as illustrated by the arrows. **(d)** Examples of ErbB4-labeled somatodendrites in cortical layer II/III. Note that ErbB4 is variably distributed among neurons, from complete absence of staining (thin arrow) to very intense cytoplasmic staining (thick arrow). Scale bars : 50 μ m.

Fig. 10. *ErbB4-IR is neuronal in the adult cortex.* ErbB4-IR remained distinct from GFAP-immunoreactive astrocytes **(a)** but always co-localized with the neuron-specific marker NeuN **(b, arrows)**, as respectively illustrated in layers IV and V of the adult frontal cortex. Scale bars : 50 μ m.

Fig. 11. *Subcellular localization of dendritic ErbB4-IR in the adult frontal cortex and dorsal hippocampus.* Immunoperoxidase (DAB) **(a,b,d,e)** and silver-enhanced immunogold stainings **(c,f,g-i)** were used to investigate the subcellular localization of ErbB4-immunoreactivity in layer V of the frontal cortex **(a-c,g-i)** and *stratum radiatum* of the hippocampal CA1 field **(d-f)**. In both regions, the distribution of ErbB4-IR was identical, as it was most frequently observed in dendritic branches and spines, and never in axons. DAB was found to precipitate along the post-synaptic density of ErbB4-immunoreactive spines (arrowheads in **a,b,e**). The most prevalent staining was found in small- to medium-size dendritic branches **(c,d,f-i)**, in which silver-enhanced gold particles were generally observed to be associated with microtubules (thin arrows

in **c,f-i**) but also occasionally near or at the plasma membrane (e.g. thick arrow in **c**). Scale bars in **a,b,e** : 0,5 μm and in **c,d,f-i** : 1 μm .

Fig. 12. *Subcellular localization of ErbB4-IR in cortical and hippocampal neurons.* As indicated by white stars (**a,b**), ErbB4-IR was readily observed in the nucleus (blue) of cortical (**a**) and hippocampal neurons (**b**). Note the adjacent, unlabeled neurons (**a,b**). (**c**) High magnification of an ErbB4-immunoreactive neuron in frontal cortex layer V. Scale bars : 1 μm .

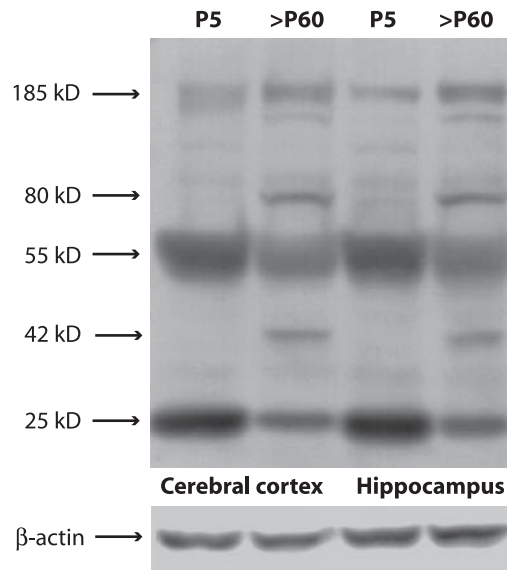


Figure 1. Immunoblotting of ErbB4 expression in developing and adult frontal cortex and hippocampus.

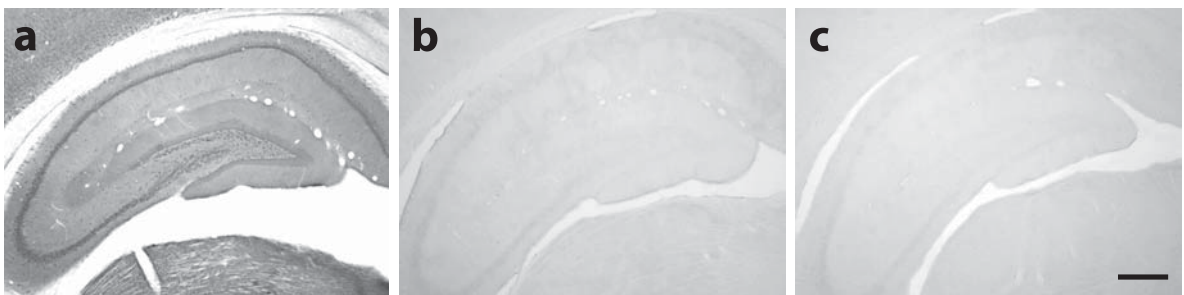


Figure 2. Immunocytochemical control experiments.

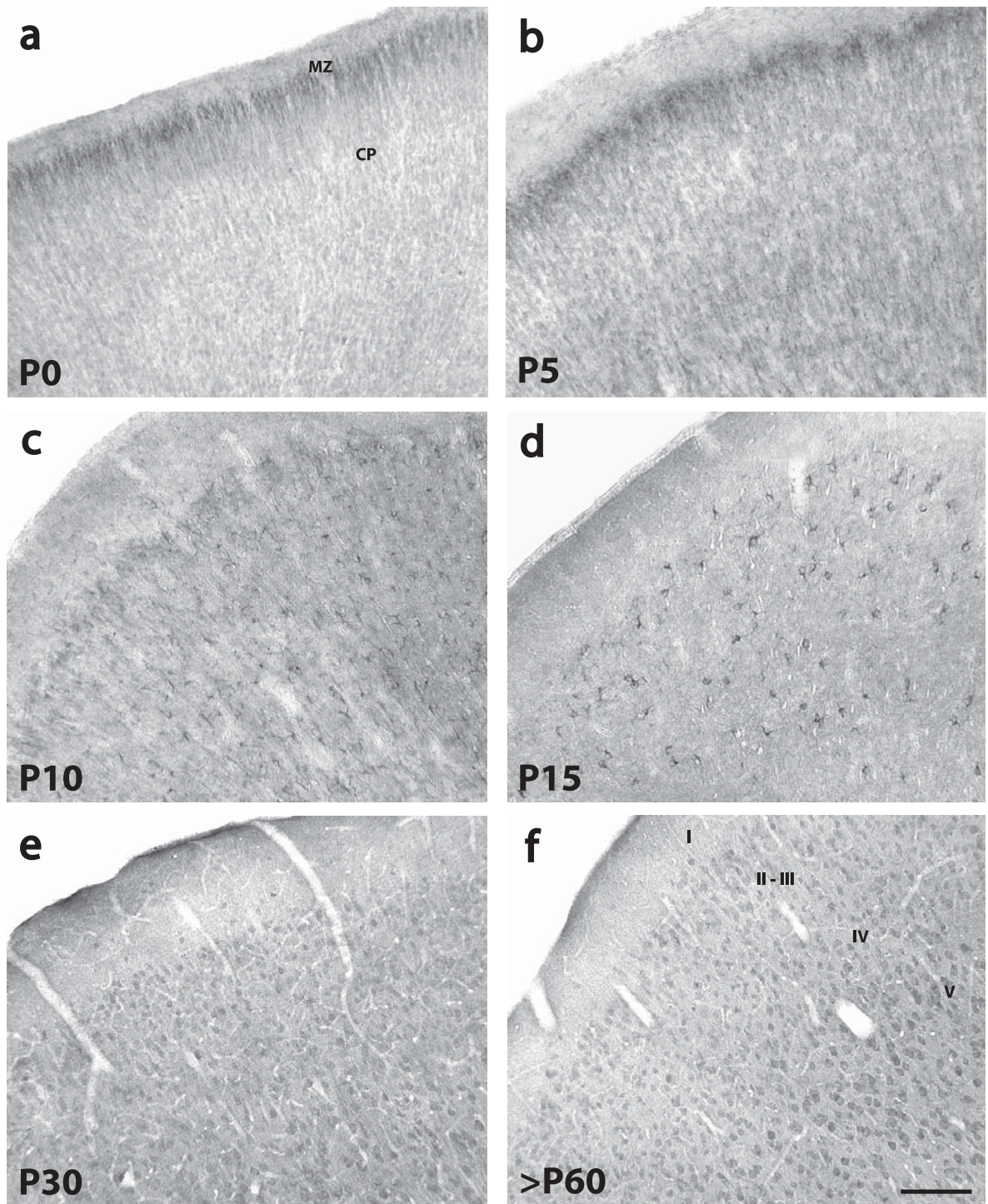


Figure 3. Distribution of ErbB4-immunoreactive elements in the frontal cortex during postnatal development.

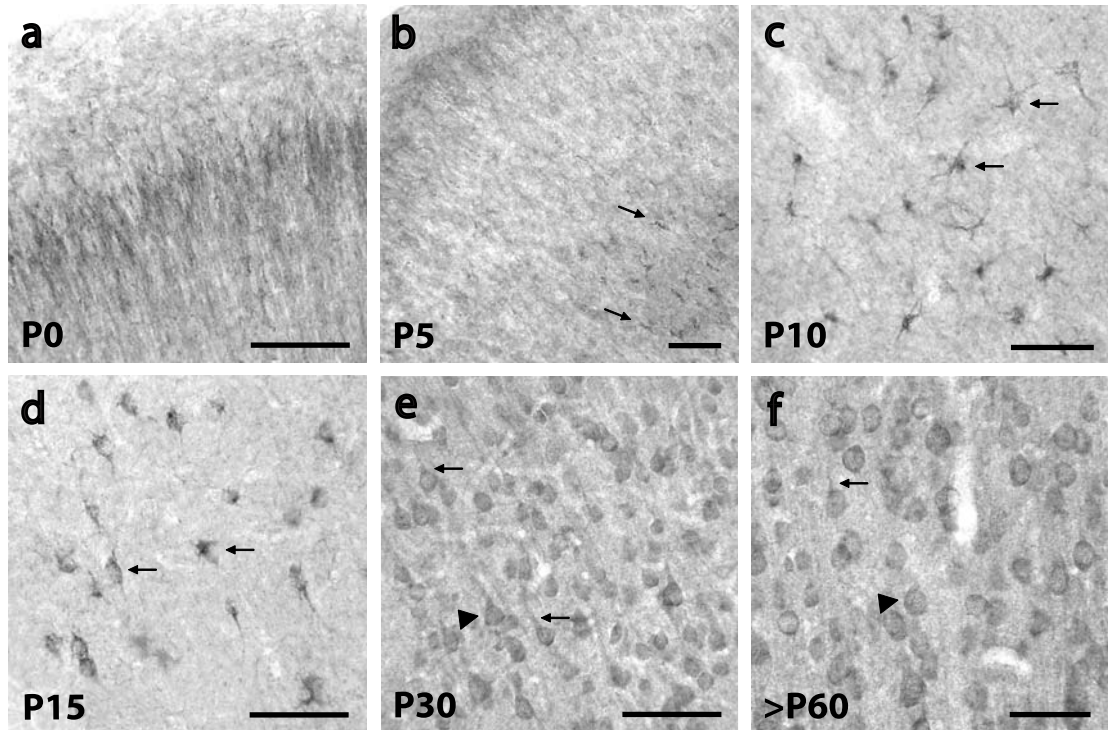
Frontal Cortex

Figure 4. Salient features of ErbB4-IR observed in the frontal cortex during postnatal development.

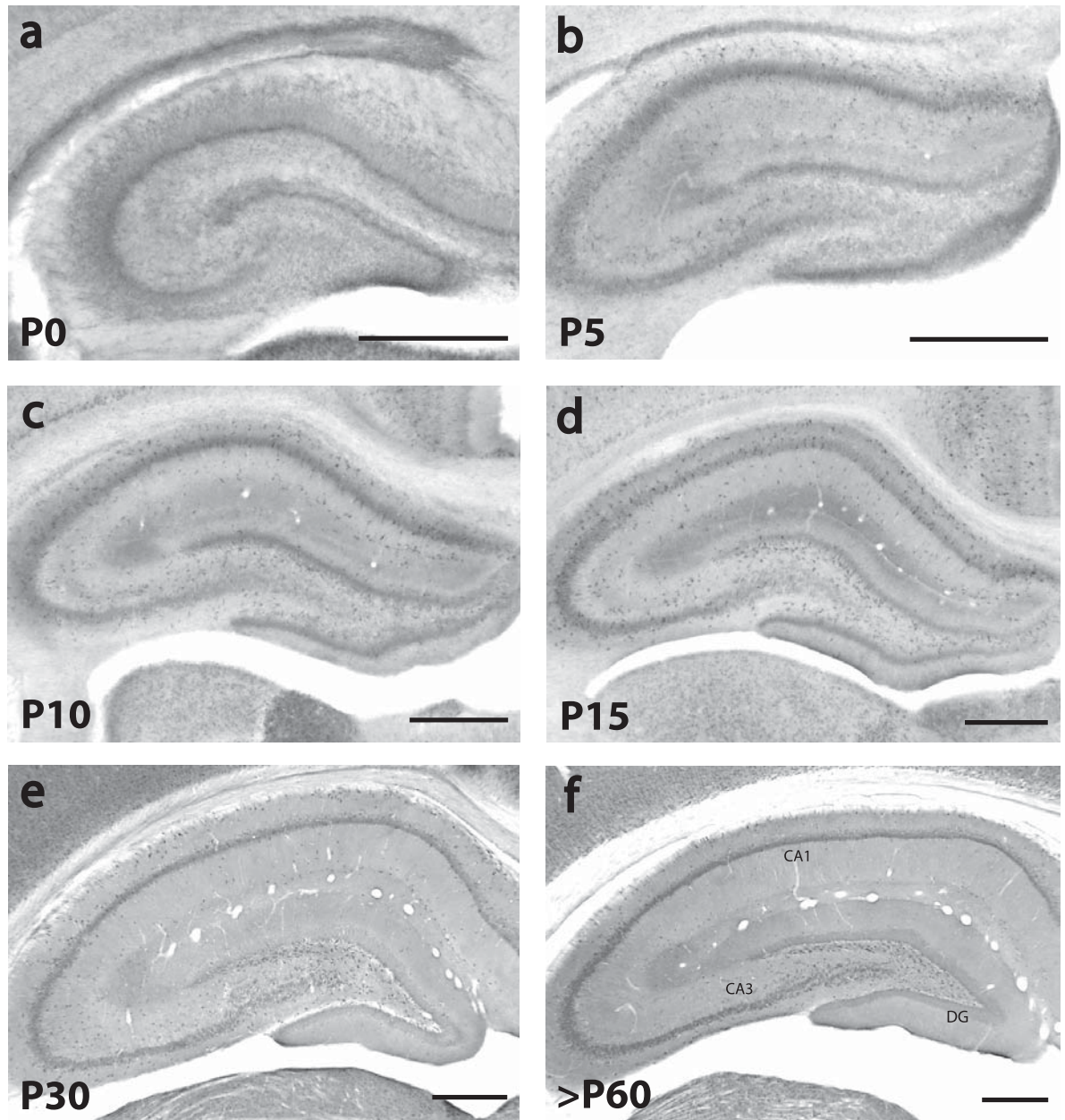


Figure 5. Distribution of ErbB4-immunoreactive elements in the dorsal hippocampus during postnatal development.

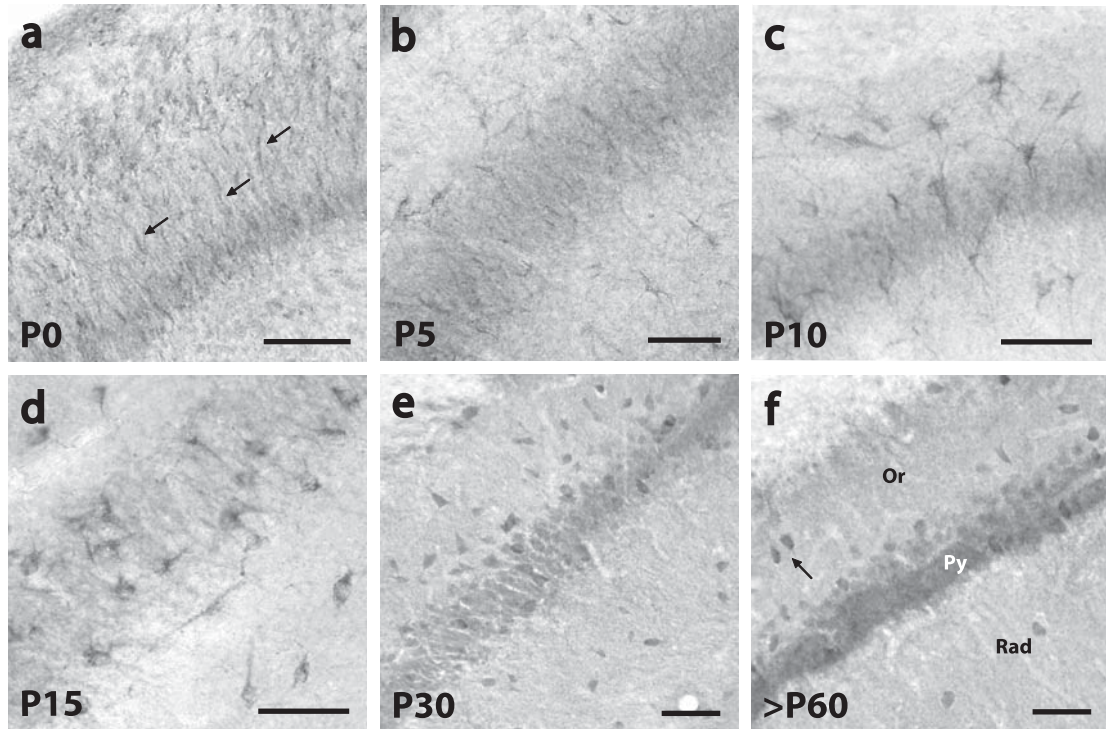
Hippocampus (CA1)

Figure 6. Salient features of ErbB4-IR observed in the CA1 field of the dorsal hippocampus during postnatal development.

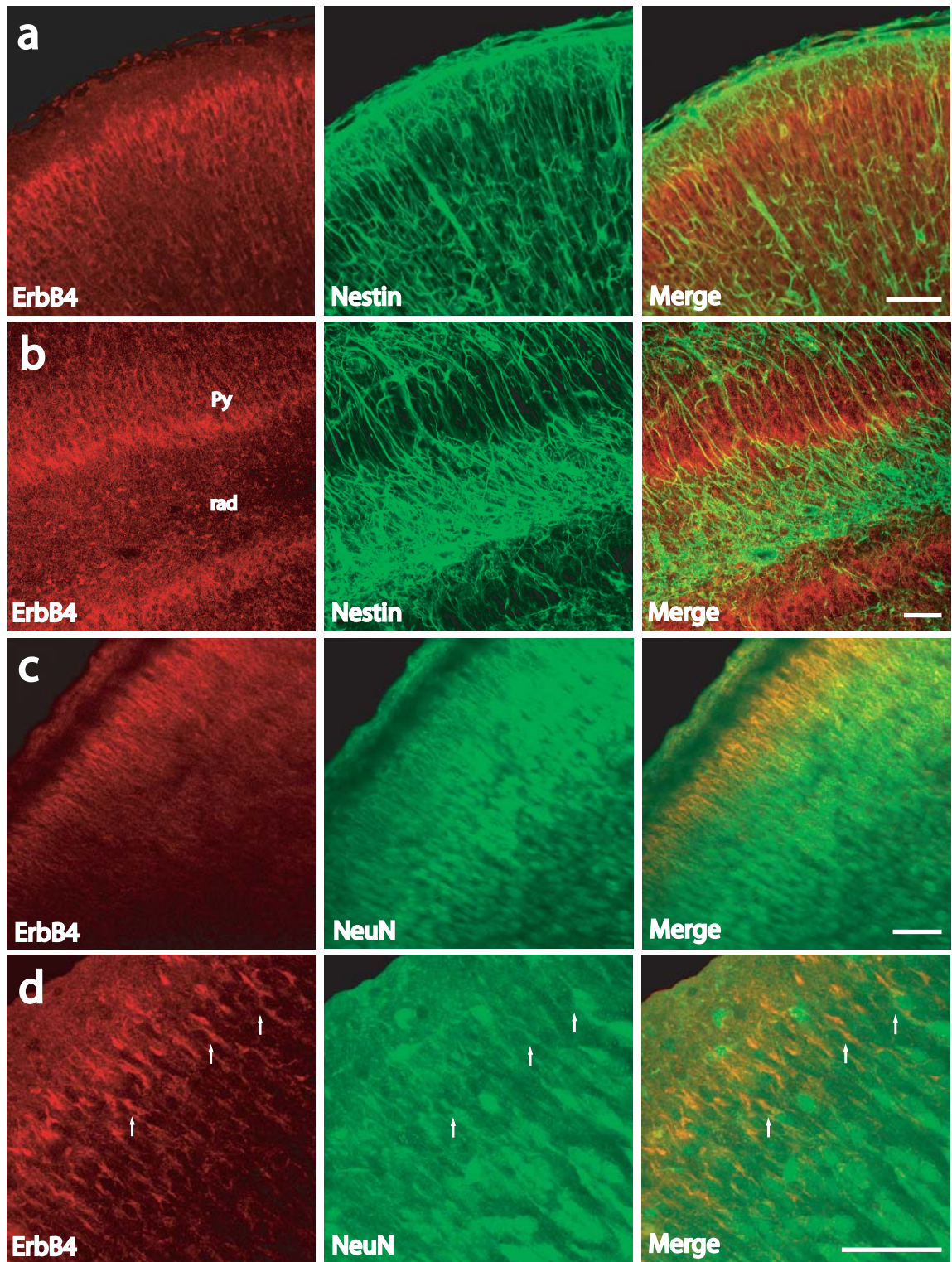


Figure 7. ErbB4-IR is exclusively neuronal in the newborn cortex.

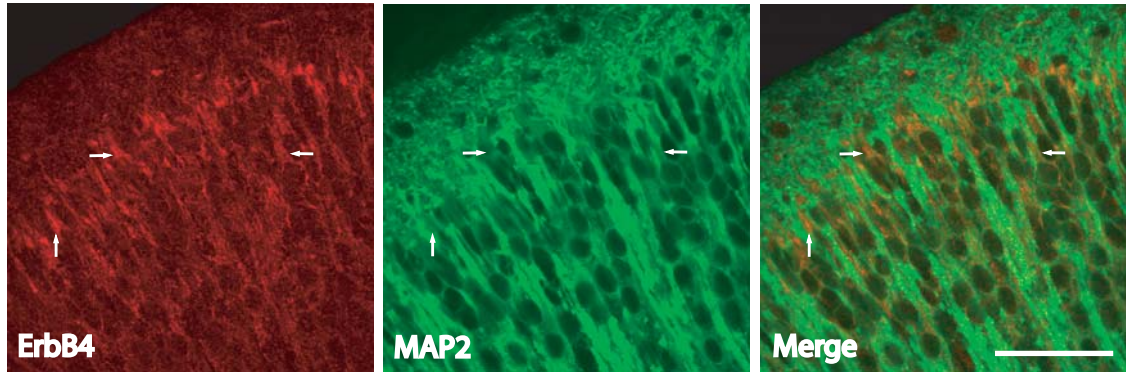


Figure 8. ErbB4-IR in cortical plate apical dendrites.

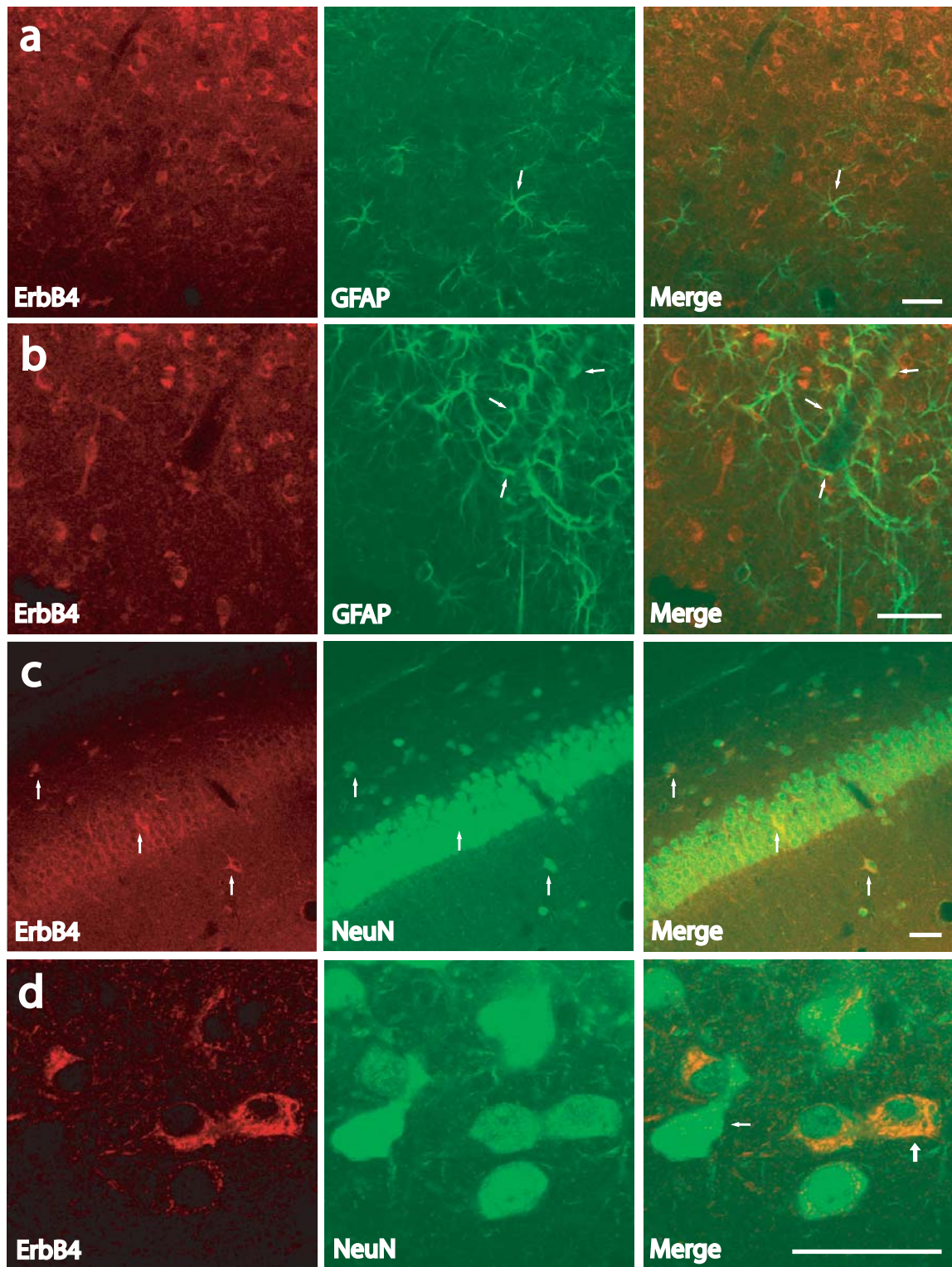


Figure 9. ErbB4-IR is not astrocytic and remains neuronal in the developing cortex (P10).

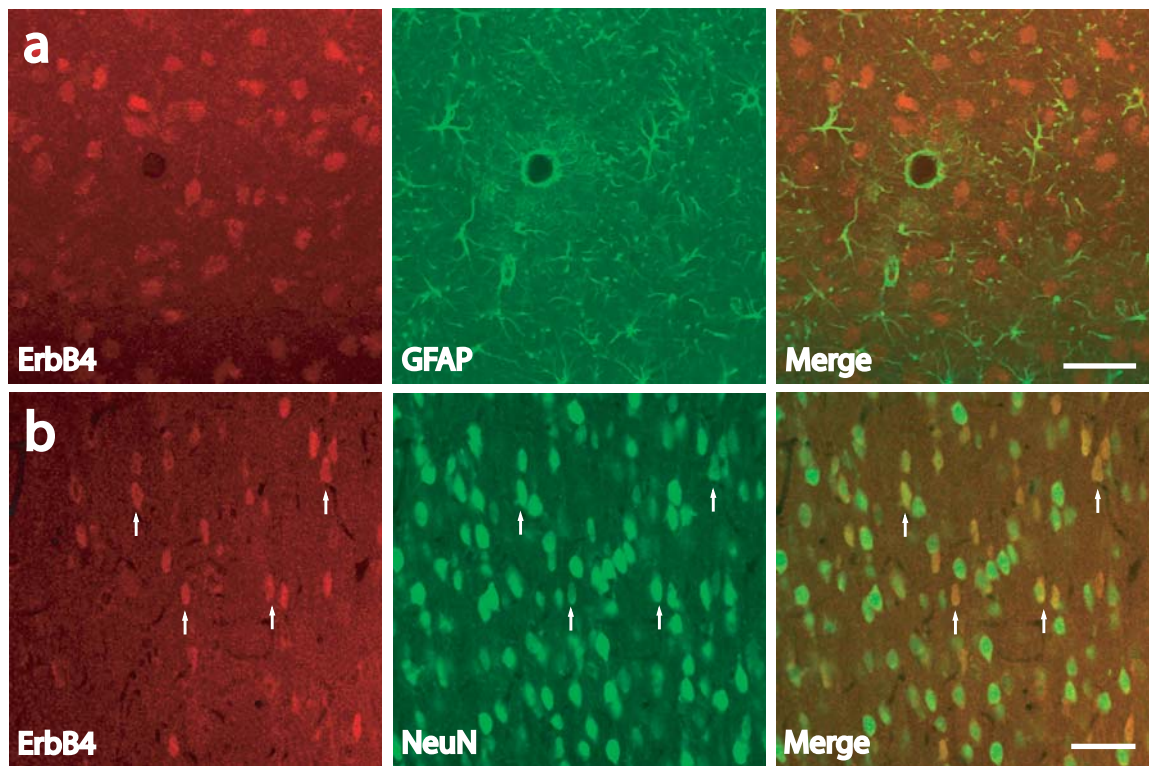


Figure 10. ErbB4-IR is neuronal in the adult cortex.

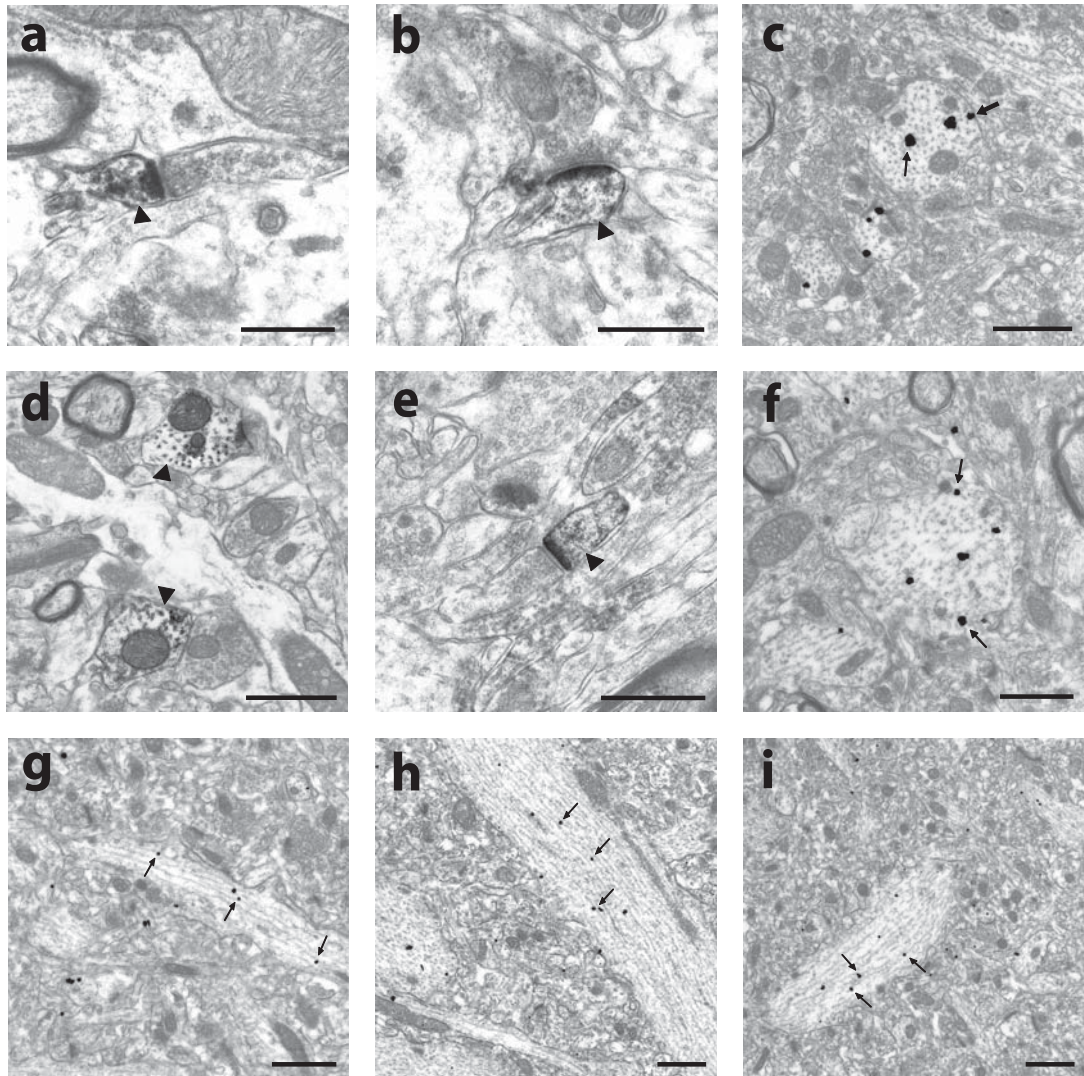


Figure 11. Subcellular localization of dendritic ErbB4-IR in the adult frontal cortex and dorsal hippocampus.

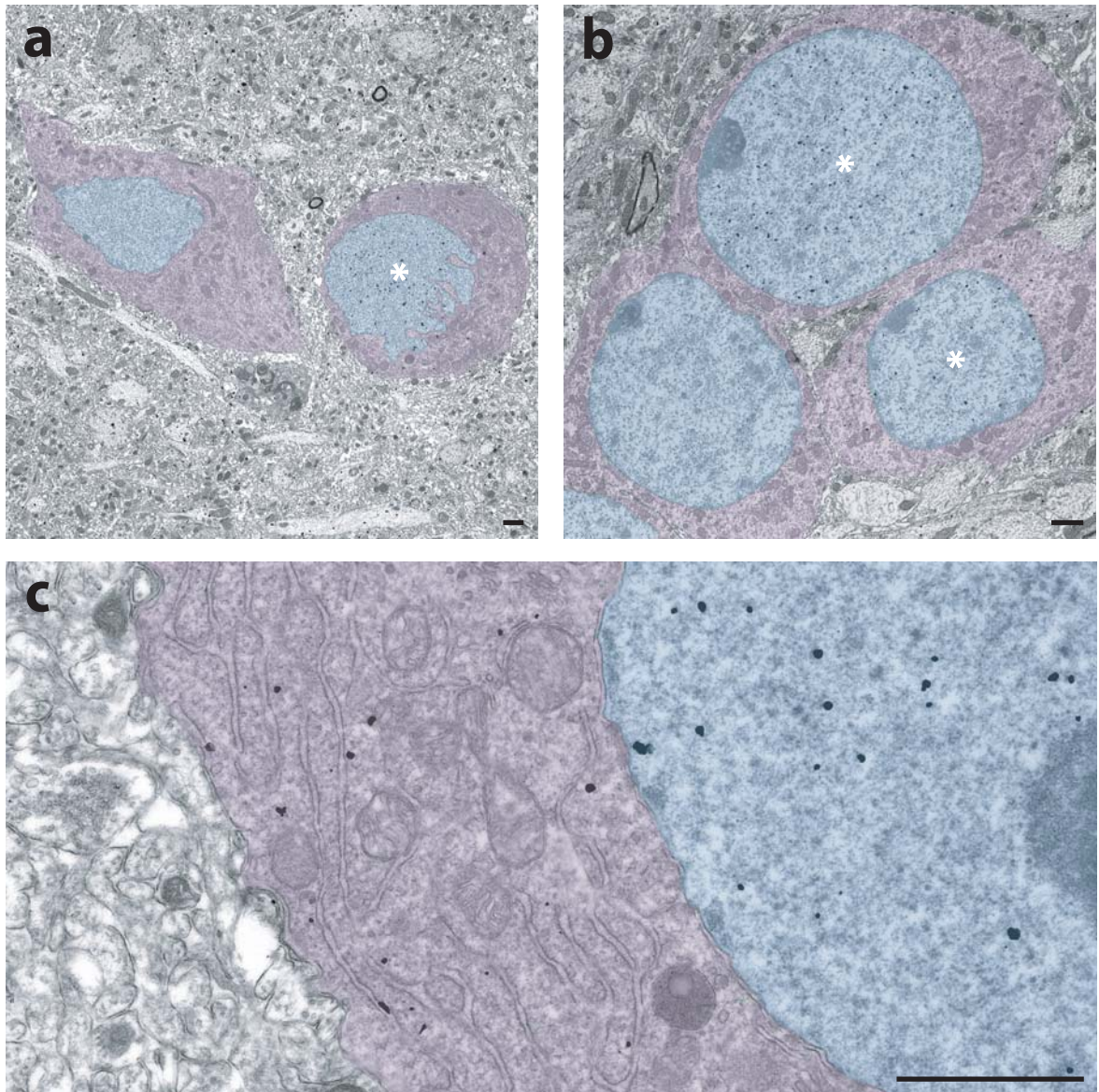


Figure 12. Subcellular localization of ErbB4-IR in cortical and hippocampal neurons.