

Université de Montréal

**Rôle des tachykinines et de leurs récepteurs dans la  
régulation centrale de la fonction cardiovasculaire chez le  
rat normotendu et hypertendu**

par

Andrée Lessard

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

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

Février 2003

© Andrée Lessard, 2003



W  
4  
U58  
2003  
v.134

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Rôle des tachykinines et de leurs récepteurs dans la régulation centrale de la fonction  
cardiovasculaire chez le rat normotendu et hypertendu

présentée par :

Andrée Lessard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jacques de Champlain

Dr. Réjean Couture

Dr. Pierrette Gaudreau

Dr. Édith Hamel

Président-rapporteur

directeur de recherche

membre du jury

examineur externe

Thèse acceptée le :

## Sommaire

L'objectif général de cette thèse était d'évaluer le rôle des tachykinines (TK) dans la régulation centrale des fonctions cardiovasculaires (CV) au niveau de la substance noire (SN) et de la région périventriculaire chez le rat normotendu (Wistar et Wistar-Kyoto, WKY) et spontanément hypertendu (SHR). La fréquence cardiaque (FC), la pression artérielle moyenne (PAM) et divers comportements (reniflements, exploration, toilettage du museau et des pattes arrières, secousses corporelles, grattements de la tête, locomotion) sont mesurées suite à des injections intranigrales ou intracérébroventriculaire (i.c.v.) d'agonistes et d'antagonistes sélectifs aux trois récepteurs des TK chez le rat éveillé et non immobilisé.

**Première étude:** chez le rat Wistar, l'injection intranigrale de doses croissantes d'agonistes des trois récepteurs des TK provoque d'importantes tachycardies sans altération de l'activité comportementale ou de la PAM. Les tachycardies sont bloquées sélectivement et de façon réversible par leur antagoniste respectif, par un traitement intraveineux (i.v.) avec un antagoniste  $\beta_1$ -adrénergique (aténolol) seul (agonistes NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub>) ou en combinaison avec un antagoniste muscarinique (atropine) (agoniste NK<sub>1</sub>).

**Deuxième étude:** chez le SHR, l'administration intranigrale de l'agoniste NK<sub>1</sub> augmente significativement la PAM et la FC, l'agoniste NK<sub>2</sub> provoque une tachycardie similaire à celle observée chez le rat Wistar alors que l'agoniste NK<sub>3</sub> ne provoque aucun effet CV. Ce dernier effet n'est pas dû à un changement au niveau de la densité (B<sub>max</sub>) et de l'affinité (K<sub>D</sub>) des récepteurs NK<sub>3</sub> dans la SN puisque les valeurs quantitatives de ces deux paramètres sont similaires chez le SHR et WKY. L'injection intranigrale d'un antagoniste NK<sub>3</sub>, le R-820, atténue l'hypertension des SHR durant plus de 3 heures sans altérer la PAM des rats Wistar et WKY. Le R-820 ne cause aucun effet sur la FC ou l'activité comportementale.

**Troisième étude:** l'injection i.c.v. (mais non i.v.) de deux antagonistes NK<sub>3</sub> (R-820 ; SB 222200) corrige l'hypertension artérielle chez le SHR (maximum à 8h et 24h post-injection) mais n'altère pas la PAM des WKY, ni la FC et l'activité comportementale (SHR et WKY). Les antagonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> ainsi que l'énantiomère inactif du SB 222200 sont sans effet CV chez le rat Wistar, WKY et SHR. L'injection i.c.v. du SB 222200 chez le SHR n'altère pas les niveaux plasmatiques des

catécholamines et de la vasopressine. Aussi, l'effet anti-hypertenseur du SB 222200 est reproduit chez le SHR bi-néphrectomisé.

**Conclusions :** 1) cette étude met en évidence un nouveau mécanisme central impliqué dans le contrôle autonome du rythme cardiaque (voie dopaminergique nigrostriée) et dans le maintien d'une pression artérielle élevée chez le SHR (récepteurs NK<sub>3</sub> centraux). 2) les récepteurs NK<sub>3</sub> des TK peuvent s'avérer une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'hypertension artérielle.

**Mots Clés :** Tachykinines, récepteurs NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> des tachykinines, substance noire, régulation centrale autonome, hypertension artérielle.

## Abstract

The aim of this thesis was to investigate the involvement of tachykinins (TK) in central mechanisms of cardiovascular (CV) regulation at the substantia nigra (SN) and periventricular (i.c.v.) levels in normotensive (Wistar and Wistar-Kyoto, WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). Heart rate (HR), mean arterial pressure (MAP) and behavioural activity (sniffing, rearing, face washing, wet dog shake, head scratching, grooming, locomotion) were measured after SN or i.c.v. injection of selective agonists and antagonists for the three TK receptors in the freely moving rat. **First study:** in Wistar rats, SN microinjection of increasing doses of TK agonists at each receptor evoked tachycardia which were selectively and reversibly blocked by the prior injection of their respective antagonists, and were not associated with changes in MAP or behaviour. Tachycardia were blocked by an i.v. treatment with atenolol ( $\beta_1$ -adrenoceptor antagonist) alone (NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> agonists) or in combination with atropine (muscarinic antagonist) (NK<sub>1</sub> agonist). **Second study:** in SHR, SN microinjection of the NK<sub>1</sub> agonist increased both MAP and HR, the NK<sub>2</sub> agonist evoked a tachycardia similar to that observed in Wistar rats while the NK<sub>3</sub> agonist had no CV effect. The latter is not due to changes of the affinity ( $K_D$ ) and density ( $B_{max}$ ) of NK<sub>3</sub> receptors in the SN because the quantitative values of the two parameters were similar in SHR and WKY. Nigral injection of the NK<sub>3</sub> antagonist (R-820) reduced MAP for over 3h in SHR but not in WKY. R-820 had no effect on HR or behaviour (SHR and WKY). **Third study:** i.c.v. but not i.v. injection of two structurally unrelated NK<sub>3</sub> receptor antagonists (R-820, SB 222200) abolished arterial hypertension in SHR (peaked at 8h and 24h post-injection) but had no significant effect on MAP in WKY, nor on HR and behaviour (SHR and WKY). The NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> antagonists or the inactive enantiomer of SB 222200 had no significant CV effect in SHR and control rats. I.c.v. injection of SB 222200 in SHR did not alter plasma levels of catecholamines and vasopressin. Also, the anti-hypertensive effect of SB 222200 was reproduced in bi-nephrectomized SHR.

**Conclusions:** 1) this study highlights a new central mechanism involved in the autonomic control of HR (nigrostriatal dopaminergic pathway) and in the maintenance of high blood pressure in SHR (central NK<sub>3</sub> receptors). 2) central NK<sub>3</sub> receptors may represent a promising therapeutic target in the treatment of arterial hypertension.

**Key Words :** tachykinins, tachykinin NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors, substantia nigra, central autonomic regulation, arterial hypertension.

*Sur un rocher  
J'étais appuyée  
Insouciante, souriante  
Lorsque soudainement, cruellement  
Mes membres ont glissés, mon corps a tremblé  
Et dans le vide du désespoir  
Mes pensées ont basculées  
Ce rocher si fort, si résistant  
S'est affaibli, s'est détruit inexorablement  
Jusqu'à l'agonie  
Jamais je n'oublierai ce visage si calme, si ravagé  
Sans aucune colère, sans plainte ni remords  
Malgré la douleur qui mord  
J'ai vu les derniers jours de ce visage  
En me disant tous bas  
Qu'aucun père ne peut donner une preuve aussi puissante  
De son propre courage, à ses enfants  
Devant l'inconnu  
Devant l'inévitable  
Ce visage restera en moi  
Pour me dire de ne pas baisser les bras  
De rester debout  
De ne jamais abandonner...  
Merci Papa,  
Ta fille Andrée*

## Remerciements

Une thèse ne se résume pas à un ensemble de phrases et de chiffres. Au-delà de ces pages, il y a cinq années de ma vie : un travail acharné, de grandes victoires, de grands projets et une douloureuse épreuve... Malgré tout, mille et un petits plaisirs ont accompagné mon long processus d'apprentissage. Derrière tout ça : la famille, des amis, des collègues, et surtout, un mentor. Merci de tout cœur, Réjean, pour cet élan de générosité qui ne s'est jamais affaibli du début à la fin de ma formation. J'en retiens toute la rigueur scientifique, l'honnêteté, la disponibilité et l'immense compréhension autant professionnelle qu'humaine. Je suis persuadée que cet enseignement me servira tout au long de ma carrière. En retour, je ne peux qu'offrir toute ma gratitude et mon profond respect.

Un grand merci également à tous mes collègues de travail qui ont fait de ce laboratoire un environnement agréable et enrichissant. Un merci spécial à certains collègues : Marlène Laurin qui m'a donné un énorme coup de main pour finir mes expériences et mettre un point final à cette histoire sans fin, Brice Ongali et Maria Martha Campos pour m'avoir appris la technique de liaison en autoradiographie. Merci également à mes copains du Département : Nathalie Sanon, Dorothy Barthelemy, Frédéric Manseau, Grégory Dalbo, Nadia Gosselin-Kessiby, Nadine Michaud, Cécile Langlet, Frédéric Bretzner, Julien Voisin, Valérie Lapointe, François Auclair, Jean-Charles Guimond... Bref, toute la gang d'étudiants en Sciences Neurologiques ; pour tous ces bons moments ensemble aux congrès de la Society for Neuroscience à New Orleans, San Diego et Orlando. Un merci immense à mes amis de longue date : Jacky Gagnon, Marie-Josée Grégoire et Ann Michaud. Vous avez tous mon entière loyauté (ami un jour, ami pour toujours) et votre présence va

sûrement me manquer cruellement. Je ne pourrais passer outre l'apport de ma famille, leur soutien est essentiel à mon bien-être émotionnel. Nous avons tous subi une épreuve terrible avec la maladie et le décès de mon père Gilles. Merci, maman Madeline, ma presque sœur jumelle, pour être là, tout simplement. Tu as fait preuve d'un courage et d'un dévouement exceptionnel. Merci à mes deux frères (Patrick et Gilles Jr.), ma belle-sœur Diane, ma nièce et ma filleule (Élisabeth et Alexanne). Pour tous ces moments ensemble, les fêtes, le chalet, les promenades en bateau ou en forêt... Je nous en souhaite encore et encore, de ces moments magiques, privilégiés... L'orage est passée, nous sommes maintenant à l'aube des jours heureux...

Je remercie chaleureusement le Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome (GRSNA) et son directeur, le Dr. Jacques de Champlain, pour tous les efforts déployés à la formation des étudiants gradués, notamment pour sa Journée Scientifique Annuelle et son club de lecture. Cette formation supplémentaire (critique d'articles, formation assistée par caméra pour nos présentations orales...) m'a beaucoup aidée lors de mes études et me servira, j'en suis persuadée, dans ma carrière future. Merci également pour toutes les contributions fort généreuses qui m'ont permis de participer à plusieurs congrès pertinents dans mon domaine de recherche. Sans votre aide, j'aurais été dans l'obligation d'en manquer quelques uns faute de fonds... Je tiens à remercier la Fondation des Maladies du Cœur du Canada qui m'a soutenu financièrement durant les quatre dernières années de mon Ph.D. ainsi que l'organisme FCAR-Santé-Doctorat (FRSQ) qui m'a également octroyé une bourse de recherche.

# Table des matières

Sommaire.....	ii
Abstract.....	iv
Remerciements.....	vii
Table des matières.....	ix
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xv
CHAPITRE I: INTRODUCTION.....	1
1.0 Avant-propos.....	3
1.0.1 L'étude de l'hypertension artérielle : Défier la complexité.....	3
1.0.2 Le système nerveux autonome : Une rôle stratégique dans l'hypertension artérielle.....	6
1.0.3 Les tachykinines et leurs récepteurs : régulation centrale de la fonction cardiovasculaire et hypertension artérielle.....	7
1.1 Introduction.....	11
1.1.1 Historique des tachykinines.....	11
1.1.2 Biosynthèse et activité biologique des tachykinines.....	12
1.1.3 Agonistes et antagonistes sélectifs aux récepteurs des tachykinines.....	18
1.1.3.1 Les agonistes.....	18
1.1.3.2 Les antagonistes.....	19
1.1.4 Distribution des tachykinines et de leurs récepteurs dans le système nerveux central.....	22
1.1.4.1 La substance P.....	22
1.1.4.2 Les neurokinines A et B.....	27
1.1.4.3 Le récepteur NK <sub>1</sub> .....	30
1.1.4.4 Le récepteur NK <sub>2</sub> .....	33
1.1.4.5 Le récepteur NK <sub>3</sub> .....	34
1.2 Fonctions physiologiques des tachykinines.....	35
1.2.1 Réponse centrale de la substance P.....	36
1.2.2 Utilisation d'agonistes et d'antagonistes sélectifs pour les études fonctionnelles.....	39
1.2.3 La désensibilisation des récepteurs.....	42
1.3 L'hypothalamus : site des effets cardiovasculaire des tachykinines?.....	44
1.3.1 Relation fonctionnelle entre les tachykinines et la vasopressine.....	45
1.3.2 Relation fonctionnelle entre les tachykinines et l'ocytocine.....	47
1.4 Le bulbe rachidien : modulation des baroréflexes par les tachykinines?.....	48
1.4.1 Aspect anatomique des tachykinines dans le noyau du tractus solitaire.....	48
1.4.2 Aspect physiologique des tachykinines dans le noyau du tractus solitaire.....	49
1.4.3 Aspect physiologique des tachykinines dans la médulla.....	53
1.5 Les ganglions de la base : régulation des voies dopaminergiques provenant de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale.....	53
1.5.1 Les noyaux caudé et putamen du striatum.....	54
1.5.2 La substance noire.....	57
1.5.2.1 Études fonctionnelles avec les tachykinines dans la substance noire.....	61
1.5.2.2 Modulation de la voie dopaminergique nigrostriée par les tachykinines.....	62
1.5.2.3 La maladie de Parkinson.....	64
1.5.2.4 La substance noire: rôle potentiel dans la régulation centrale des fonction cardiovasculaires.....	68
1.5.3 L'aire tegmentale ventrale.....	71

1.5.3.1	La schizophrénie.....	72
1.5.3.2	Implication de l'ATV dans la régulation centrale des fonctions cardiovasculaires..	73
1.6	La région périaqueducatale grise : réponses comportementales d'agressivité .....	74
1.7	L'amygdale, site central du stress émotionnel.....	74
1.8	Implication des tachykinines dans d'autres pathologies d'origine centrale .....	75
1.8.1	L'anxiété et la dépression.....	75
1.8.2	Le sevrage aux opiacés .....	76
1.8.3	La migraine .....	77
1.8.4	Les mécanismes centraux du vomissement.....	78
1.8.5	L'épilepsie.....	79
1.8.6	Rôle potentiel des tachykinines centrales dans l'hypertension artérielle.....	80
1.8.6.1	L'héritage scientifique de la clonidine .....	81
1.9	Problématique et justification de l'étude.....	84
CHAPITRE II: PREMIER ARTICLE.....		89
	Résumé de l'étude.....	90
	Introduction.....	96
	Methods.....	99
	Results.....	106
	Discussion.....	112
	Acknowledgements.....	117
	References.....	118
CHAPITRE III: DEUXIÈME ARTICLE.....		133
	Résumé de l'étude.....	134
	Introduction.....	138
	Methods.....	141
	Results.....	151
	Discussion.....	155
	Acknowledgements.....	161
	References.....	162
CHAPITRE IV: TROISIÈME ARTICLE.....		179
	Résumé de l'étude.....	180
	Introduction.....	184
	Methods.....	187
	Results.....	195
	Discussion.....	198
	Acknowledgements.....	203
	References.....	204
CHAPITRE V: QUATRIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCE.....		221
5.1	Introduction .....	222
5.2	Matériel et méthodes .....	224
5.2.1	Implants chirurgicaux .....	224
5.2.2	Mesure des paramètres cardiovasculaires et comportementaux.....	225
5.2.3	Histologie.....	226
5.2.4	Protocole expérimental : courbe dose-réponse aux agonistes.....	227
5.2.5	Drogues et solutions utilisées .....	227
5.2.6	Statistiques .....	228
5.3	Résultats .....	229
5.3.1	Effets cardiovasculaires de l'agoniste des récepteurs NK <sub>1</sub> .....	229
5.3.2	Effets cardiovasculaires de l'agoniste des récepteurs NK <sub>2</sub> .....	230
5.3.3	Effets cardiovasculaires de l'agoniste des récepteurs NK <sub>3</sub> .....	231

5.3.4 Effets comportementaux des agonistes.....	232
5.4 Discussion.....	233
5.5 Références.....	238
CHAPITRE VI: DISCUSSION GÉNÉRALE.....	251
6.0 Justification de l'approche expérimentale.....	252
6.1 Modulation de l'activité cardiaque par les tachykinines dans la substance noire chez le rat normotendu.....	254
6.2 Rôle potentiel du récepteur NK <sub>3</sub> de la substance noire dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR.....	256
6.3 Effet anti-hypertenseur des antagonistes sélectifs des récepteurs NK <sub>3</sub> chez le SHR.....	260
6.4 Perspectives.....	264
6.5 Contribution à l'avancement de la recherche sur le rôle pathophysiologique des tachykinines.....	269
BIBLIOGRAPHIE.....	270
ANNEXE 1: Rôle de l'auteur dans les publications.....	330

## Liste des tableaux

### CHAPITRE I

Tableau 1 Tachykinines retrouvées chez les mammifères.....	13
--	----

### CHAPITRE II

Tableau 2-1 Nom et structure des agonistes des tachykinines.....	92
--	----

Tableau 2-2 Nom et structure des antagonistes des tachykinines.....	93
---	----

### CHAPITRE III

Table 1 Densities of specific NK-3 receptor binding sites.....	178
--	-----

### CHAPITRE IV

Table 1 HR values following i.c.v. injection of TK antagonists in SHR.....	215
--	-----

Table 2 Changes in MAP, HR, and plasma levels of vasopressin and catecholamines.....	216
--	-----

## Liste des figures

Figure 1 Expression des gènes PPT-A et PPT-B.....	14
Figure 2 Séquence d'acides aminés des trois récepteurs des tachykinines.....	15
Figure 3 Schéma montrant le voie de signalisation activée par les tachykinines et leurs récepteurs... 17	17
Figure 4 Distribution des fibres neuronales et corps cellulaires marqués à la substance P au niveau de l'hypothalamus du rat.....	24
Figure 5 Distribution des fibres neuronales et corps cellulaires marqués à la substance P au niveau du bulbe rachidien.....	26
Figure 6 Projections neuronales entre divers régions centrales munies d'un rôle reconnu dans le contrôle des fonctions cardiovasculaires.....	28
Figure 7 Sites de liaison des récepteurs (gauche) et des fibres/corps cellulaires de la substance P (droite) dans la substance noire.....	32
Figure 8 Modèle proposé par Takano et collaborateurs (1990) décrivant les mécanismes des effets cardiovasculaires par les tachykinines endogènes du système nerveux central.....	41
Figure 9 Représentation schématique des mécanismes de régulation sympathique ( $\Sigma$ ) et para-sympathique ( $p\Sigma$ ) des baroréflexes.....	51
Figure 10 A) Représentation des principales voies neuronales des ganglions de la base, B) représentation schématique de la voie dopaminergique nigrostriée (A9).....	55
Figure 11 Tachykinines endogènes et leurs récepteurs dans la substance noire.....	59
Figure 12 Principales projections du thalamus-cortex.....	65
Figure 13 Altérations des boucles de rétroaction dans la maladie de Parkinson.....	66
<b>CHAPITRE II</b>	
Figure 1 Identification of the microinjection sites in the substantia nigra.....	126
Figure 2 Maximal changes and time-course effect on HR and MAP by the NK-1 agonist.....	127
Figure 3 Maximal changes and time-course effect on HR and MAP by the NK-2 agonist.....	128
Figure 4 Maximal changes and time-course effect on HR and MAP by the NK-3 agonist.....	129
Figure 5 Bar graph showing maximum behavioural responses to agonists.....	130
Figure 6 Bar graph showing maximum HR responses to agonists in presence of TK antagonists.....	131
Figure 7 Time-course effect on HR responses to agonists in presence of atenolol and atropine.....	132
<b>CHAPITRE III</b>	
Figure 1 Identification of the microinjection sites in the substantia nigra.....	171
Figure 2 Changes on HR by TK agonists in SHR.....	172
Figure 3 Changes on MAP by TK agonists in SHR.....	173
Figure 4 Original traces showing changes in HR and MAP by SN injection of TK agonists in SHR.....	174
Figure 5 Time-course effects on changes in MAP by SN injection of TK antagonists in SHR and WKY.....	175
Figure 6 Total, non-specific and specific binding of [ $^{125}$ I]-HPP-senktide in the SN of SHR.....	176
Figure 7 Autoradiographic distribution of [ $^{125}$ I]-HPP-senktide binding sites in the midbrain of SHR.....	177
<b>CHAPITRE IV</b>	
Figure 1 Changes on MAP following i.c.v. or i.v. injection of TK antagonists in SHR and WKY.....	218
Figure 2 Changes on MAP and HR following i.c.v. or i.v. injection of R-820 in SHR and WKY.....	219
Figure 3 Changes on MAP and HR following i.c.v. injection of SB 222200 in intact and bilaterally nephrectomized SHR.....	220
<b>CHAPITRE V</b>	
Figure 1 Représentation schématique des sites de microinjection dans l'ATV.....	244

Figure 2 Changements maximaux et decours temporel de FC et de PAM suite à l'injection de l'agoniste NK-1 dans l'aire tegmentale ventrale du rat Wistar.....	245
Figure 3 Changements maximaux et decours temporel de FC et de PAM suite à l'injection de l'agoniste NK-1 dans l'aire tegmentale ventrale ou la substance noire du rat Wistar.....	246
Figure 4 Changements maximaux et decours temporel de FC et de PAM suite à l'injection de l'agoniste NK-2 dans l'aire tegmentale ventrale du rat Wistar.....	247
Figure 5 Changements maximaux et decours temporel de FC et de PAM suite à l'injection de l'agoniste NK-2 dans l'aire tegmentale ventrale ou la substance noire du rat Wistar.....	248
Figure 6 Changements maximaux et decours temporel de FC et de PAM suite à l'injection de l'agoniste NK-3 dans l'aire tegmentale ventrale ou la substance noire du rat Wistar.....	249
Figure 7 Effets comportementaux suite à l'injection des agonistes des TK dans l'aire tegmentale ventrale ou la substance noire du rat Wistar.....	250

## Liste des abréviations

<b>4<sup>e</sup></b>	Quatrième ventricule cérébral
<b>A</b>	Noyau ambigu
<b>ACTH</b>	Hormone corticotrope
<b>ANP</b>	Peptide natriurétique des oreillettes
<b>AP</b>	Area postrema
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ATV</b>	Aire tegmentale ventrale
<b>AVP</b>	Arginine-vasopressine
<b>B<sub>MAX</sub></b>	Mesure de la capacité maximale de liaison
<b>CA3</b>	région CA3 de l'hippocampe
<b>CP</b>	Noyaux Caudé et Putamen du striatum
<b>CV</b>	Cardiovasculaire
<b>D<sub>1</sub></b>	Récepteur dopaminergique de type D-1
<b>D<sub>2</sub></b>	Récepteur dopaminergique de type D-2
<b>DA</b>	Dopamine ou dopaminergique
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>ET-1</b>	Endothéline-1
<b>FC</b>	Fréquence cardiaque
<b>GABA</b>	Acide gamma-aminobutyrique
<b>Gi</b>	Noyau réticulé gigantocellulaire
<b>GP</b>	Globus Pallidus
<b>HL</b>	Hypothalamus latéral
<b>HR</b>	Heart rate
<b>i.c.v.</b>	Intracérébroventriculaire
<b>i.m.</b>	intramusculaire
<b>IML</b>	Région intermédiolatérale de la moelle épinière

<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-1,4,5-triphosphate
<b>i.v.</b>	Intraveineux
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de dissociation à l'équilibre
<b>LPGi</b>	Noyau latéral paragigantocellulaire
<b>MAP</b>	Mean arterial pressure
<b>NK<sub>1</sub></b>	Récepteurs des tachykinines de type neurokinine-1
<b>NK<sub>2</sub></b>	Récepteurs des tachykinines de type neurokinine-2
<b>NK<sub>3</sub></b>	Récepteurs des tachykinines de type neurokinine-3
<b>NKA</b>	Neurokinine A
<b>NKB</b>	Neurokinine B
<b>NP<math>\gamma</math></b>	Neuropeptide gamma
<b>NPK</b>	Neuropeptide K
<b>NTS</b>	Noyau du tractus solitaire
<b>PA</b>	Pression artérielle
<b>PAM</b>	Pression artérielle moyenne
<b>PB</b>	Noyau parabrachial
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PO</b>	Cortex piriforme
<b>PPT</b>	Gène préprotachykinine
<b>PV</b>	Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
<b>R.SP</b>	Récepteur à la substance P
<b>SHR</b>	Rats spontanément hypertendus
<b>SNA</b>	Système nerveux autonome
<b>SO</b>	Noyau supraoptique de l'hypothalamus
<b>SP</b>	Substance P
<b>SP5</b>	Noyau du trijumeaux
<b>SN</b>	Substance noire
<b>SNC</b>	Portion compacte de la substance noire

<b>SNR</b>	Portion réticulée de la substance noire
<b>ST</b>	Striatum
<b>Sub Th</b>	Noyau sous-thalamique
<b>Th</b>	Thalamus
<b>TK</b>	Tachykinines
<b>V<sub>1</sub></b>	Récepteurs à l'arginine-vasopressine de type V <sub>1</sub>
<b>V<sub>2</sub></b>	Récepteurs à l'arginine-vasopressine de type V <sub>2</sub>
<b>WKY</b>	Rats de souche Wistar-Kyoto

# CHAPITRE I

## INTRODUCTION

*Certains auteurs, parlant de leurs ouvrages, disent :  
«Mon livre, mon commentaire, mon histoire, etc.» ...Ils  
feraient mieux de dire : «Notre livre, notre  
commentaire, notre histoire, etc.,» vu que d'ordinaire il  
y a plus en cela du bien d'autrui que du leur.*

*Blaise Pascal, Pensées et Opuscules (43)*

## **1.0 Avant-propos**

### **1.0.1 L'étude de l'hypertension artérielle : Défier la complexité**

Selon les statistiques récentes (2001) énoncées par la Fondation des Maladies du Cœur du Canada, les maladies cardiovasculaires occupent le premier rang des causes de mortalité et de morbidité chez les Canadiens et Canadiennes. Bien que le nombre exact de victimes reste inconnu, on estime qu'un Canadien sur quatre présente une forme de maladie cardiaque ou des vaisseaux sanguins, ce qui représente environ huit millions de citoyens. Ces maladies affectent grandement la qualité de vie des individus ainsi que les coûts reliés aux soins de santé. Selon une étude menée en 1994 par la Fondation, les maladies cardiovasculaires coûtent plus de 18 milliards de dollars par année au Canada.

L'hypertension artérielle est un facteur de risque qui peut faire doubler ou même tripler les chances de développer une maladie cardiovasculaire. On estime qu'un Canadien(ne) sur cinq souffre d'hypertension artérielle. Mais de façon alarmante, l'hypertension artérielle ne cause aucun symptôme apparent; elle se développe chez l'individu sans avertissement. Ainsi, près de la moitié des gens qui en sont affectés l'ignorent. L'hypertension artérielle mérite grandement son appellation de tueur silencieux. Présentement, plusieurs approches pharmacologiques contribuent à corriger l'hypertension artérielle. On peut regrouper les agents anti-hypertenseurs en cinq grandes classes: les diurétiques, les bêta-bloquants, les antagonistes des canaux calciques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 et les antagonistes des

récepteurs AT<sub>1</sub> de l'angiotensine II (Plante, 2000). Bien que ces agents corrigent de façon adéquate l'hypertension artérielle, aucun traitement n'a permis, jusqu'à présent, de guérir cette affection. La cause principale de cet échec réside dans l'incapacité d'identifier avec précision l'étiologie de l'anomalie qui varie selon les individus et qui est très souvent d'origine génétique. Chez 95% des sujets atteints d'hypertension artérielle, on ne connaît pas la cause principale de l'anomalie que l'on nomme hypertension essentielle (Vander *et al.*, 1995).

Depuis peu, les chercheurs ont réalisé l'importance de l'endothélium vasculaire en physiologie et pathologie cardiovasculaires. Il s'en est suivi une vague de recherche sur ce tissu méconnu et sur son rôle potentiel dans l'hypertension artérielle. Cette vague persiste car les vaisseaux sanguins continuent d'en étonner plus d'un par leurs complexité. On a entre autres découvert l'influence bénéfique des anti-oxydants comme agents de prévention contre l'hypertension artérielle (Girouard *et al.*, 2003). Malgré ces étonnantes percées en recherche fondamentale, on a délaissé le rôle du système nerveux central dans l'étude des mécanismes de l'hypertension artérielle. En effet, le seul agent anti-hypertenseur agissant sur le système nerveux central, la clonidine, n'est guère utilisé maintenant puisqu'il produit beaucoup trop d'effets secondaires et que son arrêt soudain peut s'avérer très dangereux.

Bref, par son origine hautement multifactorielle, l'hypertension artérielle se révèle un défi colossal pour la recherche fondamentale puisqu'elle fait intervenir les systèmes rénaux, vasculaire, cardiaque, nerveux et endocrinien. L'étude des mécanismes de l'hypertension artérielle a de quoi donner le vertige à n'importe quel étudiant qui tente

d'en dévoiler même une infime portion! Dans cette thèse, les efforts seront axés sur les mécanismes supraspinaux potentiellement impliqués dans la régulation de la fonction cardiovasculaire et dans le maintien de l'hypertension artérielle. Le rôle des tachykinines et de leurs récepteurs au niveau de la substance noire sera plus particulièrement analysé. Pourquoi choisir ce noyau perdu au milieu de cet univers encéphalique? Puisqu'il se situe au centre d'une voie neuronale dopaminergique ayant possiblement un rôle cardiovasculaire. Une lésion chimique de la voie dopaminergique nigrostriée atténue le développement de l'hypertension artérielle chez de jeunes rats spontanément hypertendus (van den Buuse *et al.*, 1991; Linthorst *et al.*, 1994). De plus, des rapports cliniques montrent la présence d'une hypotension orthostatique et post-prandiale chez certains patients atteints de la maladie de Parkinson. Cette maladie est associée à une dégénérescence de la voie dopaminergique nigrostriée (Barbeau *et al.*, 1969; Micieli *et al.*, 1987). D'autre part, les tachykinines modulent l'activité de la voie dopaminergique nigrostriée via l'activation des récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> (Reid *et al.*, 1990; Humpel *et al.*, 1991, 1993; Bannon *et al.*, 1995b; Marco *et al.*, 1998). À ce jour, aucune étude n'a permis de déterminer l'influence des tachykinines de la substance noire dans la régulation des fonctions cardiovasculaires. Les études fonctionnelles sur ce circuit neuronal ont longtemps été limitées au système moteur; son influence cardiovasculaire demeure largement sous-estimée. À l'heure actuelle, on ignore presque tout des liens anatomiques reliant potentiellement la substance noire au réseau central autonome de l'hypothalamus et du bulbe rachidien.

## 1.0.2 Le système nerveux autonome : Une rôle stratégique dans l'hypertension artérielle

Le système nerveux autonome (SNA) est une composante du système nerveux périphérique dont la fonction principale consiste à contrôler l'activité interne des systèmes viscéromoteurs et neuroendocriniens qui sont essentiels à la survie de l'individu (Benarroch, 1993). De par sa position neuroanatomique, le SNA assure une régulation rapide et sensible de la pression artérielle et des baroréflexes. Des études s'entendent pour accorder au SNA un rôle majeur dans le contrôle des fonctions cardiaques et de la résistance périphérique (de Champlain, 1998). De nombreuses évidences cliniques et expérimentales démontrent une activité sympathique accrue chez les patients atteints d'hypertension artérielle ainsi que dans plusieurs modèles d'hypertension expérimentale (Julius, 1988; de Champlain, 1998; Laflamme & de Champlain, 1998; Grassi *et al.*, 1998). De plus, une diminution du tonus parasympathique a été observée dans plusieurs cas d'hypertension clinique et expérimentale (Korner, 1989).

D'autre part, le SNA est contrôlé par un réseau autonome central incluant des noyaux du diencephale (noyaux de l'hypothalamus), du télencéphale (amygdale), du mésencéphale (région périacqueductale grise) et du tronc cérébral (noyau du tractus solitaire, noyau ambigu, noyau moteur dorsal du nerf vague, medulla ventrolatérale rostrale et dorsale). Ces régions du système nerveux central contrôlent les fibres pré-ganglionnaires sympathiques et les voies efférentes parasympathiques viscéromotrices (Benarroch, 1993). Cette organisation fort complexe assure un contrôle précis et constant des fonctions cardiovasculaires en situations physiologiques normales (station debout, exercice intense) et pathologiques. Une meilleure compréhension de ces mécanismes

neuro-humoraux, à l'échelle des neuropeptides et de leurs récepteurs, pourrait conduire à l'identification de mécanismes potentiellement impliqués dans le développement et le maintien de certains désordres cardiovasculaires telle que l'hypertension artérielle.

### **1.0.3 Les tachykinines et leurs récepteurs : régulation centrale de la fonction cardiovasculaire et hypertension artérielle**

La transmission des informations dans le réseau central autonome s'effectue par l'intermédiaire de nombreux neurotransmetteurs et neuromodulateurs. Parmi ceux-ci, les tachykinines occupent une place privilégiée. En effet, ces neuropeptides et leurs récepteurs sont localisés dans plusieurs noyaux centraux ayant un rôle important dans la régulation cardiovasculaire. Par exemple, une concentration élevée de tachykinines est retrouvée dans l'hypothalamus (dont les noyaux paraventriculaire, ventromédial, antérieur et latéral) et dans le bulbe rachidien (incluant le noyau du tractus solitaire et le noyau dorsal moteur du nerf vague) (Otsuka & Yoshioka, 1993).

Depuis plusieurs années, les tachykinines du système nerveux central ont été associées à la réaction cardiovasculaire de défense ou de stress intégré (Culman & Unger, 1995). Ainsi, une administration intracérébroventriculaire (i.c.v.) ou intra-hypothalamique d'un agoniste des tachykinines, la substance P, provoque une augmentation de pression artérielle et de fréquence cardiaque chez le rat éveillé et non immobilisé. Ces effets sont accompagnés d'une constriction des lits vasculaires rénaux et mésentériques, ainsi que d'une dilatation des lits vasculaires des muscles squelettiques des membres inférieurs (Unger *et al.*, 1988; Culman & Unger, 1995). Une réaction comportementale d'exploration et de locomotion (incluant des secousses corporelles, le toilettage des pattes arrières et le

grattage de la tête) a également été rapportée suite à ces injections chez le rat (Unger *et al.*, 1988; Culman & Unger, 1995). Il est généralement accepté que les tachykinines sont des neuropeptides non libérés de façon tonique dans le cerveau; ils seraient plutôt libérés dans des conditions de stress ou d'inflammation neurogénique (Otsuka & Yoshioka, 1993). Par exemple, lors d'une inflammation, la substance P est libérée par les fibres sensorielles de type C pour activer des médiateurs pro-inflammatoires tels l'histamine, les lymphocytes et les cytokines qui vont ainsi déclencher les processus inflammatoires d'œdème, d'extravasation des protéines et de vasodilatation des vaisseaux locaux (Otsuka & Yoshioka, 1993). Or, un lien a déjà été proposé entre les processus inflammatoires et l'hypertension artérielle. En effet, plusieurs mécanismes pro-inflammatoires conduisent à l'hypertension artérielle: le développement du stress oxydatif vasculaire qui augmente l'expression du facteur nucléaire Kappa-B (NF-kappaB), un facteur de transcription responsable de l'expression de cytokines telle que l'interleukine-6 (IL-6), contribue au développement de l'hypertension artérielle (Phillips & Kagiya, 2002). Il a été suggéré que ces substances inflammatoires (cytokines) puissent représenter de bons marqueurs plasmatiques chez les patients souffrant d'hypertension artérielle (Filippatos & Kardaras, 2002; Parissis *et al.*, 2002).

D'autre part, un lien a été établi entre l'hypertension artérielle et le stress où l'instauration d'un stress émotionnel prolongé chez le rat cause une hypertension artérielle (Wu *et al.*, 1999). Puisque le stress provoque la libération des tachykinines endogènes, celles-ci pourraient donc contribuer à l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique dans l'hypertension artérielle. En effet, l'injection i.c.v. de substance P chez

le rat provoque une augmentation des taux plasmatiques des catécholamines (Unger *et al.*, 1981, 1985).

Bien que l'importance des tachykinines dans les mécanismes centraux de régulation cardiovasculaire soit bien admise, très peu d'études se sont intéressées à une relation entre les tachykinines et l'hypertension artérielle. On a cependant montré une hypersensibilité dans la réponse pressive de la substance P injectée i.c.v. chez le rat spontanément hypertendu (SHR) (Unger *et al.*, 1980). Aussi, des augmentations significatives de tachykinines endogènes (tels la substance P et la neurokinine B) dans l'hypothalamus, la médulla rostrale ventrale et la région intermédiolatérale de la moelle épinière ont été mesurées chez le SHR comparativement à son témoin WKY (Nagashima *et al.*, 1989b; Chen *et al.*, 1990). Des concentrations élevées de norépinephrine ont aussi été mesurées dans le liquide cébrospinal de patients atteints d'hypertension essentielle (Eide *et al.*, 1979; DeQuattro *et al.*, 1984). On suggère ainsi qu'il existe une activité accrue des voies noradrénergiques centrales chez les patients atteints d'hypertension artérielle (DeQuattro *et al.*, 1984). Or, toutes les projections centrales catécholaminergiques (A1-A15) sont entourées de terminaisons nerveuses marquées à la substance P (Ljungdahl *et al.*, 1978) et les tachykinines provoquent généralement leur activation. Bien que spéculatif, une interaction dysfonctionnelle entre la transmission neuronale noradrénergique et tachykininergique demeure possible dans le cerveau des sujets souffrant d'hypertension artérielle.

En périphérie, on suggère un rôle pour les tachykinines dans des modèles d'hypertension artérielle sensibles au sel où la substance P (un vasodilatateur) pourrait

agir comme un contre-régulateur partiel dans les systèmes de vasoconstriction (Kohlmann *et al.*, 1997). De plus, les taux plasmatiques de la substance P sont diminués chez les patients atteints d'hypertension essentielle comparativement aux témoins normotendus (Faulhaber *et al.*, 1987). Récemment, des taux plasmatiques élevés de neurokinine B ont été observés dans des conditions de pré-éclampsie chez la femme et la rate. Cette même étude démontre qu'une infusion de neurokinine B chez les rates en gestation augmente significativement la pression artérielle (Page *et al.*, 2000). Il est généralement accepté que la neurokinine B et son récepteur préférentiel, NK<sub>3</sub>, sont localisés en grande majorité dans le système nerveux central (Saffroy *et al.*, 1988; Dam *et al.*, 1990; Stoessl & Hill, 1990; Bannon *et al.*, 1992). Présentement, on ne peut exclure la possibilité que cet effet hypertenseur de la neurokinine B, en situation de pré-éclampsie, soit relayé par les récepteurs NK<sub>3</sub> du cerveau.

Le but général de cette thèse est donc de déterminer l'influence des tachykinines du système nerveux central, en particulier au niveau de la substance noire, dans l'hypertension expérimentale. Il est possible que ces travaux puissent initier l'émergence de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de l'hypertension artérielle.

## 1.1 Introduction

### 1.1.1 Historique des tachykinines

La grande aventure des tachykinines débuta en 1931 lorsque von Euler et Gaddum isolèrent une mystérieuse poudre provenant du cerveau et de l'intestin de cheval. Les scientifiques y ont alors découvert un nouveau principe actif possédant un pouvoir hypotenseur surprenant ainsi qu'une forte activité contractile sur le muscle lisse intestinal. Néanmoins, il a fallu attendre quarante ans avant que sa structure et sa séquence soient connues (Chang *et al.*, 1971). En 1966, Erspamer et Anastasi ont baptisé divers homologues de la substance P sous le nom "tachykinines" (*tachy* pour rapide et *kinin* pour mouvement) puisque leur activité contractile s'avérait plus rapide que celle de la bradykinine sur le muscle lisse de l'intestin. Par la suite, d'autres tachykinines ont été identifiées à partir de leur séquence commune d'acides aminés à l'extrémité C-terminale (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>). On compte aujourd'hui 5 membres actifs dans cette famille de neuropeptides chez les mammifères: la substance P, la neurokinine A, la neurokinine B, le neuropeptide K et le neuropeptide  $\gamma$  (Tableau 1). Ces deux derniers sont des homologues de la neurokinine A constitués de 36 et 21 résidus d'acide aminés respectivement (Regoli *et al.*, 1994).

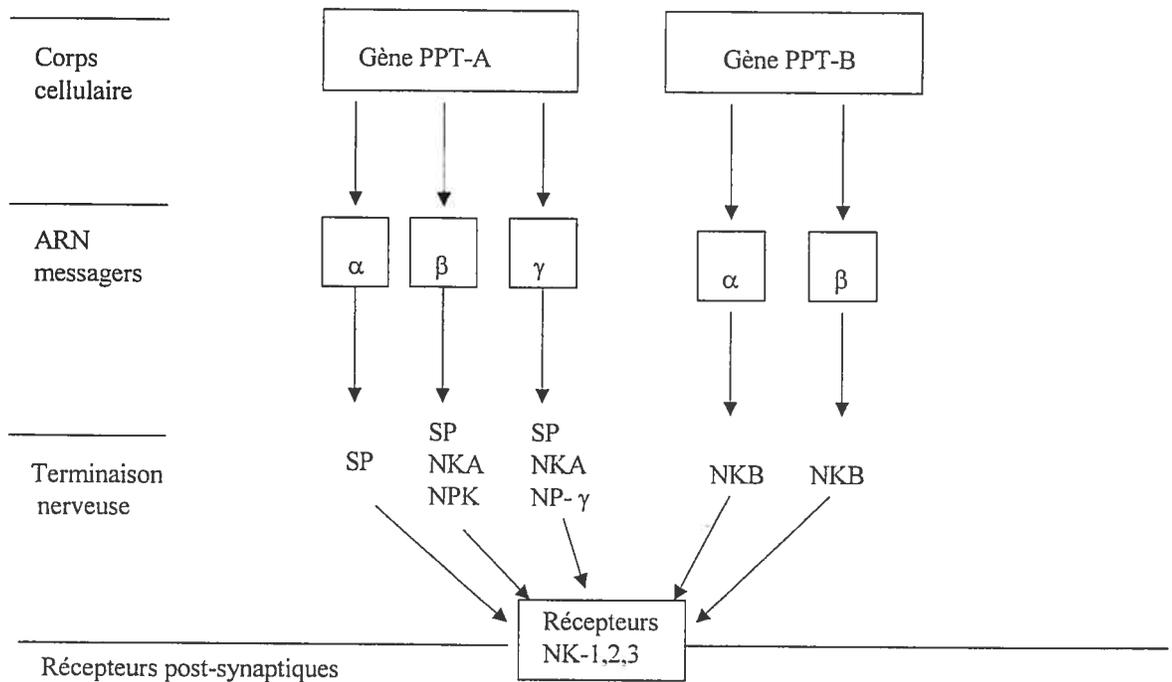
### 1.1.2 Biosynthèse et activité biologique des tachykinines

Les tachykinines sont issues de deux gènes. Le gène préprotachykinine-A est transcrit en trois ARNmessagers par épissage alternatif:  $\alpha$ -,  $\beta$ -, et  $\gamma$ -PPT pour la synthèse de : 1) la substance P, 2) la substance P, la neurokinine A et un homologue (neuropeptide K) et 3) la substance P, la neurokinine A et l'autre homologue (neuropeptide  $\gamma$ ) respectivement. Ces mécanismes ont été décrits pour la première fois par Nawa et ses collaborateurs en 1983 et 1984. Le gène préprotachykinine-B est responsable de la synthèse de la neurokinine B (Maggio, 1988; Krause *et al.*, 1989; Guard & Watson, 1991; Regoli *et al.*, 1994). Ces tachykinines produisent leur activité en se liant à trois récepteurs, membres de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. Les trois récepteurs des tachykinines comportent une très grande homologie entre eux (de 53.7 à 66.3%) autant au niveau des sept domaines transmembranaires que des régions cytoplasmiques ou intracellulaires (Shigemoto *et al.*, 1990) (Figure 2). En 1982, Lee et collaborateurs furent les premiers à suggérer l'existence de plusieurs types de récepteurs pour les tachykinines. Selon la nomenclature établie lors du Symposium de Montréal sur la substance P (1986), les récepteurs ont été nommés neurokinine-1 (NK<sub>1</sub>), neurokinine-2 (NK<sub>2</sub>) et neurokinine-3 (NK<sub>3</sub>). Lors de ce même événement international, il a été suggéré de remplacer le mot "tachykinines" par "neurokinines" puisque ces neuropeptides sont retrouvés en majeure partie au niveau du système nerveux central et périphérique. Jusqu'à ce jour, les deux appellations ont été utilisées.

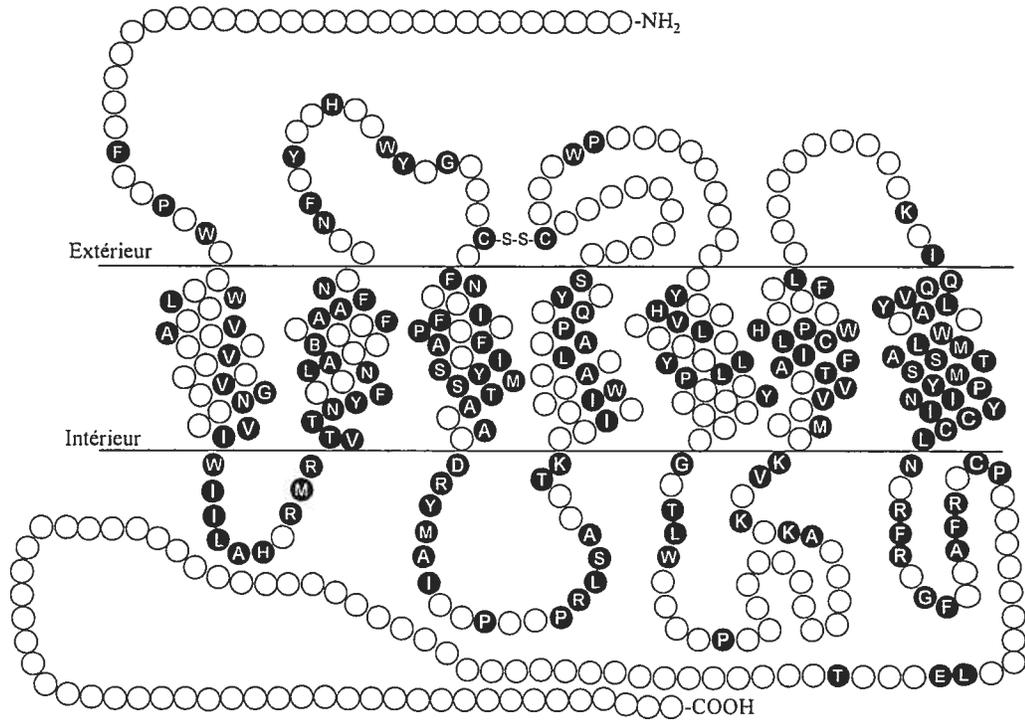
**Tableau 1** Structure des tachykinines retrouvées chez les mammifères

Nom	Séquence	Références
Substance P	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln- <b>Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub></b>	Von Euler & Gaddum, 1931  Chang & Leeman, 1970
Neurokinine A	His-Lys-Thr-Asp-Ser- <b>Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub></b>	Kimura et al., 1983
Neurokinine B	Asp-Met-His-Asp-Phe- <b>Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub></b>	Kimura et al., 1983  Kangawa et al., 1983
Neuropeptide K	Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Lys-Ala-Leu-Tyr-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser- <b>Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub></b>	Tatemoto et al., 1985
Neuropeptide $\gamma$	Asp-Ala-Gly-His-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser- <b>Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub></b>	Kage et al., 1988

N.B. La séquence C-terminale amidée commune à toutes les tachykinines est présentée en noir

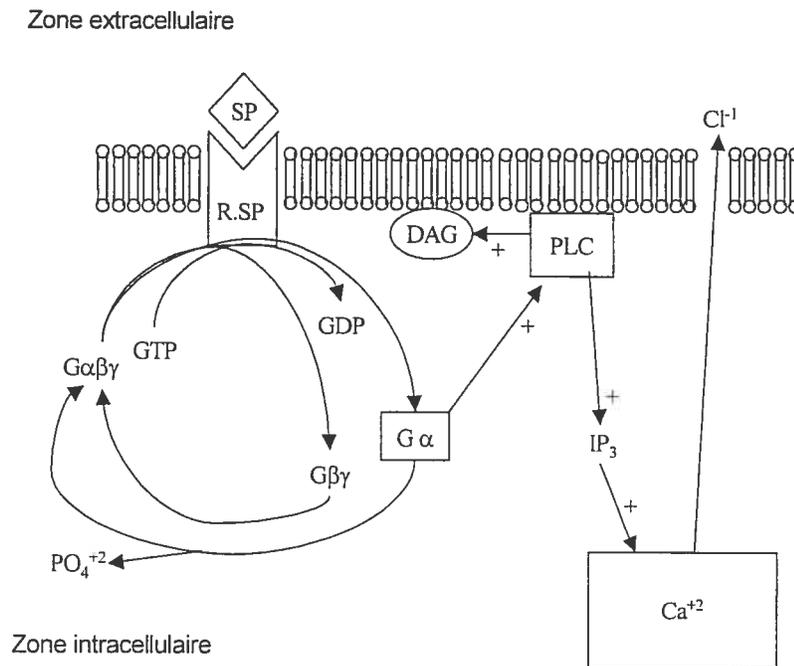


**Figure 1** Représentation schématique de l'expression des gènes PPT-A et PPT-B et de leurs ARN messagers. Figure tirée de l'ouvrage de Guard & Watson, *Neurochem. Int.* 18(2) : 149-165, 1991.



**Figure 2** Représentation schématique du récepteur NK<sub>1</sub> des tachykinines. Les cercles noirs représentent les acides aminés identiques aux trois récepteurs. Schéma tiré de l'ouvrage de Nakanishi, *Ann. Rev. Neurosci.* 14 : 123-36, 1991.

La protéine G la plus communément associée aux récepteurs des tachykinines est du type Gq. La voie de signalisation communément observée suite à l'activation des trois récepteurs des tachykinines mène à l'activation de la phospholipase C (Abdel-Latif *et al.*, 1986; Sugiya *et al.*, 1988) puis à la formation du diacylglycérol et de l'inositol-1,4,5-triphosphate. (Hanley *et al.*, 1980a; Weiss *et al.*, 1982; Abdel-Latif *et al.*, 1986; Krause *et al.*, 1989). Il s'en suit une augmentation intracellulaire de calcium (Putney, 1977; Abdel-Latif *et al.*, 1986; Nakanishi, 1991), l'activation d'une protéine kinase C et une dépolarisation membranaire par ouverture des canaux chlore sensibles au calcium (Nishizuka, 1984; Berridge & Irvine, 1989; Hershey *et al.*, 1991) (Figure 3). Les tachykinines sont synthétisées dans le corps cellulaire du neurone par les ribosomes, transportées dans l'axone jusqu'à la terminaison nerveuse où elles sont transformées sous leur forme finale par des enzymes et emmagasinées dans de grosses vésicules (100-150 nm) pour être libérées dans la fente synaptique (Maggio, 1988; Peters *et al.*, 1991; Mussap *et al.*, 1993). Elles se retrouvent souvent en co-localisation avec d'autres neurotransmetteurs classiques tels que le GABA et la sérotonine (Pelletier *et al.*, 1981; Lovick & Hunt, 1983) dans le noyau du raphé chez le rat et le chat ainsi qu'avec certains peptides opiacés, dont la dynorphine chez le rat (Bannon *et al.*, 1995b). Les tachykinines sont dégradées par certains enzymes dont les enképhalinases, l'acétylcholinestérase, les endopeptidases et les aminopeptidases (Mauborgne *et al.*, 1987; Oblin *et al.*, 1988; Otsuka & Yoshioka, 1993; Regoli *et al.*, 1994). Les tachykinines endogènes possèdent une très faible sélectivité pour chacun des trois récepteurs. Cependant, la SP se lie préférentiellement aux récepteurs NK<sub>1</sub>, la NKA aux récepteurs NK<sub>2</sub> et la NKB aux récepteurs NK<sub>3</sub> (Guard & Watson, 1991).



**Figure 3** Représentation schématique illustrant la voie de signalisation activée par les tachykinines et leurs récepteurs. L'activation du récepteur découple la portion  $\alpha$  ( $G \alpha$ ) des portions  $\beta\gamma$  ( $G \beta\gamma$ ) de la protéine G. Ceci provoque l'activation de la phospholipase C (PLC), produisant ainsi l'hydrolyse des phosphatidylinositols conduisant à la formation du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). Ce mécanisme libère le calcium emmagasiné dans le réticulum endoplasmique. L'augmentation intracellulaire de calcium provoque l'ouverture des canaux chlore sensibles au calcium. SP, substance P ; R.SP, récepteur à la substance P. Schéma tiré de Hershey et al., Ann.N.Y. Acad. Sci. USA 632 : 63-78, 1991.

### 1.1.3 Agonistes et antagonistes sélectifs aux récepteurs des tachykinines

Puisque les tachykinines endogènes présentent peu de sélectivité, l'étude fonctionnelle des récepteurs fut d'abord très difficile. Il a fallu développer des agonistes et des antagonistes sélectifs avant de se prononcer sur la fonction respective de chaque récepteur.

#### 1.1.3.1 Les agonistes

Pour activer le récepteur NK<sub>1</sub>, quelques agonistes se sont montrés sélectifs et puissants : le septide ([pGlu<sup>6</sup>,Pro<sup>9</sup>]SP(6-11)) (Laufer *et al.*, 1986) et le [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (Drapeau *et al.*, 1987). Or, contrairement à ce dernier agoniste, l'utilisation du septide a suscité bien des controverses. En effet, le septide montre un profil pharmacologique très différent du [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP. Par exemple, plusieurs études de liaison ont montré que le septide ne réussit pas à inhiber la liaison des radioligands [Pro<sup>9</sup>]Substance P et [<sup>3</sup>H]-[Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (Chassaing *et al.*, 1992; Petitet *et al.*, 1992; Maggi *et al.*, 1993; Palma *et al.*, 1994; Maggi, 1995; Torrens *et al.*, 1995). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène : l'existence de deux sites de liaison sur le récepteur NK<sub>1</sub>, l'existence de deux ou plusieurs sous-types de récepteurs NK<sub>1</sub> ou l'existence de deux conformations différentes du même récepteur. L'existence d'un site de liaison spécifique pour le septide reste toujours à déterminer. Par conséquent, le [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP demeure un agoniste "classique" et un choix plus prudent dans le cas d'études physiologiques chez le rat. D'autre part, le meilleur agoniste pour le récepteur NK<sub>2</sub> est le [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10)

puisque'il montre une sélectivité 100 et 500 fois plus grande pour le récepteur NK<sub>2</sub> par rapport aux récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub>, respectivement (Regoli *et al.*, 1994). L'agoniste le plus sélectif pour le récepteur NK<sub>3</sub> est le senktide (Mussap *et al.*, 1993). Bref, ces agonistes sélectifs aux récepteurs NK<sub>1</sub> ([Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP), NK<sub>2</sub> ([β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10)) et NK<sub>3</sub> (senktide) des tachykinines représentent actuellement les molécules les plus adéquates pour étudier le rôle des récepteurs des tachykinines en physiologie et pathologie cardiovasculaires.

### 1.1.3.2 Les antagonistes

Les premières études fonctionnelles utilisant des antagonistes de nature peptidique ont été effectuées dans les années quatre-vingts et au début des années quatre-vingt-dix mais non sans divergence. Par exemple, l'antagoniste du récepteur NK<sub>1</sub> des tachykinines, le [D-Pro<sup>2</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>]SP (Rosell *et al.*, 1981), en plus de posséder des effets neurotoxiques (Regoli *et al.*, 1994), bloque les augmentations de pression artérielle mais non les tachycardies provoquées par l'injection intra-cisternale de substance P (Fuxe *et al.*, 1982). D'autre part, l'antagoniste sélectif du récepteur NK<sub>1</sub> (L-668,169) ne peut inhiber les effets centraux de la substance P alors qu'il bloque très bien ceux de la neurokinine A! De la même façon, l'antagoniste sélectif du récepteur NK<sub>2</sub> des tachykinines (L-659,877) inhibe les effets de la substance P sans affecter ceux de la neurokinine A (Itoi *et al.*, 1992). On a expliqué ces divergences par l'existence potentielle de sous-classes de récepteurs au niveau central puisque ces antagonistes bloquent l'effet de leurs agonistes respectifs en périphérie (McKnight *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988).

Le développement d'antagonistes non peptidiques a apporté une contribution importante aux études fonctionnelles en permettant de clarifier les effets contradictoires. Ces molécules possèdent plusieurs avantages par rapport aux peptides: elles ont une plus grande puissance et sélectivité, provoquent moins d'effets secondaires ou neurotoxiques, une plus grande stabilité métabolique, une meilleure distribution dans les tissus et traversent plus facilement la barrière hémato-encéphalique grâce à leur liposolubilité et leur faible poids moléculaire.

Le premier antagoniste non peptidique du récepteur NK<sub>1</sub>, le CP96,345 de Pfizer (McLean *et al.*, 1991; Snider *et al.*, 1991a, 1991b), bloque de manière efficace les effets des agonistes du récepteur NK<sub>1</sub> (substance P, GR736232) injectés i.c.v. sans affecter ceux de la neurokinine A et de l'agoniste sélectif du récepteur NK<sub>3</sub> (senktide) des tachykinines chez le rat éveillé (Tschope *et al.*, 1992; Culman *et al.*, 1993b) ou anesthésié (Takano *et al.*, 1992; Saigo *et al.*, 1993). Sur des tissus de cerveau de cobaye, le CP96,345 démontre une bonne affinité pour le récepteur NK<sub>1</sub> mais possède une faible affinité pour les récepteurs NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> (McLean *et al.*, 1991; Snider *et al.*, 1991a, 1991b). On a cependant délaissé cet antagoniste à cause de ses effets non sélectifs sur les canaux calciques de type L (Schmidt *et al.*, 1992; Guard *et al.*, 1993) et les canaux sodiques voltage-dépendant (Caeser *et al.*, 1993).

Heureusement, un nouvel antagoniste non peptidique pour le récepteur NK<sub>1</sub> a fait son apparition peu de temps après; il s'agit du RP 67580 de Rhone Poulenc (Garret *et al.*, 1991). Durant cette même période, un antagoniste non peptidique et sélectif pour le récepteur NK<sub>2</sub> des tachykinines, le SR 48968 de Sanofi (Advenier *et al.*, 1992), a aussi fait son entrée en recherche tandis que la première génération d'antagonistes semi-peptidiques

du récepteur NK<sub>3</sub> des tachykinines a été synthétisée (R 486, R 487) (Regoli *et al.*, 1991). Le RP 67580 et le SR 48968 exercent une inhibition spécifique, compétitive, réversible et sans effets neurotoxiques (Picard *et al.*, 1994; Culman & Unger, 1995; Cellier *et al.*, 1997; Yuan & Couture, 1997). Parmi plusieurs des antagonistes du récepteur NK<sub>1</sub>, le RP 67580 s'avère un meilleur choix que les antagonistes LY 303870, LY 306740, LY 303241 (composés de Eli Lilly) et SR 140333 (composé de Sanofi) pour les études *in vivo* chez le rat (Cellier *et al.*, 1999). De son côté, le SR 48968 demeure l'antagoniste le plus puissant et sélectif pour le récepteur NK<sub>2</sub> (Regoli *et al.*, 1994). Cependant, le choix du meilleur antagoniste NK<sub>3</sub> s'avère une tâche plus ardue. En effet, bien que le R-486 et le R-487 bloquent efficacement les récepteurs NK<sub>3</sub>, ils agissent comme agonistes des récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> et présentent une faible stabilité métabolique (Drapeau *et al.*, 1990). Bien qu'un autre antagoniste non peptidique ait été synthétisé depuis ce temps (le SR 142801, Emonds-Alt *et al.*, 1995), il faut croire qu'il ne présente pas un choix judicieux aux études chez le rat puisque, contrairement aux résultats obtenus chez le cobaye et l'humain, il agit comme un agoniste sur les récepteurs NK<sub>3</sub> du rat au niveau central (Cellier *et al.*, 1997; Couture *et al.*, 2000). Ceci confirme l'existence de sous-types inter-espèces de récepteurs NK<sub>3</sub>. Bref, le R-820 semble être un bon choix chez le rat puisqu'il bloque les effets cardiovasculaires, anti-diurétiques et anti-natriurétiques suite à l'injection i.c.v. d'agonistes sélectifs du récepteur NK<sub>3</sub> (senktide et [MePhe<sup>7</sup>]NKB) chez le rat éveillé (Cellier *et al.*, 1997; Yuan & Couture, 1997). Récemment, un nouvel antagoniste non peptidique et sélectif du récepteur NK<sub>3</sub> a été synthétisé. Il s'agit du SB 222200 (composé de SmithKline Beecham) (Sarau *et al.*, 2000). Cet antagoniste s'est montré fort puissant chez le rat et la souris en plus de traverser très aisément la barrière hémato-encéphalique. Pour une revue complète de la pharmacologie des tachykinines et de leurs récepteurs, le

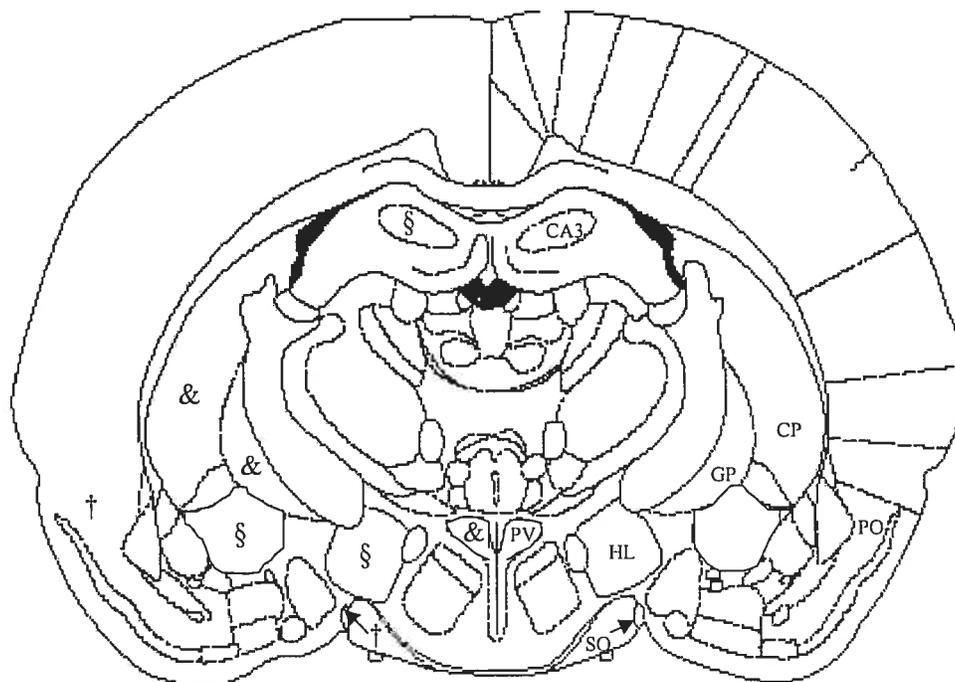
lecteur est invité à prendre connaissance de l'article de revue du Dr. Regoli et collaborateurs (1994) ou d'autres ouvrages récents sur les antagonistes des tachykinines (Swain, 1998; Leroy *et al.*, 2000).

#### **1.1.4 Distribution des tachykinines et de leurs récepteurs dans le système nerveux central**

##### **1.1.4.1 La substance P**

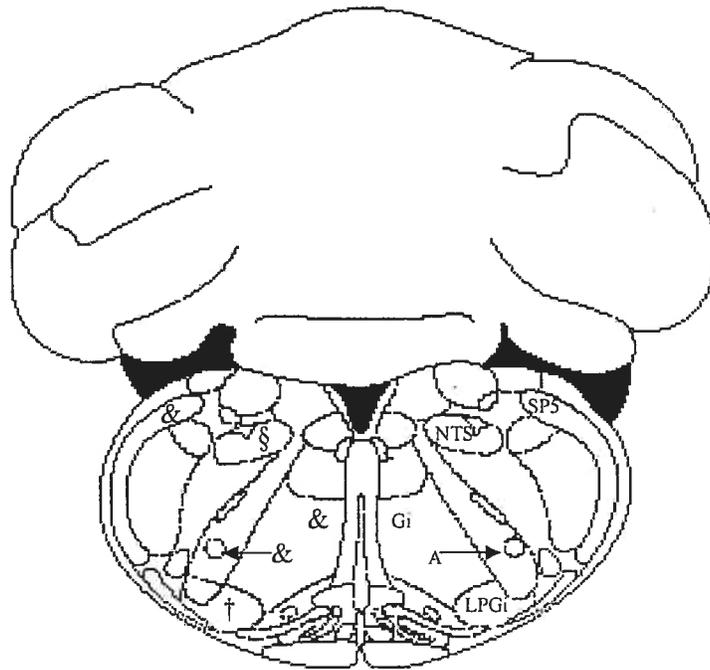
Le membre le plus étudié parmi les tachykinines est certes et sans contredit la substance P. Les nombreux articles de revue sur ce neuropeptide en témoignent (Lembeck & Zetler, 1962; Nicoll *et al.*, 1980; Jessel, 1983; Pernow, 1983; Aronin *et al.*, 1983; Bartho & Holzer, 1985; Jordan & Oeme, 1985; Maggio, 1988; Otsuka & Yoshioka, 1993; Regoli *et al.*, 1994). Bien que celle-ci fut isolée du cerveau de cheval en 1931, ce n'est que dans les années cinquante que sa distribution a été étudiée de façon plus détaillée. La présence de substance P dans le cerveau de chien (Pernow, 1953), de vache (Zetler & Schlosser, 1953; Kopera & Lazarini, 1953) et d'humain (Zetler & Schlosser, 1954) a été suggérée. D'autre part, Amin et collaborateurs (1954) ont identifié des tissus possédant la substance P au niveau du télencéphale (cervelet, corps calleux, noyau caudé, hippocampe), du diencephale (hypothalamus, thalamus), du mésencéphale et du bulbe rachidien chez le chien. Cependant, il fut impossible d'exclure la possibilité que ces extraits puissent également contenir de l'histamine, de l'acétylcholine, de l'épinéphrine et de la norépinéphrine.

Le premier article de revue sur la substance P a été publié en 1962 (Lembeck & Zetler, 1962). Une concentration élevée de substance P, mesurée par chromatographie sur papier, a été rapportée chez plusieurs espèces de mammifères dont l'humain, le chien, le chat, le lapin, le cobaye, le rat, la souris, le canard et le poulet. Ces observations ont été confirmées par des études immunohistochimiques (Powell *et al.*, 1973; Cuello & Kanazawa, 1978; Hökfelt *et al.*, 1978; Gillis *et al.*, 1980). En 1980, Hanley *et coll.* ont été les premiers à montrer la distribution des sites de liaison du [<sup>3</sup>H]substance P dans le cerveau de rat par autoradiographie (Hanley *et al.*, 1980b). Leurs travaux ont subséquemment été confirmés par d'autres (Quirion *et al.*, 1983). Ainsi, la substance P a été identifiée dans des régions du cerveau impliquées dans le contrôle des fonctions cardiovasculaires tels que l'hypothalamus et le bulbe rachidien (Powell *et al.*, 1973; Cuello & Kanazawa, 1978; Hökfelt *et al.*, 1978; Gillis *et al.*, 1980). Plus précisément, des corps cellulaires marqués à la substance P ont été identifiés par immunocytochimie dans les noyaux prémammillaires, dorsomédiaux et ventromédiaux de l'hypothalamus. Un marquage plus faible a été observé au niveau du noyau latéral préoptique (Hökfelt *et al.*, 1978). On mentionne également que presque tous les noyaux hypothalamiques reçoivent des projections contenant de la substance P. La plus grande concentration de substance P immunoréactive au niveau des nerfs terminaux hypothalamiques se situe dans le noyau médial préoptique mais on en retrouve aussi dans les noyaux suivants : la région périventriculaire, les noyaux dorsomédiaux, latéraux, arqué, la portion ventrolatérale du noyau ventromédial et le noyau antérieur (Figure 4) (Hökfelt *et al.*, 1978; Ljungdahl *et al.*, 1978a, 1978b).



**Figure 4** Distribution des fibres neuronales et corps cellulaires marqués à la substance P au niveau de l'hypothalamus du rat (-1.8 mm par rapport au point Bregma). Échelle de densité : &, élevée ; §, modérée ; †, faible. CA3, région CA3 de l'hippocampe; CP, noyaux caudé et putamen du striatum; GP, globus pallidus; HL, hypothalamus latéral; PV, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus; PO, cortex piriforme; SO, noyau supraoptique de l'hypothalamus. Résultats tirés de l'ouvrage de Shults *et al.*, *Peptides* 5(6) : 1097-1128, 1984.

Au niveau du bulbe rachidien, des études immunohistochimiques, d'immunofluorescence et d'autoradiographie ont montré un marquage élevé de substance P dans les terminaisons nerveuses et les corps cellulaires du noyau du tractus solitaire (NTS) du rat et du chat (Cuello & Kanazawa, 1978; Ljungdahl *et al.*, 1978a; Gillis *et al.*, 1980; Helke *et al.*, 1980; Douglas *et al.*, 1982; Maley & Elde, 1982; Shults *et al.*, 1984; Triepel *et al.*, 1985). Il a été postulé que les terminaisons nerveuses SPergiques du NTS proviennent du noyau ambigu ou du noyau moteur dorsal du nerf vague puisque ces deux noyaux possèdent également une immunoréactivité pour la substance P et qu'ils ont un rôle cardiovasculaire reconnu (Maley & Elde, 1982; Triepel *et al.*, 1985). De plus, d'autres noyaux du bulbe rachidien renferment la substance P et exercent un rôle cardiovasculaire : il s'agit entre autres du *locus coeruleus*, du parabrachial dorsal et ventral, du raphé *obscurus* et *pallidus*, et le noyau *reticularis gigantocellularis* (Figure 5) (Triepel *et al.*, 1985; Len *et al.*, 1994). Des travaux d'immunocytochimie et d'autoradiographie ont montré une concentration élevée de substance P dans les centres cardiovasculaires de la *médulla oblongata* dorsale et ventrale chez le rat (Douglas *et al.*, 1982; Helke *et al.*, 1984). Ainsi, certaines fibres bulbospinales positivement marquées à la substance P, à la neurokinine A et à la sérotonine proviennent de la *médulla oblongata* ventrale (via le noyau *interfascicularis hypoglossi* et le noyau réticulé *gigantocellularis*) et du noyau raphé et projettent directement dans la région intermédiolatérale de la moelle épinière (Chan-Palay, 1979; Helke *et al.*, 1982; Sasek *et al.*, 1990).

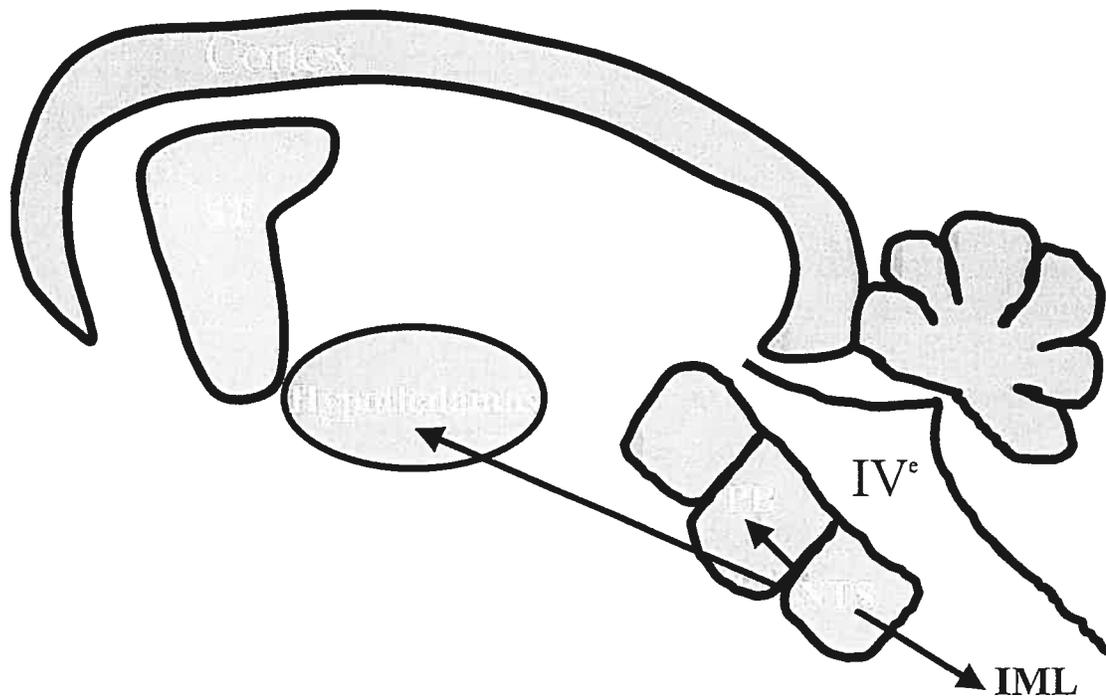


**Figure 5** Distribution des fibres neuronales et corps cellulaires marqués à la substance P au niveau du bulbe rachidien (médulla oblongata) du rat (-12.3 mm par rapport au point Bregma). Échelle de densité : &, élevée ; §, modérée ; †, faible. A, noyau Ambigu; Gi, noyau réticulé gigantocellulaire; LPGi, noyau latéral paragigantocellulaire; NTS, noyau du tractus solitaire; SP5, noyau du paratrigémeaux. Résultats tirés de l'ouvrage de Shults et al., Peptides 5(6) : 1097-1128,1984.

En résumé, les neurones du NTS et de la médulla oblongata marquées à la substance P peuvent effectuer des synapses avec plusieurs autres noyaux ayant un rôle cardiovasculaire connu (Triepel *et al.*, 1985; Phillipu, 1988; van Giersbergen *et al.*, 1992). Ainsi, le NTS projette au noyau moteur dorsal du vague, l'amygdale, plusieurs noyaux de l'hypothalamus, le parabrachial dorsal et ventral, le *locus coeruleus* et la région intermédiolatérale de la moelle épinière (Triepel *et al.*, 1985) (Figure 6).

#### 1.1.4.2 Les neurokinines A et B

Ce n'est que dans les années quatre-vingts que d'autres tachykinines dont la neurokinine A et la neurokinine B ont été isolées chez les mammifères (Kangawa *et al.*, 1983; Kimura *et al.*, 1983; Kotani *et al.*, 1986). Des études immunohistochimiques et d'hybridation *in situ* ont montré une distribution élevée à modérée de neurokinine A, de neurokinine B ainsi que de leurs ARNm dans chaque subdivision majeure du cerveau (Minamino *et al.*, 1984; Nawa *et al.*, 1984) dont l'hypothalamus (Tateishi *et al.*, 1989; Larsen *et al.*, 1992; Merchenthaler *et al.*, 1992), le mésencéphale (Arai & Emson, 1986; Merchenthaler *et al.*, 1992), le cortex cérébral (Minamino *et al.*, 1984; Merchenthaler *et al.*, 1992) et le bulbe rachidien (Minamino *et al.*, 1984). De façon générale, la neurokinine A et la substance P sont localisées aux mêmes régions ce qui concorde avec le fait que ces deux neuropeptides soient synthétisés à partir du même précurseur (Ribeiro-da-Silva *et al.*, 2000).



**Figure 6** Représentation schématique des projections neuronales entre diverses régions centrales exerçant un rôle reconnu dans le contrôle de la fonction cardiovasculaire. Ces régions possèdent également des tachykinines endogènes et leurs récepteurs. IV<sup>e</sup>, quatrième ventricule ; IML, région intermédiolatérale de la moelle épinière ; NTS, noyau du tractus solitaire ; PB, noyau parabrachial ; ST, striatum.

Chez l'humain et le singe, on détecte l'expression de l'ARNm pour le gène préprotachykinine-A (PPT-A) responsable entre autres de la synthèse de la substance P et de la neurokinine A au niveau du striatum, de l'hypothalamus, de la région périaqueductale grise et de l'amygdale (Arai & Emson, 1986; Larsen *et al.*, 1992; Hurd *et al.*, 1999). Si l'on suit le même raisonnement, on pourrait s'attendre à ce que la distribution de la neurokinine B soit bien différente de celle de la substance P. Il existe, en effet, quelques différences dans la distribution de ces deux neuropeptides. Par exemple, on rapporte une densité très faible de substance P, par opposition à une densité très élevée de neurokinine B dans le bulbe olfactif, le cortex cérébral et l'hippocampe du rat (Lucas *et al.*, 1992). Par contre, le noyau du raphé possède une densité élevée de substance P mais on n'y détecte pas de neurokinine B (Warden & Scott Young III, 1988). En plus de ces régions, on a identifié la neurokinine B dans le striatum et dans plusieurs noyaux de l'hypothalamus dont les noyaux latéral, arqué et paraventriculaire (Merchenthaler *et al.*, 1992).

Par l'expression du gène c-fos, on peut observer les régions du cerveau activées par les tachykinines. En effet, ce gène est exprimé suite à une stimulation synaptique ; il se révèle donc un marqueur d'une activité neuronale. Ainsi, on a détecté le gène c-fos au niveau du septum, de l'amygdale, du noyau paraventriculaire, latéral et supraoptique de l'hypothalamus, du thalamus, de l'aire tegmentale ventrale et de la substance noire du rat suite à l'injection i.c.v. de la neurokinine B (Spitznagel *et al.*, 2001) ou du senktide, un agoniste du récepteur NK<sub>3</sub> (Smith & Flynn, 2000). L'utilisation de la même approche chez le rat suite à l'injection i.c.v. de la substance P a montré une expression de c-fos dans les noyaux paraventriculaire et dorsomédial de l'hypothalamus, le noyau parabrachial et le

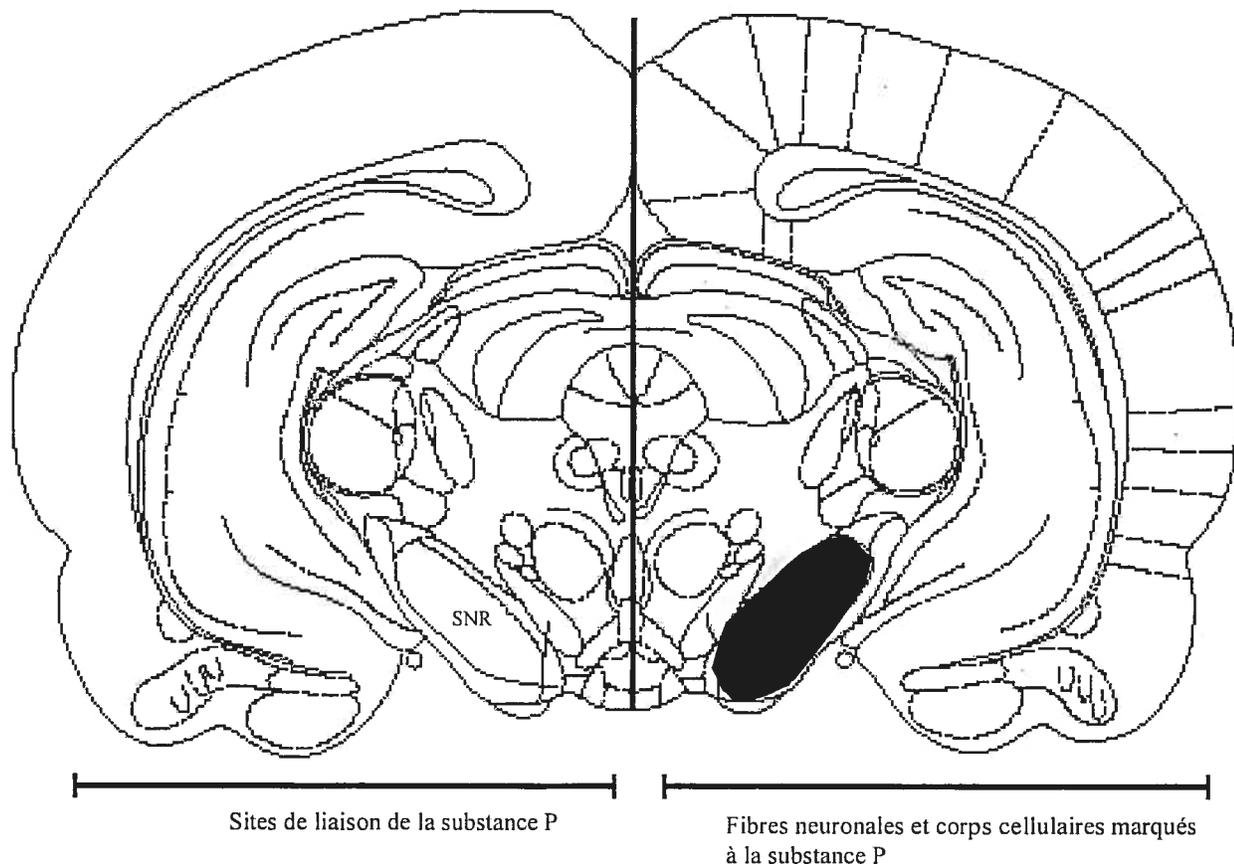
thalamus médial. Ces niveaux d'expressions étaient réduites de façon significative en présence de l'antagoniste NK<sub>1</sub> des tachykinines, le RP 67580 (Spitznagel *et al.*, 2001). Il est tentant de suggérer que la substance P et la neurokinine B puissent activer des voies neuronales différentes et par conséquent elles seraient impliquées dans différentes fonctions physiologiques. D'autres études sont cependant nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

La distribution des récepteurs des tachykinines a été examinée suite à l'identification et le clonage moléculaire des trois récepteurs des tachykinines (Yokota *et al.*, 1989; Hershey & Krause, 1990; Nakanishi, 1991). La distribution des ARNm des trois récepteurs a entre autres été étudiée par hybridation *in situ*. Une concentration modérée à élevée de récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> a été mise en évidence dans plusieurs régions centrales tel que l'hypothalamus, le cortex et le cervelet alors que le récepteur NK<sub>2</sub> est localisé préférentiellement en périphérie; plus précisément au niveau des tissus musculaires de la vessie, du gros intestin, de l'estomac et des glandes surrénales (Tsuchida *et al.*, 1990). Les récepteurs NK<sub>2</sub> ont également été identifiés sur les neurones myentériques du colon (Mantyh *et al.*, 1989).

#### **1.1.4.3 Le récepteur NK<sub>1</sub>**

Le premier récepteur des tachykinines, cloné à partir du cerveau et de la glande submandibulaire du rat (Yokota *et al.*, 1989; Hershey & Krause, 1990), a été identifié dans les neurones et les cellules gliales du système nerveux central. Le striatum et le thalamus contiennent une forte densité de récepteurs NK<sub>1</sub> contrairement à la substance noire et les noyaux paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus qui possèdent une faible

densité de sites de liaison à la substance P (Buck *et al.*, 1986). À ce propos, l'histoire des tachykinines et de leurs récepteurs dans la substance noire a longtemps intrigué les scientifiques. Ce sujet a alimenté des discussions passionnées dont l'écho persiste encore aujourd'hui. En effet, la substance noire possède une densité très élevée de substance P et bien peu de récepteurs NK<sub>1</sub> pour contenir un si grand nombre de neuropeptides (Brownstein *et al.*, 1976; Mantyh *et al.*, 1984; Shults *et al.*, 1984; Herkenham, 1987) (Figure 7). Le temps a fait diminuer l'amplitude du mystère puisque la présence de neurokinine A et du récepteur NK<sub>3</sub> des tachykinines dans la substance noire a été confirmée (Arai & Emson, 1986; Lee *et al.*, 1986; Lindfors *et al.*, 1986a; Stoessl & Hill, 1990; Stoessl, 1994; Whitty *et al.*, 1995; Bannon *et al.*, 1995b; Shughrue *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998). Tel que mentionné dans la section 1.1.2 de cette thèse, les tachykinines endogènes possèdent une très faible sélectivité pour chacun de leurs récepteurs. On peut donc concevoir que la substance P et la neurokinine A puissent activer autant les récepteurs NK<sub>3</sub> que NK<sub>1</sub> dans ce noyau. De plus, plusieurs facteurs ont été énumérés pour expliquer ce déséquilibre neuropeptide/récepteur: le manque de sensibilité des techniques anatomiques, l'occupation des récepteurs par le ligand endogène, l'existence de sous-types de récepteurs, la présence de récepteurs non fonctionnels ou internalisés (Herkenham, 1987; Quartara & Maggi, 1998). Mis à part les ganglions de la base cérébraux, des densités fortes à modérées de récepteurs NK<sub>1</sub> et de l'expression de son ARNm ont été observées dans plusieurs noyaux du cerveau dont l'hippocampe, l'amygdale, le NTS, le bulbe olfactif, l'hypothalamus, le noyau parabrachial, le *locus coeruleus*, le noyau du raphé, le cortex et le cervelet (Saffroy *et al.*, 1988; Tsuchida *et al.*, 1990; Helke *et al.*, 1990; Hershey & Krause, 1990; Bannon *et al.*, 1992; Quartara & Maggi, 1998; Ribeiro-da-Silva *et al.*, 2000; Yip & Chahl, 2001).



**Figure 7** Représentation schématique des sites de liaison des récepteurs (gauche) et des fibres/corps cellulaires de la substance P (droite) dans la substance noire. La portion gauche montre un marquage indétectable des sites de liaison du neuropeptide par opposition à une densité très élevée de fibres et corps cellulaires marqués à la substance P dans la substance noire. SNR, portion réticulée de la substance noire. Tiré de l'ouvrage de Shults et al., *Peptides* 5(6) : 1097-1128, 1984.

#### 1.1.4.4 Le récepteur NK<sub>2</sub>

Ce récepteur, cloné à partir des estomacs de boeuf (Masu *et al.*, 1987) et de rat (Sasai & Nakanishi, 1989), possède 48% d'homologie avec le récepteur NK<sub>1</sub> (Yokota *et al.*, 1989). La distribution du récepteur NK<sub>2</sub> a surtout été étudiée en périphérie puisqu'on y retrouve une forte densité de ses sites de liaison (Buck *et al.*, 1986; Mantyh *et al.*, 1989; Tsuchida *et al.*, 1990). À cet effet, ces récepteurs ont été localisés au niveau des tissus musculaires de la vessie, du gros intestin, de l'estomac et des glandes surrénales (Tsuchida *et al.*, 1990). Les récepteurs NK<sub>2</sub> ont également été identifiés sur les neurones myentériques du colon (Mantyh *et al.*, 1989). On a aussi identifié ce récepteur au niveau des astrocytes de la moelle épinière par immunohistochimie (Zerari *et al.*, 1998). Par contre, la présence du récepteur NK<sub>2</sub> des tachykinines au niveau cérébral a longtemps été réfutée puisque les études de liaison en autoradiographie ne pouvaient prouver sans équivoque son existence (Bergstrom *et al.*, 1987; Saffroy *et al.*, 1988; Mantyh *et al.*, 1989; Guard & Watson, 1991; Nakanishi, 1991). Cependant, d'autres études ont rapporté l'existence du récepteur en faible concentration dans le striatum, l'hippocampe, l'hypothalamus, le cortex cérébral et la substance noire des rongeurs et de l'humain en mesurant l'ARNm par hybridation *in situ* ou par une technique de réaction à la chaîne "reverse transcription-polymérase" (RT-PCR) (Minamino *et al.*, 1984; Buck *et al.*, 1986; Bannon *et al.*, 1992; Whitty *et al.*, 1995; Bensaid *et al.*, 2001). À l'aube des années quatre-vingt-dix, d'autres études de liaison en autoradiographie utilisant un autre radioligand ([<sup>3</sup>H]-SR48968, un antagoniste non-peptidique hautement sélectif aux récepteurs NK<sub>2</sub>), ont révélé la présence d'une faible densité de récepteurs NK<sub>2</sub> dans certaines zones limitées du cerveau du rat incluant le cortex frontal, l'hippocampe, l'amygdale, le striatum,

l'hypothalamus, le thalamus et la substance noire (Dam *et al.*, 1991; Hagan *et al.*, 1993; Stratton *et al.*, 1996; Ribeiro-da-Silva *et al.*, 2000).

#### 1.1.4.5 Le récepteur NK<sub>3</sub>

Contrairement au récepteur NK<sub>2</sub>, le récepteur NK<sub>3</sub> se retrouve préférentiellement dans le système nerveux central et il a été cloné peu après les deux autres (Shigemoto *et al.*, 1990). On a identifié le récepteur NK<sub>3</sub> entre autres par des techniques d'autoradiographie dans le cerveau du rat, de la souris et du cobaye (Beaujouan *et al.*, 1984; Bergstrom *et al.*, 1987; Dam *et al.*, 1988; Saffroy *et al.*, 1988; Mantyh *et al.*, 1989; Guard *et al.*, 1990; Stoessl & Hill, 1990). Des concentrations élevées de récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines et de son ARNm ont été observées dans le cortex, le noyau supraoptique et paraventriculaire de l'hypothalamus, le thalamus, l'amygdale, l'hippocampe, la zone compacte de la substance noire, l'aire tegmentale ventrale, la portion médiane du noyau dorsal du raphé, le *locus coeruleus*, le cervelet, l'hippocampe, le noyau du tractus solitaire et le striatum de rat (Bergstrom *et al.*, 1987; Saffroy *et al.*, 1988; Mantyh *et al.*, 1989; Dam *et al.*, 1990; Stoessl & Hill, 1990; Bannon *et al.*, 1992; Shughrue *et al.*, 1996), du cobaye (Langlois *et al.*, 2001; Yip & Chahl, 2001) et de l'humain (Buell *et al.*, 1992; Mileusnic *et al.*, 1999). Plus précisément, des études d'immunocytochimie et d'hybridation *in situ* ont mis en évidence une co-localisation de ce récepteur avec plusieurs neurones dopaminergiques (marqués par un anticorps se fixant à la tyrosine hydroxylase, l'enzyme de synthèse de la dopamine): ceux de la substance noire (A9), de

l'aire tegmentale ventrale (A10) et plusieurs neurones dopaminergiques de l'hypothalamus (A11-A15) (Whitty *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998).

Pour une revue récente de la distribution centrale des récepteurs des tachykinines, voir Da Silva *et coll.*, 2000.

## 1.2 Fonctions physiologiques des tachykinines

Les tachykinines exercent plusieurs fonctions physiologiques au niveau périphérique. Elles ne seront qu'énumérées dans cette thèse puisqu'elle est axée sur le rôle des tachykinines au niveau du système nerveux central. Parmi ces effets périphériques, mentionnons la transmission des signaux douloureux par les fibres sensorielles de type C, la dilatation des vaisseaux sanguins et l'hypotension artérielle *via* la relâche de monoxyde d'azote et de prostacycline par les cellules endothéliales, la constriction de plusieurs types de muscles lisses dont ceux des voies respiratoires, de l'intestin, de l'utérus, de l'urètre et de la vessie, la sécrétion salivaire et l'extravasation des protéines plasmatiques suite à une inflammation neurogénique. Les études avec les antagonistes des tachykinines en périphérie pourraient éventuellement permettre l'émergence de nouveaux traitements contre certaines pathologies inflammatoires tels que l'arthrite, l'asthme et les allergies. Voir Otsuka & Yoshioka (1993) et autres (Maggi, 1997; Lecci *et al.*, 2000; Harrison & Geppetti, 2001) pour une revue complète des effets périphériques des tachykinines.

### 1.2.1 Réponses centrales de la substance P

Les toutes premières études sur les effets centraux de la substance P remontent aux années cinquante. Des extraits de substance P administrés chez la souris (Zetler, 1956) et le lièvre (Stern & Milin, 1959) ont montré des effets sédatifs. Des effets comportementaux ont aussi été observés suite à l'injection de la substance P dans le troisième ventricule cérébral chez le lapin et le chat (von Euler & Pernow, 1954, 1956). Les comportements décrits incluaient des épisodes de toilettage, de déglutition, de stupeur, accompagnés d'augmentations de pression artérielle et d'augmentation du rythme respiratoire.

Plus récemment, il a été démontré que l'administration i.c.v. de substance P synthétique produit une augmentation dose-dépendante de pression artérielle et de fréquence cardiaque chez le rat éveillé (Unger *et al.*, 1981; Tomlinson *et al.*, 1990; Tschope *et al.*, 1992) ou anesthésié (Traczyk & Kubicki, 1980; Takano *et al.*, 1990, 1992). L'augmentation de pression artérielle a été bloquée par un traitement avec un antagoniste  $\beta$ -adrénergique (propranolol) injecté i.c.v (Traczyk & Kubicki, 1980) et  $\alpha$ -adrénergique (prazosin) injecté par voie intra-veineuse (Unger *et al.*, 1981). De plus, des augmentations du débit cardiaque, de l'activité adrénérrique des nerfs splanchniques et rénaux, des taux plasmatiques d'épinéphrine et de norépinéphrine, ont été observés sans changement des taux plasmatiques de vasopressine après injection i.c.v. de substance P (Unger *et al.*, 1981, 1985). Il est donc suggéré que l'augmentation de pression artérielle suite à l'injection centrale de la substance P soit provoquée par une élévation de l'activité sympatho-surrénalienne. D'autres études effectués chez le lapin anesthésié appuient ces derniers résultats et montrent que les effets cardiovasculaires observés suite à l'injection intra

cisternale de substance P sont atténués par une inhibition de l'activité ganglionnaire sympathique avec le pentolinium (Petty & Read, 1982).

À la suite de certaines études axées sur la réponse physiologique typique suite à un stress (Hilton & Redfern, 1986; Yardley & Hilton, 1986), Unger et collaborateurs (1988) ont émis l'hypothèse que la substance P injectée i.c.v. provoque une réponse cardiovasculaire et comportementale similaire à la réaction de défense lors d'un stress physiologique. Les augmentations de pression artérielle et de fréquence cardiaque sont associées à une vasoconstriction des lits vasculaires rénaux et mésentériques et à une vasodilatation des muscles squelettiques des membres inférieurs. La vasoconstriction rénale et mésentérique est abolie par un traitement au prazosin (un antagoniste  $\alpha_1$ -adrénergique) alors que la vasodilatation des muscles squelettiques est bloquée par un antagoniste  $\beta_2$ -adrénergique (ICI 118,551) mais non par un antagoniste cholinergique (atropine). Un traitement avec l'antagoniste  $\beta_1$ -adrénergique (métoprolol) bloque la tachycardie et diminue l'effet presseur. Les comportements associés à ces effets cardiovasculaires sont reliés à un état de vigilance: augmentation des épisodes de locomotion, d'exploration, de mordillement de la peau et de grattage (Unger *et al.*, 1985, 1988; Schneider *et al.*, 1986; Tomlinson *et al.*, 1990; Tschöpe *et al.*, 1992).

Les régions du cerveau impliquées dans cette réponse cardiovasculaire de stress intégré comprennent les noyaux de l'amygdale, de l'hypothalamus, du mésencéphale et de la région périacqueducatale grise (Hilton, 1982). Ces régions possèdent une innervation riche en tachykinines, surtout en substance P (Otsuka & Yoshioka, 1993). L'hypothalamus

est plus particulièrement visé comme centre principal de cette réponse. En effet, des diminutions des taux de substance P dans les régions ventromédiales, dorsomédiales et latérales de l'hypothalamus ont été observées suite à une séquence répétitive de chocs électriques à la patte chez le rat (Siegel *et al.*, 1987). Une réaction de défense complète et semblable à celle observée suite à l'injection i.c.v. de la substance P a été rapportée suite à une stimulation électrique de ces mêmes régions hypothalamiques (Yardley & Hilton, 1986). L'injection sous-cutanée de formaline dans une patte de rat provoque une réponse cardiovasculaire et comportementale de stress intégré. Ces réponses, caractérisées par une augmentation de pression artérielle, de fréquence cardiaque et de nettoyage/mordillement des pattes arrières, sont significativement diminuées par l'injection i.c.v. d'un antagoniste des récepteurs NK<sub>1</sub> (RP 67580), mais non par l'antagoniste des récepteurs NK<sub>2</sub>, le SR 48968 (Culman *et al.*, 1997). On peut donc conclure que les récepteurs NK<sub>1</sub> des tachykinines sont impliqués dans la réponse centrale de stress intégré suite à un stimulus nociceptif alors que l'implication des récepteurs NK<sub>2</sub> demeure incertaine.

D'autre part, différents agonistes endogènes ont été injectés i.c.v.; ils provoquent une augmentation significative de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque chez le rat éveillé (Itoi *et al.*, 1992; Prat *et al.*, 1994; Couture *et al.*, 1995; Culman & Unger, 1995) et anesthésié (Takano *et al.*, 1990) à différents degrés d'intensité : neuropeptide K > neuropeptide  $\gamma$  > substance P > neurokinine A > neurokinine B (Couture *et al.*, 1995; Culman & Unger, 1995). L'implication du système nerveux sympathique a été confirmé dans la réponse cardiovasculaire de la neurokinine A puisqu'un traitement avec des antagonistes  $\alpha$ -adrénergique (phentolamine),  $\beta$ -adrénergique (propranolol) ainsi qu'au pentolinium inhibent ces effets (Takano *et al.*, 1990, 1991). En général, les effets des

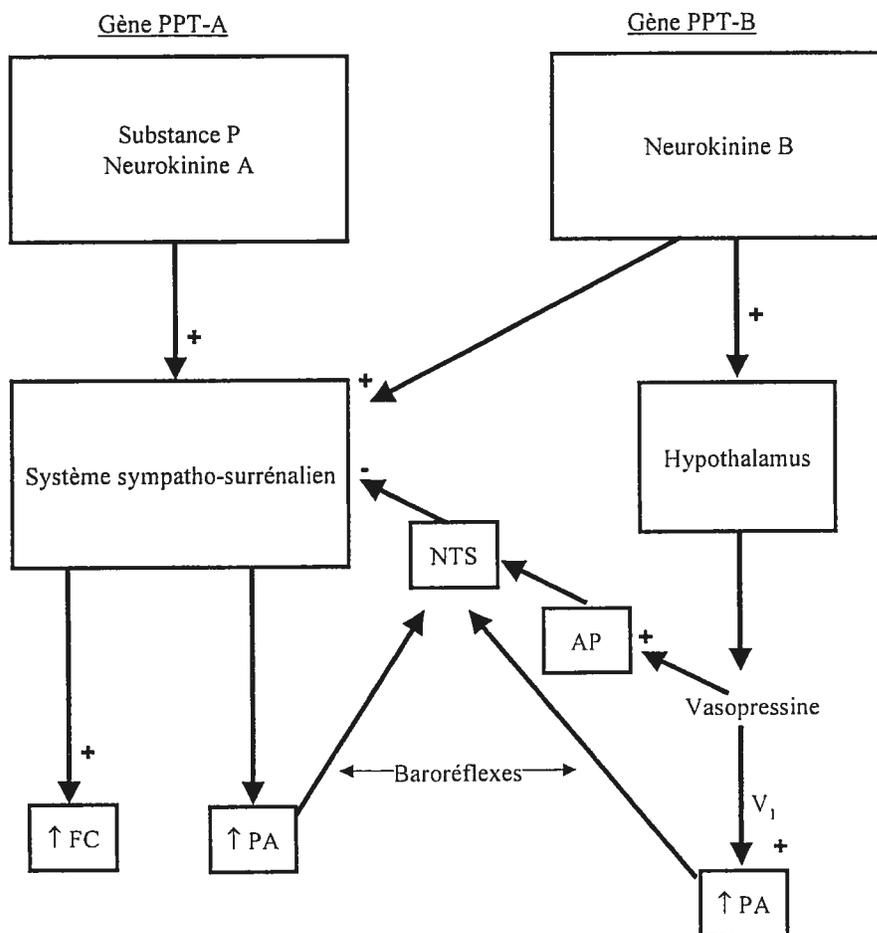
peptides endogènes sont bloqués par l'addition de leurs antagonistes respectifs. Ainsi, les effets cardiovasculaires de la substance P chez le rat sont bloqués par l'antagoniste NK<sub>1</sub> (RP 67580) qui ne bloque pas les effets de la neurokinine A dans les mêmes conditions (Culman & Unger, 1995). Toutefois, les agonistes naturels ne sont pas sélectifs à un seul récepteur. Par exemple, les effets cardiovasculaires suite à l'injection i.c.v. de la neurokinine A sont atténués par l'addition d'un antagoniste NK<sub>2</sub> (SR 48968) mais seul la co-injection des antagonistes NK<sub>1</sub> (RP67580) et NK<sub>2</sub> (SR 48968) bloque complètement cette réponse cardiovasculaire chez le rat éveillé (Picard *et al.*, 1994). Il a été conclu que la neurokinine A peut activer les deux récepteurs. Par conséquent, l'utilisation de ces agents pharmacologiques non sélectifs permet difficilement de discerner la fonction des récepteurs des tachykinines dans les effets cardiovasculaires observés.

### **1.2.2 Utilisation d'agonistes et d'antagonistes sélectifs dans les études fonctionnelles**

Au cours des années quatre-vingt-dix, des agonistes et antagonistes sélectifs ont permis d'identifier les récepteurs impliqués dans les réponses cardiovasculaires observées. À l'instar de la substance P, les agonistes sélectifs du récepteur NK<sub>1</sub> (septide et/ou [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP), lorsqu'administrés dans les ventricules latéraux du cerveau de rat (Cellier *et al.*, 1999) ou dans le quatrième ventricule du cerveau de lapin ([Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP, Martini *et al.*, 1995), augmentent l'activité des baroréflexes (Martini *et al.*, 1995), la fréquence cardiaque et la pression artérielle (Cellier *et al.*, 1999; Martini *et al.*, 1995). Ces effets cardiovasculaires sont bloqués par un traitement avec les antagonistes sélectifs des récepteurs NK<sub>1</sub> (RP 67580, Cellier *et al.*, 1999; SR 140333, Martini *et al.*, 1995) et sont accompagnés de comportements de reniflement, de toilette

du museau et des pattes arrières (Cellier *et al.*, 1999). Des augmentations de pression artérielle et de fréquence cardiaque ont été mesurées suite à l'injection de l'agoniste sélectif des récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines, le senktide, (Wormser *et al.*, 1986)) chez le rat (Takano *et al.*, 1990, 1991; Itoi *et al.*, 1992; Culman *et al.*, 1995; Cellier *et al.*, 1997). Contrairement à la substance P et à la neurokinine A, le système sympathique n'est pas le seul médiateur des effets cardiovasculaires de l'agoniste senktide. En effet, seul l'effet presseur initial a été bloqué par le pentolinium et la phentolamine ; l'effet presseur complet a été inhibé par un traitement avec l'antagoniste des récepteurs V<sub>1</sub> de la vasopressine. De plus, les effets cardiovasculaires du senktide sont accompagnés d'une augmentation des taux plasmatiques de vasopressine (Takano *et al.*, 1990, 1991).

Une dissociation des effets des différents agonistes sur l'activité comportementale a aussi été notée suite à leur injection i.c.v. chez le rat : la substance P et la neurokinine A augmentent les épisodes d'exploration et de toilettage du museau et des pattes arrières alors que le senktide augmente les secousses corporelles (Itoi *et al.*, 1992; Couture *et al.*, 1995; Cellier *et al.*, 1997, 1999; Spitznagel *et al.*, 2001). Les manifestations comportementales de secousses corporelles sont identifiées comme des réactions typiques produites par une activation des récepteurs NK<sub>3</sub> centraux chez le rat (Elliott & Iversen, 1986; Stoessl *et al.*, 1988). La substance P et la neurokinine A peuvent donc augmenter la pression artérielle et la fréquence cardiaque par l'entremise du système nerveux sympathique alors que le senktide fait intervenir de surplus l'hormone vasopressine (Figure 8) (Takano *et al.*, 1990). Ces observations pourraient être expliquées par une activation de différentes voies neuronales dans le cerveau. Par exemple, les récepteurs NK<sub>3</sub> sont fréquemment associés aux voies dopaminergiques hypothalamiques, nigrostriée



**Figure 8** Modèle proposé par Takano et collaborateurs (1990) décrivant les mécanismes des effets cardiovasculaires par les tachykinines endogènes du système nerveux central. En plus de moduler l'activité du système sympatho-surrénalien, la neurokinine B augmente la synthèse et la libération de la vasopressine dans l'hypothalamus. AP, Area postrema ; FC, fréquence cardiaque ; NTS, noyau du tractus solitaire ; PA, pression artérielle ; PPT, préprotachykinine ; V<sub>1</sub>, récepteurs V<sub>1</sub> de la vasopressine au niveau vasculaire.

et mésocorticales-mésolimbiques (Whitty *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998) alors que la substance P est souvent co-localisée avec la sérotonine ou le glutamate au niveau du bulbe rachidien (Forchetti *et al.*, 1982; Helke *et al.*, 1982, 1984, 1991; Charlton & Helke, 1987; Saha *et al.*, 1995).

L'émergence de ces nouvelles molécules a donc permis de constater que les trois types de récepteurs des tachykinines sont impliqués dans les effets cardiovasculaires des agonistes injectés dans les ventricules cérébraux latéraux (Cellier *et al.*, 1997, 1999). Leurs effets sont inhibés par leurs antagonistes respectifs mais ces derniers ne présentent aucun effet cardiovasculaire significatif chez le rat normotendu (Cellier *et al.*, 1997, 1999), suggérant que les récepteurs des tachykinines ne sont pas impliqués dans la régulation tonique des fonctions cardiovasculaires au niveau supraspinal. On propose plutôt que les tachykinines et leurs récepteurs ont pour fonction de moduler les réflexes cardiovasculaires ou les fonctions cardiovasculaires dans certaines situations physiologiques (stress, stimulus nociceptif, exercice physique) (Couture *et al.*, 1995).

### **1.2.3 La désensibilisation des récepteurs**

Von Euler & Pernow (1956) ont remarqué un phénomène de tachyphylaxie lors d'injections répétées de substance P dans le cerveau de lapin et de chat. Ce phénomène de tachyphylaxie a été observé par d'autres auteurs suite à l'injection i.c.v. de substance P (Lembeck & Fischer, 1967; Traczyk & Kubicki, 1980; Laufer *et al.*, 1988). De plus, l'injection i.c.v. de la substance P et de la neurokinine A chez le rat éveillé et non immobilisé provoque une désensibilisation croisée. À cet effet, la substance P

désensibilise les effets cardiovasculaires des tachykinines de façon beaucoup plus efficace que la neurokinine A (Culman *et al.*, 1993a). De façon générale, l'activation des récepteurs NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> provoque une désensibilisation moins forte que l'activation du récepteur NK<sub>1</sub> (Nakanishi, 1991). On explique cette différence par la présence des acides aminés sérine et thréonine dans la troisième boucle cytoplasmique et à l'extrémité C-terminale du récepteur NK<sub>1</sub> (Guard & Watson, 1991; Nakanishi, 1991). Lorsque l'agoniste se fixe au récepteur NK<sub>1</sub>, la conformation du récepteur change, ce qui permet à certaines kinases d'effectuer une phosphorylation rapide de la sérine et de la thréonine (Guard & Watson, 1991; Culman *et al.*, 1993a). Ce phénomène provoque une diminution de l'affinité du récepteur pour sa protéine G. Lorsque l'agoniste n'est plus lié à son récepteur, la phosphorylation cesse et la protéine G se lie de nouveau à son récepteur, rendant ainsi le processus réversible (Katzung, 1995). En utilisant plusieurs fragments de la substance P injectés i.c.v. chez le rat éveillé, on constate que la séquence d'acides aminés carboxy-terminale de la portion 5-11 de la substance P est cruciale pour produire une désensibilisation du récepteur NK<sub>1</sub>. De son côté, le fragment 6-11 perd sa capacité de désensibiliser le récepteur NK<sub>1</sub> mais il peut produire des effets cardiovasculaires semblables à la substance P (Tschope *et al.*, 1995). De façon générale, les fragments C-terminaux provoquent des effets cardiovasculaires et comportementaux lorsqu'injectés i.c.v. chez le rat alors que les fragments N-terminaux sont inactifs ou provoquent des effets opposés à ceux observés avec la substance P (Tschope *et al.*, 1995). De plus, une déplétion graduelle des acides aminés de la portion N-terminale de la substance P fait diminuer les sites de liaison du fragment iodé pour le récepteur NK<sub>1</sub> (Beaujouan *et al.*, 1982; Viger *et al.*, 1983; Cascieri *et al.*, 1992). On conclut ainsi que la séquence d'acides aminés à l'extrémité N-terminale de la substance P est importante pour la liaison du

neuropeptide à son récepteur (reconnaissance) alors que l'extrémité C-terminale représente le message (effet cardiovasculaires et comportementaux) du neuropeptide au récepteur (Tschope *et al.*, 1995).

### 1.3 L'hypothalamus : site des effets cardiovasculaires des tachykinines?

L'hypothalamus est reconnu comme un centre d'intégration ayant un rôle important dans la régulation des fonctions cardiovasculaires (Kalant & Roschlau, 1989) et dans la réaction de défense face au stress (Yardley & Hilton, 1986). En effet, grâce à son lien étroit avec l'hypophyse, il sert d'intermédiaire entre le système nerveux et le système endocrinien. De plus, il possède un lien direct avec la région intermédiolatérale de la moelle épinière, région d'où originent les fibres préganglionnaires sympathiques (Otsuka & Yoshioka, 1993). La substance P provoque une augmentation de pression artérielle (Itoi *et al.*, 1991, 1994a; Ku *et al.*, 1998) et une augmentation du débit sanguin au niveau hypothalamique (Klugman *et al.*, 1980) lorsqu'elle est appliquée dans l'hypothalamus du rat (Itoi *et al.*, 1991, 1994a; Ku *et al.*, 1998) et du lapin (Klugman *et al.*, 1980). On a déterminé que les régions antérieure et ventromédiale de l'hypothalamus, contrairement à la région postérieure hypothalamique, sont responsables des effets i.c.v. de la substance P chez le rat (Itoi *et al.*, 1991). Le noyau paraventriculaire a également été associé aux effets de la substance P (Culman & Unger, 1995). Ce noyau reçoit des afférences des trois groupes neuronaux d'origine noradrénergique : la voie A1 qui origine de la région caudale ventrolatérale de la médulla oblongata, la voie A2 du complexe dorso-vagal (incluant le noyau du tractus solitaire) et la voie A3 du *locus coeruleus* (Sawchenko & Swanson, 1982b). Ces voies participent à l'élaboration de certaines réponses autonomiques et sont soupçonnées d'être responsables des effets cardiovasculaires observés suite aux injections

i.c.v. des tachykinines (Unger *et al.*, 1980, 1985, 1988). Toutes ces régions hypothalamiques possèdent une concentration élevée de fibres neuronales contenant la substance P (Ljungdahl *et al.*, 1978a,b; Tateishi *et al.*, 1989; Larsen *et al.*, 1992; Merchanthaler *et al.*, 1992). L'hypothalamus contient également une grande concentration de récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> des tachykinines (Dam *et al.*, 1990; Stoessl & Hill, 1990; Maeno *et al.*, 1993).

### 1.3.1 Relation fonctionnelle entre les tachykinines et la vasopressine

L'hypothalamus est impliqué dans la synthèse et la libération de nombreux facteurs hormonaux, dont la vasopressine. Cette hormone est synthétisée par les neurones magnocellulaires du noyau paraventriculaire et par le noyau supraoptique de l'hypothalamus (Page, 1994). Elle est par la suite libérée en circulation par l'intermédiaire de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Elle possède des effets importants sur les fonctions cardiovasculaires, rénales et dans le maintien de l'équilibre hydrosodée. Parmi ceux-ci, elle se révèle un puissant anti-diurétique, un vasoconstricteur des vaisseaux sanguins et elle augmente la sensibilité des baroréflexes. Plusieurs études ont associé la vasopressine aux effets des tachykinines (Perfumi *et al.*, 1988; Polidori *et al.*, 1989; Tomlinson *et al.*, 1990; Massi *et al.*, 1991; Nakayama *et al.*, 1992). L'administration centrale de plusieurs tachykinines, dont la substance P, inhibe la soif chez le rat et provoque un effet anti-diurétique chez le rat conséquemment à une libération de vasopressine (Cantalamessa *et al.*, 1984; Perfumi *et al.*, 1988; Chowdrey *et al.*, 1990; Mori *et al.*, 1993). Bien que certains scientifiques n'aient observé aucun changement dans les taux plasmatiques de vasopressine suite à l'injection i.c.v. de substance P (Unger *et al.*, 1981), d'autres ont rapporté que les rats Brattleboro, déficients en vasopressine, ne présentent aucun effet

cardiovasculaire significatif suite à l'injection i.c.v. de substance P contrairement aux rats témoins Long-Evans (Tomlinson *et al.*, 1990). D'autre part, une augmentation de l'activité neuronale d'origine vasopressinergique a été observée dans le noyau supraoptique de l'hypothalamus suite à l'injection i.c.v. de substance P (Clarke *et al.*, 1980).

Cependant, il a été rapporté ailleurs que, contrairement à la substance P et à la neurokinine A, seuls les agonistes sélectifs des récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines (senktide, eledoisine) provoquent une augmentation des taux plasmatiques de vasopressine (Polidori *et al.*, 1989; Takano *et al.*, 1990, 1991; Massi *et al.*, 1991). En accord avec ces résultats, d'autres études ont montré que les effets presseurs des agonistes sélectifs des récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines injectés i.c.v. (Nagashima *et al.*, 1989b; Takano *et al.*, 1990, 1991) ou dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Nakayama *et al.*, 1992; Takano *et al.*, 1993) sont inhibés par un traitement intra-veineux avec l'antagoniste des récepteurs V<sub>1</sub> de la vasopressine (Nagashima *et al.*, 1989b; Takano *et al.*, 1990, 1991; Nakayama *et al.*, 1992) ou par une lésion de la portion magnocellulaire du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Massi *et al.*, 1991). L'activation des récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines suite à l'injection i.c.v. de l'agoniste [MePhe<sup>7</sup>]NKB ou de l'injection de senktide dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Eguchi *et al.*, 1996) provoque également un effet anti-diurétique (Eguchi *et al.*, 1996; Yuan & Couture, 1997) et anti-natriurétique chez le rat (Yuan & Couture, 1997). Ces effets rénaux sont bloqués par un traitement avec les antagonistes sélectifs des récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines (i.c.v.) et V<sub>2</sub> de la vasopressine (i.v.) (Eguchi *et al.*, 1996; Yuan & Couture, 1997). Ces auteurs proposent donc que les récepteurs NK<sub>3</sub> centraux, possiblement ceux situés dans l'hypothalamus, sont impliqués dans la régulation des fonctions rénales et de l'homéostasie hydrosodée *via* la

libération de la vasopressine. Des études immunohistochimique, d'hybridation *in situ* et de liaison en autoradiographie démontrent que la portion magnocellulaire du noyau paraventriculaire et le noyau supraoptique de l'hypothalamus, les deux sites de synthèse de la vasopressine, sont pourvus de récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines (Bergstrom *et al.*, 1987; Saffroy *et al.*, 1988; Nagashima *et al.*, 1989b; Dam *et al.*, 1990; Stoessl & Hill, 1990; Eguchi *et al.*, 1996). On note par ailleurs que l'hypothalamus constitue la région du cerveau qui renferme la concentration la plus élevée de neurokinine B, le ligand endogène ayant la plus haute affinité pour le récepteur NK<sub>3</sub> des tachykinines (Minamino *et al.*, 1984; Merchenthaler *et al.*, 1992).

### **1.3.2 Relation fonctionnelle entre les tachykinines et l'ocytocine**

Mis à part la vasopressine, l'hypothalamus synthétise d'autres agents hormonaux impliqués dans la réponse cardiovasculaire face à un stress. L'ocytocine en fait partie et elle semble jouer un rôle dans les effets cardiovasculaires et comportementaux suite à l'injection i.c.v. de la substance P chez le rat. En effet, les taux plasmatiques d'ocytocine augmentent suite à l'injection i.c.v. de substance P (Unger *et al.*, 1988) et suite à un stress relié à l'état d'anxiété (Samson & Mogg, 1990). De plus, l'injection d'un oligo anti-sens qui se fixe à l'ARNm de l'ocytocine, empêchant ainsi la synthèse de l'hormone, bloque les effets cardiovasculaires et comportementaux de la substance P injectée i.c.v. chez le rat (Maier *et al.*, 1998).

## 1.4 Le bulbe rachidien : modulation des baroréflexes par les tachykinines?

### 1.4.1 Aspect anatomique des tachykinines dans le noyau du tractus solitaire

Le bulbe rachidien constitue la première composante du tronc cérébral. Il est formé de plusieurs noyaux du réseau central autonome. Ces régions possèdent un rôle déterminant dans les mécanismes de baroréflexes qui sont essentiels au contrôle de la pression artérielle à court terme. Parmi ces noyaux, le noyau du tractus solitaire (NTS) représente le point central des mécanismes de baroréflexe. En effet, ce noyau reçoit les afférences des fibres sensorielles glossopharyngées (IX) et vagues (X) qui originent des baro- et chemorécepteurs sino-aortiques et carotidiens (Crill & Reiss, 1968; Lipski *et al.*, 1975; Panneton & Loewy, 1980). Lorsque la pression artérielle s'élève ou s'abaisse brusquement, ces barorécepteurs s'activent, le NTS reçoit l'information et augmente ou diminue l'activité efférente cholinergique du nerf vague (X) (Gillis *et al.*, 1980; Helke *et al.*, 1980). Le NTS fait également parvenir des signaux à d'autres centres importants du bulbe rachidien telle la medulla ventrolatérale rostrale et caudale pour activer le nerf vague (X) ou changer le tonus sympathique de la région intermédiolatérale de la moelle épinière via l'inhibition des fibres excitatrices bulbospinales.

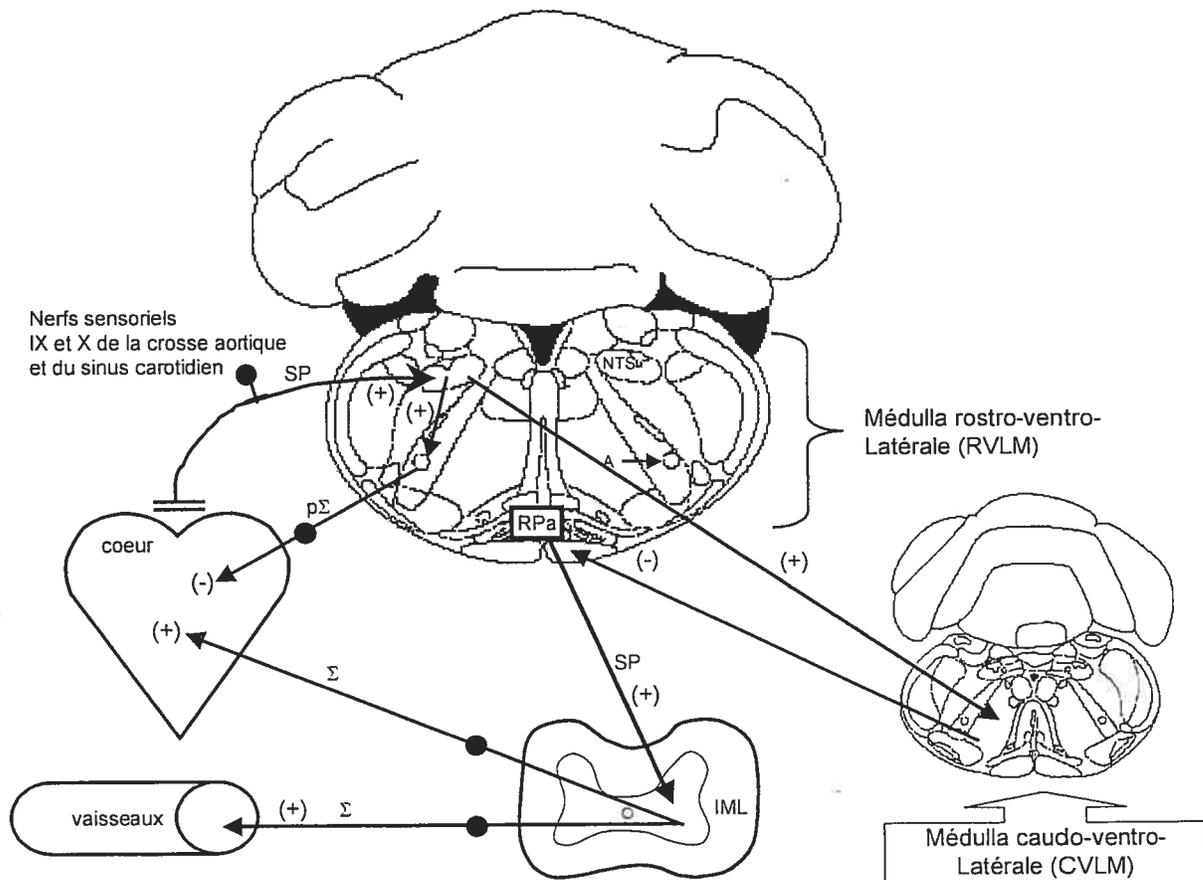
Au niveau anatomique, on sait déjà que la substance P et la neurokinine A sont présentes dans les terminaisons nerveuses du NTS chez le rat (Helke *et al.*, 1980, 1982; Kalia *et al.*, 1984; Sykes *et al.*, 1994; Saha *et al.*, 1995) et le chat (Batten *et al.*, 1989; Baude *et al.*, 1989), où elles sont co-localisées avec le glutamate (Saha *et al.*, 1995). Des

études de localisation ultrastructurales ont indiqué que les terminaisons nerveuses immunoréactives pour la substance P forment des synapses avec les corps cellulaires des neurones catécholaminergiques du NTS (Ljungdahl *et al.*, 1978a; Pickel *et al.*, 1979). Par la même approche, Palkovits et Zaborszky (1977) ont montré que les terminaisons nerveuses sensorielles des nerfs crâniens IX et X possèdent un lien direct avec les corps cellulaires catécholaminergiques du NTS. À partir de ces informations, Gillis *et coll.* (1980) ont formulé l'hypothèse que la substance P pourrait se révéler un neurotransmetteur des fibres nerveuses des baro-récepteurs faisant synapse dans le NTS. Pour vérifier cette hypothèse, les auteurs ont démontré que les régions commissurales et intermédiaires du NTS possèdent une immunoréactivité à la substance P significativement plus faible chez les rats ayant subi une dénervation des nerfs crâniens IX et X. Ces résultats ont été reproduits par Nagashima *et coll.* (1989a). Les projections neuronales impliquées dans les mécanismes de régulation des systèmes sympathique et parasympathique sont illustrées à la Figure 9. D'autre part, une hypoxie provoquée chez le rat augmente la libération de substance P dans le NTS (Lindfors *et al.*, 1986b) et une stimulation bilatérale des nerfs aortiques pourvus des barorécepteurs provoque une libération de substance P dans le NTS chez le lapin anesthésié (Morilak *et al.*, 1988). La substance P pourrait donc faire partie du mécanisme central de régulation des baroréflexes en agissant comme un neurotransmetteur et/ou neuromodulateur des fibres sensorielles des nerfs crâniens IX et X qui projettent au NTS.

#### **1.4.2 Aspect physiologique des tachykinines dans le noyau du tractus solitaire**

Les études fonctionnelles sur les effets de la substance P injectée dans le NTS ont produit des résultats variables. Certains auteurs ont observé une hypotension accompagnée d'une bradycardie et d'une réduction de l'activité nerveuse sympathique spontanée chez le chat et le rat anesthésiés (Haeusler & Osterwalder, 1980; Kubo & Kihara, 1987; Hall *et al.*, 1989; Nagashima *et al.*, 1989a; Chan *et al.*, 1990; Feldman, 1995; Bauman *et al.*, 2002), tandis que d'autres n'ont observé aucun effet cardiovasculaire (Talman & Reiss, 1981; Carter & Lightman, 1983) ou une augmentation de la pression artérielle (Fuxe *et al.*, 1979; Granata & Woodruff, 1980). Ces résultats contradictoires pourraient être reliés à différents facteurs dont la dose de peptide utilisée, l'état de conscience de l'animal, le volume d'injection de la substance P, le type d'injection (par une cannule en métal ou une pipette de verre) et l'espèce animale utilisée. L'ouvrage de Hall *et coll.* (1989) s'est penché sur la question et propose que les différentes approches expérimentales aient contribué à ces différents résultats. Les auteurs appuient l'hypothèse d'un rôle important pour la substance P dans la régulation des baroréflexes au niveau du NTS (Hall *et al.*, 1989).

À l'opposé de la substance P et de la neurokinine A, une microinjection bilatérale du senktide (agoniste sélectif des récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines) dans le NTS provoque une augmentation de pression artérielle accompagnée d'une tachycardie chez le rat (Nagashima *et al.*, 1989b). Par contre, une autre étude chez le rat anesthésié montre plutôt que l'injection dans le NTS des agonistes sélectifs des récepteurs NK<sub>2</sub> ( $\alpha$ -NKA[4-10]) et NK<sub>3</sub> (senktide) des tachykinines, contrairement à l'injection de la substance P, ne change pas de façon significative la pression artérielle et la fréquence cardiaque (Feldman, 1995). Les effets différents de la substance P et du senktide pourraient s'expliquer par une distribution différentielle des trois récepteurs des tachykinines dans ce noyau.



**Figure 9** Représentation schématique des mécanismes de régulation sympathique ( $\Sigma$ ) et para-sympathique ( $p\Sigma$ ) des baroréflexes. Les voies afférentes sensorielles qui proviennent de la crosse aortique et du sinus carotidien contiennent la substance P (SP) et projettent au noyau du tractus solitaire (NTS) qui, à son tour projette au noyau ambigu (A) ou au noyau moteur dorsal du nerf vague (non schématisé), d'où origine la voie parasympathique du nerf vague (X). Le NTS projette entre autres dans la région caudale de la médulla au noyau Raphé pallidus (RPa) qui, à son tour, effectue une projection (contenant la SP) à la région intermédiolatérale de la moelle épinière (IML), site d'origine des voies sympathiques.

Rares sont les études fonctionnelles qui ont évalué l'action directe des tachykinines sur l'activité des baroréflexes. L'une d'entre-elles rapporte que la substance P injectée de façon bilatérale dans le NTS des rats anesthésiés augmente significativement la sensibilité des baroréflexes (Chan *et al.*, 1990). Parallèlement à cette observation, une diminution de la sensibilité des baroréflexes est mesurée suite à l'administration d'un antagoniste sélectif des récepteurs NK<sub>1</sub> dans le quatrième ventricule chez le lapin (SR 140333 chez le lapin, Martini *et al.*, 1995), ou d'un antagoniste non sélectif de la substance P [D-Pro<sup>2</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>]SP et d'un antiserum à la substance P dans le NTS du rat (Chan *et al.*, 1990). La présence d'un effet cardiovasculaire avec un antagoniste des tachykinines suggère un rôle pour les tachykinines endogènes dans la régulation des baroréflexes. Les auteurs ont donc suggéré que la substance P est libérée de façon tonique au niveau du NTS pour augmenter la sensibilité des baroréflexes (Chan *et al.*, 1990). Cependant, ces résultats ne semblent pas en accord avec d'autres études effectuées chez la souris (Butcher *et al.*, 1998), le furet (Watson *et al.*, 1995) et le rat (Feldman, 1995) où l'inhibition des récepteurs NK<sub>1</sub> par des antagonistes sélectifs n'a pas affecté les paramètres cardiovasculaires de base ou la performance des baroréflexes. De plus, des souris invalidées pour le récepteur NK<sub>1</sub> ont présenté un réflexe de bradycardie (provoqué par l'injection i.v. de phényléphrine) significativement supérieur à celui des souris de type sauvage (Butcher *et al.*, 1998). Par contre, on ne peut exclure la possibilité d'un effet compensateur des baroréflexes causé par l'absence de récepteurs NK<sub>1</sub> dans l'organisme. Conséquemment, il est proposé que la substance P joue un rôle modulateur plutôt que de transmetteur dans les mécanismes des baroréflexes.

### 1.4.3 Aspect physiologique des tachykinines dans la médulla

Des chercheurs se sont intéressés à l'implication potentielle de la substance P dans la régulation cardiovasculaire au niveau de la médulla ventrale (Helke *et al.*, 1982, 1984; Charlton & Helke, 1987). Ainsi, les neurones du noyau raphé qui contiennent la substance P en co-localisation avec la sérotonine projettent dans la région intermédiolatérale de la moelle épinière (Forchetti *et al.*, 1982; Helke *et al.*, 1982, 1984, 1991; Charlton & Helke, 1987) et font un contact synaptique avec les neurones noradrénergiques A7 chez le rat (Milner *et al.*, 1988; Yeomans & Proudfit, 1990). L'injection de sérotonine dans cette région de la moelle épinière augmente la libération de substance P et inversement la substance P module la libération de sérotonine (Mitchell & Fleetwood-Walker, 1981; Otsuka & Yoshioka, 1993). De plus, il a été rapporté que tous les groupes cellulaires catécholaminergiques (A1-A15) sont entourés de terminaisons nerveuses marquées (par immunofluorescence) à la substance P (Ljungdahl *et al.*, 1978a). D'autre part, l'injection de substance P dans l'*area postrema*, une région servant de pont entre la médulla et le système sanguin périphérique, cause une augmentation de pression artérielle et de fréquence cardiaque (Hall *et al.*, 1989).

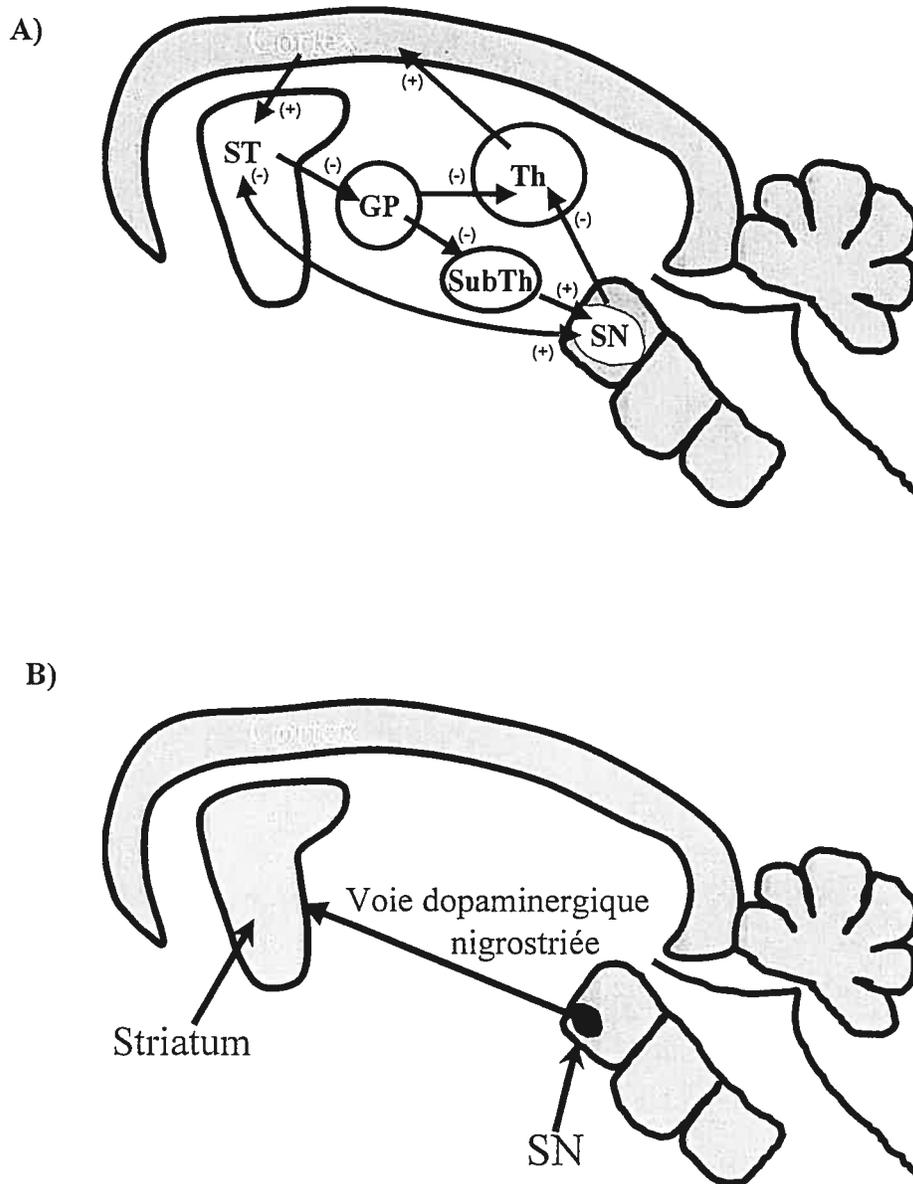
### 1.5 Les ganglions de la base : régulation des voies dopaminergiques provenant de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale

Les ganglions de la base forment un réseau neuronal complexe comprenant le striatum, la substance noire, l'aire tegmentale ventrale, le *globus pallidus*, le noyau subthalamique, le noyau entopédonculaire, le noyau pédonculopontine et le *colliculus* supérieur (Figure 10 A) (Gerfen & Wilson, 1996). Ils ont une implication majeure dans l'activité motrice et comportementale (Schiffmann & Vanderhaeghen, 1995). Ils

interviennent plus spécifiquement dans les processus de programmation et d'exécution des mouvements et ce, grâce aux informations qu'ils reçoivent de la périphérie (Schiffmann & Vanderhaeghen, 1995). Ils synchronisent le cortex moteur et le thalamus selon des séquences précises d'excitation et d'inhibition pour générer des mouvements complexes chez des sujets normaux. La présente section sera limitée à l'implication des tachykinines et de leurs récepteurs dans la modulation de deux projections dopaminergiques d'importance : la voie dopaminergique nigrostriée (A9) de la substance noire au striatum (noyaux caudé-putamen) (Figure 10 B) et les voies dopaminergiques mésocorticales-mésolimbiques (A10) de l'aire tegmentale ventrale au striatum (noyau accumbens).

### 1.5.1 Les noyaux caudé et putamen du striatum

Le striatum représente la région la plus grande et la principale composante des ganglions de la base (Gerfen, 1992). Il se compose des noyaux caudé et putamen en portion dorsale et du noyau accumbens en portion rostroventrale. Au niveau cellulaire, le striatum se divise en deux composantes qu'on nomme striosomes et matrice (Gerfen, 1992). Ces deux types de cellules diffèrent par leurs propriétés neurochimiques et ils sont disposés sous forme de mosaïque dans tout le striatum. Du point de vue anatomique, il a été rapporté que les trois régions du striatum possèdent une densité élevée de récepteurs NK<sub>1</sub> des tachykinines (Mussap *et al.*, 1993; Yip & Chahl, 2001), une concentration élevée de substance P (Ljungdahl *et al.*, 1978a) et une faible concentration (15-20% des neurones striatales) de neurokinine B (Gerfen, 1992) et de neurokinine A (Glowinski *et al.*, 1993).



**Figure 10** Représentation schématique des principales voies neuronales des ganglions de la base (A) et de la voie dopaminergique nigrostriée (B). GP, globus pallidus ; SN, substance noire ; ST, striatum ; Sub Th, noyau subthalamique ; Th, thalamus.

Plus précisément, les neurones marqués positivement à l'ARNm de la substance P se retrouvent autant dans les compartiments striosome (61%) que matrice (54%) du striatum (Gerfen & Scott Young III, 1988). De leur côté, les récepteurs NK<sub>1</sub> sont localisés sur les interneurons cholinergiques du striatum (Gerfen, 1992). Les récepteurs NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> sont cependant présents en très faible densité (Otsuka & Yoshioka, 1993). Du point de vue physiologique, une augmentation de l'expression des ARNm codant pour la substance P et la neurokinine A a été observée dans le striatum suite à une stimulation des neurones dopaminergiques par l'injection locale de méthamphétamine. Ces effets sont bloqués par l'administration systémique des antagonistes des récepteurs D-1 (SCH 23390) et D-2 (sulpiride) de la dopamine (Bannon *et al.*, 1991). D'autre part, une déplétion dopaminergique par injection de 6-hydroxydopamine diminue les niveaux de substance P dans le striatum (Gerfen & Wilson, 1996). D'un autre côté, il a été montré qu'une application locale d'un antagoniste NK<sub>1</sub> (CP 96345) des tachykinines augmente la libération striatale de dopamine chez le rat (Gygi *et al.*, 1993). Or, on a montré que les tachykinines telles que la substance P et la neurokinine B augmentent la libération de l'acétylcholine dans le striatum (Arenas *et al.*, 1991; Guzman *et al.*, 1993; Steinberg *et al.*, 1995) et que les interneurons cholinergiques du striatum exercent une activité tonique inhibitrice sur la libération de dopamine (Gerfen, 1992). L'ensemble de ces données suggère ainsi que les tachykinines augmentent la libération d'acétylcholine qui, à son tour, exerce une influence inhibitrice tonique sur la libération de dopamine dans le striatum.

Cependant, d'autres études ont montré une libération accrue de dopamine suite à l'injection de plusieurs agonistes des tachykinines sur des tranches de striatum de rat (Tremblay *et al.*, 1992; Khan *et al.*, 1995, 1996 a,b; Gauchy *et al.*, 1996). Ces effets

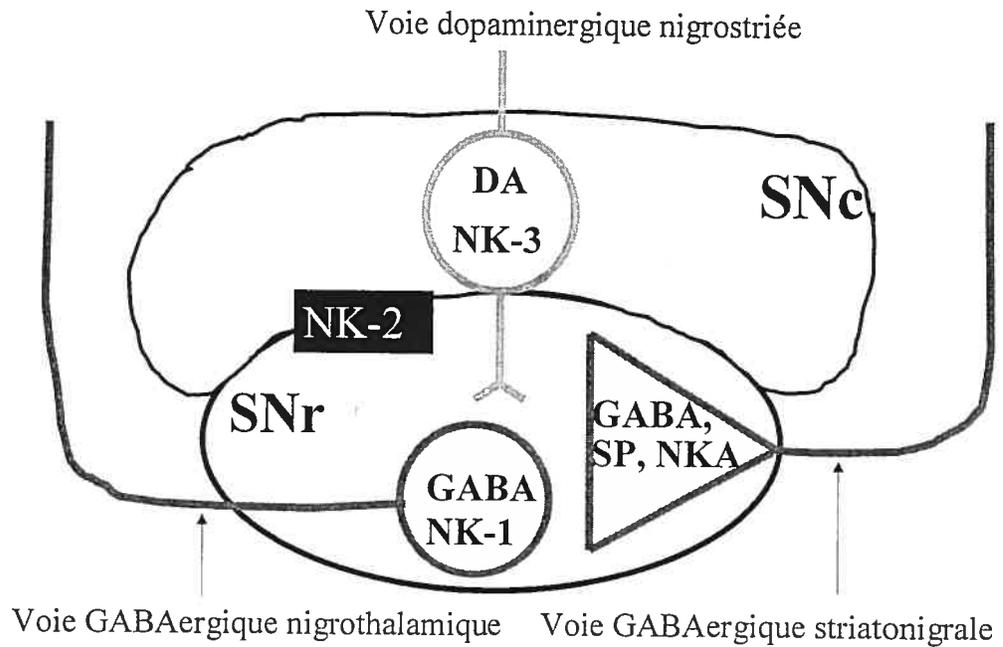
étaient bloqués par l'injection préalable de l'antagoniste muscarinique atropine (Khan *et al.*, 1996b). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour déterminer si les tachykinines exercent une influence excitatrice ou inhibitrice sur la libération de dopamine striatale. Néanmoins, ces études convergent vers un mécanisme neuronal impliquant une relation étroite entre les tachykinines, l'acétylcholine et la dopamine striatale (Khan *et al.*, 1996a; Blanchet *et al.*, 1998).

### 1.5.2 La substance noire

La substance noire se situe dans la portion supérieure du mésencéphale et représente le plus large noyau s'y trouvant. Il se divise en deux portions distinctes : la zone compacte (SNc) forme une zone mince et effilée le long du noyau (Figure 11) (Kandel & Schwartz, 1991). La majorité (85-95%) de ses neurones sont composés de corps cellulaires dopaminergiques (Gerfen & Wilson, 1996; Nalivaiko *et al.*, 1997). Cependant, on retrouve une faible portion (5-15%) de neurones non-dopaminergiques, possiblement GABAergiques, dans cette zone (Nalivaiko *et al.*, 1997). La zone réticulée (SNr) forme le reste du noyau. Elle reçoit une projection glutamatergique du noyau subthalamique, une projection GABAergique du striatum (striatonigrale) et envoie des projections GABAergiques vers le thalamus, le *colliculus* supérieur et la formation réticulée (Gerfen & Wilson, 1996) (Figure 10 A). Les neurones de la portion réticulée sont en majorité composés de corps cellulaires GABAergiques (Anden & Stock, 1973; Grace & Bunney, 1979). De plus, les dendrites des corps cellulaires dopaminergiques de la zone compacte projettent dans la zone réticulée de la substance noire (Bjorklund & Lindvall, 1984).

Dans les années soixante, il avait déjà été déterminé que la substance noire représente la portion de l'encéphale humain possédant la concentration la plus élevée de substance P (Lembeck & Zetler, 1962; Lembeck & Starke, 1963). Plus précisément, les terminaisons nerveuses marquées à un anticorps fixé la substance P effectuent un contact synaptique avec les dendrites dopaminergiques de la zone compacte (Somogyi *et al.*, 1982; Chang, 1988). La substance P et la neurokinine A de la zone réticulée peuvent donc influencer l'activité des neurones dopaminergiques situés dans la zone compacte du noyau.

D'autre part, des études immunohistochimiques et de lésions électrolytiques du striatum et du *globus pallidus* ont permis de suggérer l'existence d'une voie neuronale contenant la substance P provenant du striatum et projetant dans la zone réticulée de la substance noire (Brownstein *et al.*, 1977; Kanazawa *et al.*, 1977; Ljungdahl *et al.*, 1978b). Cette voie neuronale striatonigrale transporte la substance P en co-localisation avec le neurotransmetteur classique GABA (Jessel, 1978; Arai & Emson, 1986; Christensson-Nylander *et al.*, 1986; Reiner & Anderson, 1990), la neurokinine A (Lee *et al.*, 1986; Lindefors *et al.*, 1986a) et le peptide opiacé dynorphine (Vincent *et al.*, 1982; Christensson-Nylander *et al.*, 1986) alors que la neurokinine B en est absente (Lucas *et al.*, 1992; Marksteiner *et al.*, 1992).



**Figure 11** Représentation schématique identifiant les tachykinines endogènes et leurs récepteurs dans la substance noire. La substance P (SP) et la neurokinine A (NKA) sont co-localisées avec l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) dans les terminaisons nerveuses striatonigrales qui projettent dans la zone réticulée de la substance noire (SNr). Elles font un contact synaptique avec les corps cellulaires GABAergiques, contenant les récepteurs NK<sub>1</sub>, et les dendrites des corps cellulaires dopaminergiques (DA) de la zone compacte (SNc), contenant les récepteurs NK<sub>3</sub>. Les corps cellulaires dopaminergiques de la zone compacte représentent le point d'origine de la voie dopaminergique nigrostriée. Les récepteurs NK<sub>2</sub> sont présents en très faible concentration dans ce noyau.

Ainsi, l'activation *in vitro* (Nicoll, 1980; Lindefors *et al.*, 1985; Humpel & Saria, 1989) et *in vivo* (Lindefors *et al.*, 1989) de ces neurones provoque une libération de substance P et de neurokinine A dans la substance noire et le striatum chez le rat (Nicoll, 1980; Lindefors *et al.*, 1985; Humpel & Saria, 1989). Cet effet est inhibé par un traitement avec le GABA (Jessel, 1977; Torrens *et al.*, 1981; Humpel & Saria, 1989). Bref, en plus de la voie dopaminergique nigrostriée, les tachykinines de la substance noire peuvent également moduler l'activité de projections GABAergiques, notamment les projections nigrothalamocorticales (Figures 10 A et 11).

Des études d'hybridation en solution et *in situ*, d'autoradiographie et d'immunocytochimie ont localisé les récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines en prédominance sur les corps cellulaires dopaminergiques de la zone compacte de la substance noire (Stoessl & Hill, 1990; Stoessl, 1994; Bannon & Whitty, 1995; Whitty *et al.*, 1995; Shughrue *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998) alors que les récepteurs NK<sub>1</sub> des tachykinines se situent en plus grande concentration sur les corps cellulaires GABAergiques de la zone réticulée du même noyau (Sivam & Krause, 1992; Stoessl, 1994; Bannon & Whitty, 1995; Whitty *et al.*, 1995) (Figure 11). Des récepteurs NK<sub>1</sub> sont également retrouvés sur les corps cellulaires dopaminergiques de la zone compacte (Futami *et al.*, 1998). La présence du récepteur NK<sub>2</sub> dans la substance noire reste incertaine bien que l'on ait signalé des niveaux d'ARNm pour ce récepteur dans la substance noire (Bannon & Whitty, 1995; Whitty *et al.*, 1995) et une faible immunoréactivité sur certaines fibres et corps cellulaires de la zone réticulée rostrale de la substance noire (Zerari *et al.*, 1996).

### 1.5.2.1 Études fonctionnelles avec les tachykinines dans la substance noire

Chez le rat, une infusion de substance P dans la substance noire (3 µg dans 1 µl bilatéralement) provoque des comportements stéréotypés caractérisés par des augmentations de locomotion, de toilettage des pattes arrières, de rotations contralatérales et d'exploration (James & Starr, 1977; Kelley *et al.*, 1979; Kelley & Iversen, 1979; Herrera-Marschitz *et al.*, 1986; Hagan *et al.*, 1993). Ces effets comportementaux sont inhibés par une destruction des voies dopaminergiques grâce à un traitement avec la 6-hydroxydopamine (Kelley *et al.*, 1979; Kelley & Iversen, 1979). L'activité comportementale a fait l'objet d'une caractérisation pharmacologique avec l'aide d'agonistes sélectifs des récepteurs des tachykinines. Ainsi, l'administration intranigrale d'un agoniste sélectif des récepteurs NK<sub>1</sub> augmente les épisodes de toilettage des pattes arrières (Stoessl *et al.*, 1995) alors que l'agoniste sélectif des récepteurs NK<sub>3</sub> augmente plutôt la locomotion et les secousses corporelles chez le rat (Stoessl *et al.*, 1993). Ces effets ont été bloqués par un pré-traitement avec des antagonistes respectifs (Stoessl *et al.*, 1993, 1995). D'autre part, les comportements de rotations provoqués par l'agoniste des récepteurs NK<sub>2</sub>, le GR51667, injecté dans la substance noire du rat, sont inhibés par un traitement avec l'antagoniste dopaminergique halopéridol (Elliott *et al.*, 1991; Hagan *et al.*, 1993). En général, ces travaux suggèrent que les effets comportementaux des tachykinines injectés dans la substance noire peuvent être le résultat d'une activation directe (récepteurs NK<sub>3</sub>) ou indirecte (récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub>) de la voie dopaminergique nigrostriée (Kelley *et al.*, 1979; Hagan *et al.*, 1993; Stoessl *et al.*, 1993, 1995).

### 1.5.2.2 Modulation de la voie dopaminergique nigrostriée par les tachykinines

Les sections précédentes ont montré qu'il existe une relation anatomique étroite entre la voie dopaminergique nigrostriée et les tachykinines de la substance noire (Lindfors *et al.*, 1989; Elliott *et al.*, 1991; Overton *et al.*, 1992; Humpel & Saria, 1993; Bannon *et al.*, 1995; Marco *et al.*, 1998). Ces conclusions découlent d'études pharmacologiques rapportant qu'un traitement avec certains antagonistes dopaminergiques, injectés dans le striatum provoque une diminution des niveaux de substance P, de neurokinine A et de l'expression de leurs ARNm dans cette même région (Hong *et al.*, 1978; Hanson *et al.*, 1981; Scott Young III *et al.*, 1986; Bannon *et al.*, 1987; Sivam *et al.*, 1987; Cruz & Beckstead, 1989; Salin *et al.*, 1996). Inversement, l'administration intra-striatale d'un inhibiteur de la re-capture de la dopamine (GBR-12909) fait augmenter les niveaux de substance P, de neurokinine A et de dynorphine dans le striatum et la substance noire chez le rat (Sivam, 1996). L'ensemble de ces études met en évidence un mécanisme régulateur dopaminergique qui active la projection SPergique striatonigrale via l'activation du récepteur D<sub>1</sub> du striatum (Gerfen, 1992). La voie dopaminergique nigrostriée peut également inhiber la voie enképhalinergique striatopallidale via l'activation du récepteur D<sub>2</sub> de la dopamine (Figure 10 A) (Gerfen, 1992). L'application de substance P exogène sur des tranches de substance noire de rat augmente la libération nigrale de dopamine (Reubi *et al.*, 1978; Nicoll, 1980). On observe le même résultat avec l'application du senktide et du [MePhe<sup>7</sup>]-NKB, deux agonistes

sélectifs des récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines, dans des tranches de mésencéphale chez la gerboise (Alonso *et al.*, 1996). Ces derniers effets (libération nigrale de dopamine) ont été bloqués par un traitement avec l'antagoniste des récepteurs NK<sub>3</sub>, mais non avec des antagonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> des tachykinines (Alonso *et al.*, 1996).

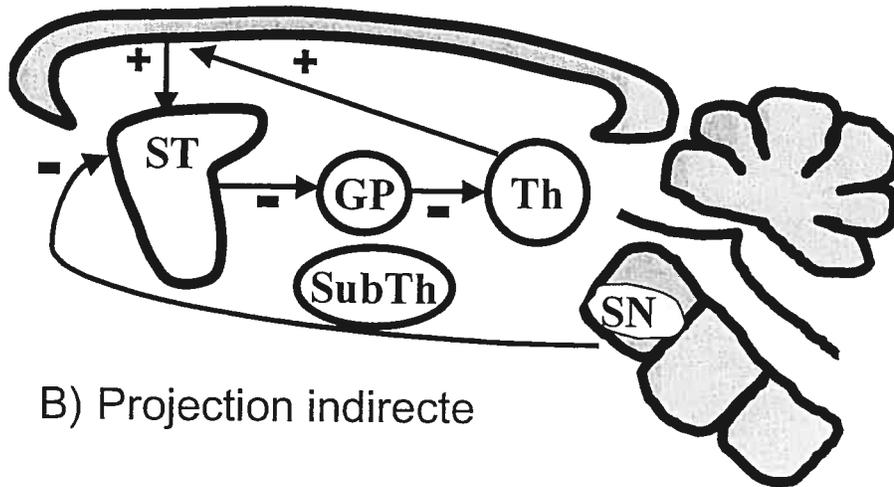
Quelques approches utilisant des techniques de microdialyse, d'autoradiographie et d'hybridation *in situ* supportent ce concept de modulation dopaminergique par les tachykinines puisqu'on a mesuré une plus grande concentration de dopamine dans le striatum suite à une injection intranigrale de substance P et de neurokinine A (Baruch *et al.*, 1988; Reid *et al.*, 1990; Hokfelt *et al.*, 1991) ou d'agonistes sélectifs des récepteurs NK<sub>1</sub> ([Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP, Humpel *et al.*, 1991; Humpel & Saria, 1993) et NK<sub>3</sub> des tachykinines (senktide) (Humpel *et al.*, 1991; Humpel & Saria, 1993; Bannon *et al.*, 1995; Marco *et al.*, 1998). Les effets observés avec le senktide sont bloqués par un traitement avec l'antagoniste sélectif des récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines, le SR 142801 chez le cobaye (Marco *et al.*, 1998). Aussi, l'injection i.p., chez le cobaye, du SR 142801 prévient la libération de dopamine striatale induite par l'injection i.p. d'un antagoniste dopaminergique, l'halopéridol (Gueudet *et al.*, 1999). Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux d'électrophysiologie qui ont démontré que le senktide active de façon prédominante les cellules dopaminergiques de la zone compacte de la substance noire à l'opposé de la substance P qui active plutôt les cellules non-dopaminergiques de la même portion du noyau (Nalivaiko *et al.*, 1997).

En résumé, on suggère un modèle où les projections GABAergiques striatonigrales modulent l'activité de la voie dopaminergique nigrostriée tandis que l'expression des gènes de la substance P et de la neurokinine A dans le striatum est modulée à son tour par la voie dopaminergique nigrostriée (Helke *et al.*, 1990). Le concept proposé fonctionne par des boucles de rétroaction qui modulent, entre autres, la libération des tachykinines et de la dopamine dans le réseau. On suggère que les tachykinines représentent la composante "positive" de cette boucle alors que le GABA et la dynorphine, la composante "négative". Les liens anatomiques reliant la substance noire, le striatum, le thalamus, le cortex moteur et les autres noyaux des ganglions de la base peuvent se diviser en deux : la projection directe substance noire-striatum avec répercussion sur la voie striato-pallidale et pallido-thalamique ; la projection indirecte striato-pallidale, pallido-subthalamique puis subthalamo-nigrale (Figure 13). On observe un profond dérèglement de ces voies neuronales chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (Figure 14) (Gerfen & Wilson, 1996).

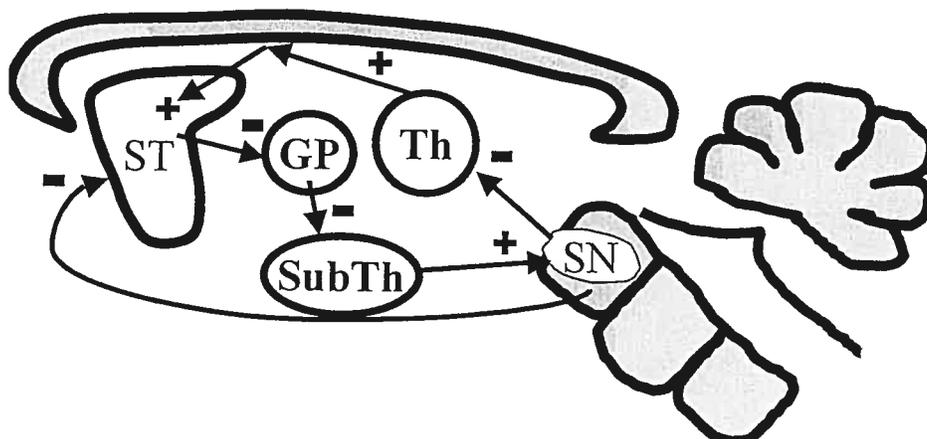
### 1.5.2.3 La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est associée à une dégénérescence de la voie dopaminergique nigrostriée. L'absence de cette projection entraîne une perturbation importante des boucles excitatrices et inhibitrices des ganglions de la base. Le thalamus devient alors totalement désynchronisé, et désynchronise ainsi le cortex moteur ce qui se traduit par une bradykinésie (lenteur dans l'exécution des mouvements), dyskinésie (mouvements involontaires) ou akynésie (difficulté à initier un mouvement) (Kandel & Schwartz, 1991; Gerfen & Wilson, 1996). Cette projection nigrostriée se présente donc au centre d'un complexe neuronal ayant un rôle primordial dans la coordination de séquences

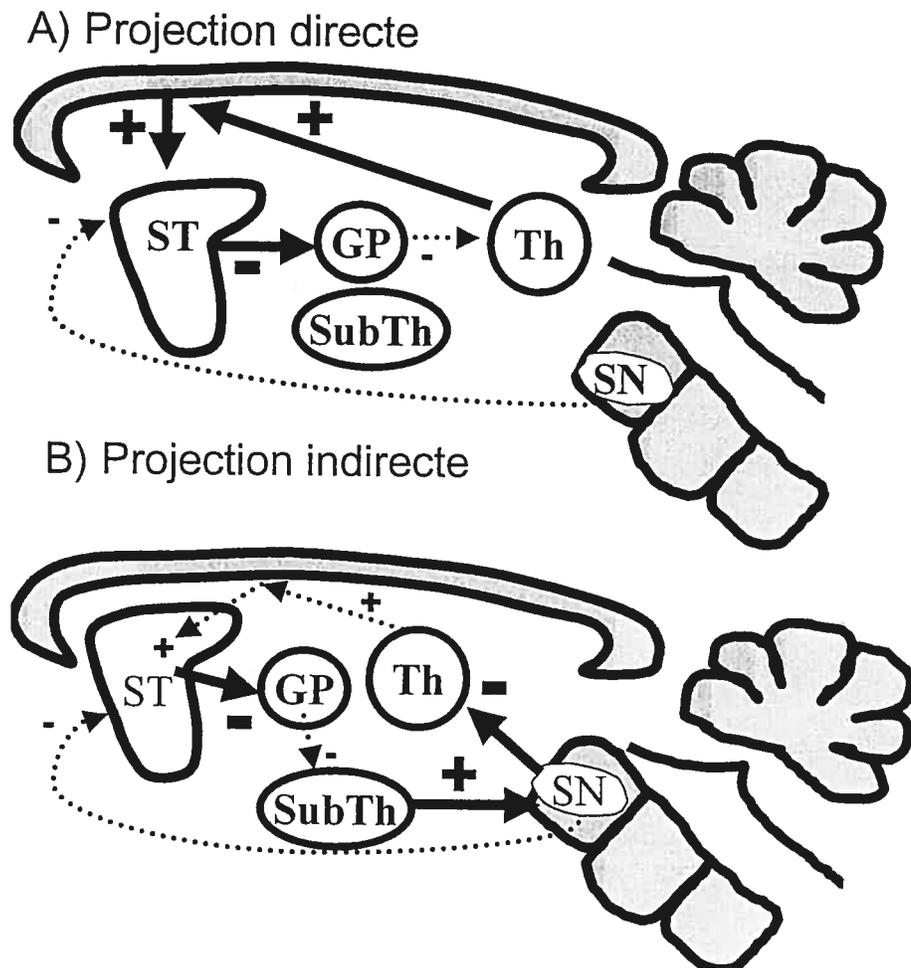
## A) Projection directe



## B) Projection indirecte



**Figure 12** Principales projections thalamo-corticales. A) boucle directe nigro-striato-pallido-thalamo-corticale. B) boucle de rétroaction indirecte nigro-striato-pallido-subthalamo-nigro-thalamo-corticale. GP, globus pallidus ; SN, substance noire ; ST, striatum ; Sub Th, noyau subthalamique ; Th, thalamus.



**Figure 13** Altérations des boucles de rétroaction A) directe nigro-striato-pallido-thalamo-corticale et B) indirecte nigro-striato-pallido-subthalamo-nigro-thalamo-corticale suggérées dans la maladie de Parkinson. GP, globus pallidus ; SN, substance noire ; ST, striatum ; Sub Th, noyau subthalamique ; Th, thalamus.

motrices précises. Or, cette même voie nigrostriée est modulée par les tachykinines et leurs récepteurs. Il a été postulé qu'un mauvais fonctionnement des tachykinines au niveau de la substance noire pourrait être impliqué dans cette grave maladie (Mauborgne *et al.*, 1983; Helke *et al.*, 1990; Wade & Schneider, 2001; Yu *et al.*, 2002).

En parallèle avec la diminution des taux de dopamine dans le cerveau, on a rapporté un déficit important dans les taux cérébraux de substance P (substance noire, striatum, cortex) chez les patients souffrants de la maladie de Parkinson (Mauborgne *et al.*, 1983; Tenovuo *et al.*, 1984; Clevens & Beal, 1989) et de d'autres maladies dégénératives tels que l'Alzheimer (Beal & Mazurek, 1987; Bouras *et al.*, 1990; Quigley & Kowall, 1991) et la Chorée d'Huntington, une maladie également associée à une dysfonction dopaminergique (Otsuka & Yoshioka, 1993; Richfield *et al.*, 2002). Une relation a été suggérée entre la diminution de la synthèse de substance P et de neurokinine A dans les ganglions de la base et les symptômes d'akinésie chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (Helke *et al.*, 1990; Wade & Schneider, 2001). Cette hypothèse concorde avec le rôle connu des tachykinines qui activent la voie dopaminergique nigrostriée (Baruch *et al.*, 1988; Reid *et al.*, 1990; Humpel *et al.*, 1991; Humpel & Saria, 1993; Bannon *et al.*, 1995; Marco *et al.*, 1998).

#### 1.5.2.4 La substance noire : rôle potentiel dans la régulation centrale des fonctions cardiovasculaires

Bien que l'implication de la substance noire dans la régulation centrale des fonctions motrices soit traditionnellement reconnue, son rôle au niveau des fonctions cardiovasculaires demeure peu étudié. Même aujourd'hui, on ignore presque tout des interactions neuronales potentielles entre la substance noire et d'autres noyaux pourvus d'un rôle cardiovasculaire. Toutefois, on mentionne l'existence d'une projection neuronale du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus à la substance noire (Swanson & Sawchenko, 1980, 1983). De plus, une étude immunocytochimique a démontré que les neurones dopaminergiques de la substance noire reçoivent une projection adrénérgique de la médulla rostro-ventrolatérale (Nagatsu *et al.*, 1998). Néanmoins, quelques travaux ont associé la substance noire aux mécanismes centraux des baroréflexes et au développement de l'hypertension artérielle. Ainsi, une activation électrique ou chimique (par injection de glutamate et d'acide kainique) de la substance noire augmente la pression artérielle et la fréquence cardiaque chez le rat anesthésié (Lin & Yang, 1994) et le chat éveillé ou anesthésié (Ángyán, 1989). Ces effets sont accompagnés d'une augmentation des niveaux de dopamine dans le striatum, suggérant ainsi l'implication de la voie dopaminergique nigrostriée dans ces réponses cardiovasculaires. Par contre, une autre étude utilisant la même approche chez le rat anesthésié a montré une diminution de pression artérielle et de fréquence cardiaque suite à une stimulation chimique (glutamate) de la substance noire (Kirouac & Ciriello, 1997). On explique ces effets contradictoires par l'utilisation d'une concentration et d'un volume d'injection de glutamate largement inférieurs dans la

dernière étude, diminuant ainsi la diffusion de l'agoniste vers des régions situées à l'extérieur du noyau visé. De plus, l'activation chimique d'un noyau s'avère une approche plus avantageuse qu'une activation électrique qui provoque aussi l'activation des fibres de passage. Les changements opposés de ces effets peuvent également s'expliquer par l'utilisation de différents agents anesthésiques (uréthane versus  $\alpha$ -chloralose). Par exemple, l'activation électrique du septum chez le rat provoque des réponses cardiovasculaires diamétralement opposées selon l'agent anesthésique utilisé, en l'occurrence l'uréthane et l' $\alpha$ -chloralose (Calaresu & Mogenson, 1972). C'est pourquoi une approche favorisant l'utilisation d'animaux éveillés et non immobilisés s'avère très avantageuse dans les études physiologique et pharmacologique des fonctions autonomiques centrales.

D'autre part, on a démontré qu'une destruction des barorécepteurs artériels provoque une diminution des niveaux de dopamine striatale et de l'activité de la tyrosine hydroxylase dans le striatum (Alexander *et al.*, 1984, 1988). Aussi, les rats ayant subi une dénervation de la voie dopaminergique nigrostriée présentent une instabilité au niveau des baroréflexes (Alexander *et al.*, 1986). Parallèlement à ces démarches, il a été démontré qu'une lésion de la substance noire, chez le rat normotendu, provoque une diminution du réflexe de bradycardie alors qu'une stimulation de ce noyau augmente le réflexe de bradycardie (Lin *et al.*, 1982).

De façon intéressante, on a montré, par une étude de liaison en autoradiographie, que les rats spontanément hypertendus (SHR) de 5 et 15 semaines possèdent une densité accrue des récepteurs dopaminergiques  $D_1$  et  $D_2$  dans le striatum comparativement aux témoins WKY du même âge (Kirouac & Ganguly, 1993). Il est suggéré ainsi que les

récepteurs dopaminergiques du striatum puissent être reliés au développement et au maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR. Les auteurs proposent que les SHR présentent une activation accrue de la voie dopaminergique nigrostriée. En conséquence, le nombre de récepteurs dopaminergiques en position pré-synaptique augmenterait dans le but de diminuer cet excès d'activité d'origine dopaminergique (Kirouac & Ganguly, 1993).

Tel que mentionné dans la section 1.0.1 de l'Introduction générale, une dégénération de la voie dopaminergique nigrostriée atténue l'hypertension des jeunes rats spontanément hypertendus (van den Buuse *et al.*, 1986, 1991; Linthorst *et al.*, 1994) et certains patients atteints de la maladie de Parkinson présentent également des hypotensions orthostatiques et post-prandiales (Barbeau *et al.*, 1969; Micieli *et al.*, 1987). Ainsi, la substance noire et sa voie dopaminergique nigrostriée semblent détenir un pouvoir hypertenseur chez le rat et l'humain. Or, bien que pertinentes, ces observations ne suffisent pas à associer définitivement ce système neuronal au développement ou au maintien de l'hypertension artérielle. Néanmoins, elles se révèlent pour nous assez intéressantes pour poursuivre des études dans cette direction.

### 1.5.3 L'aire tegmentale ventrale

L'aire tegmentale ventrale (ATV) constitue une portion importante du système extrapyramidal des ganglions de la base. Dans cette région origine plusieurs voies dopaminergiques que l'on nomme voies dopaminergiques mésocorticales-mésolimbiques. Ces voies effectuent des projections dans le noyau accumbens du striatum, dans le cortex pré-frontal et dans le système limbique incluant le septum et l'amygdale (Otsuka & Yoshioka, 1993). Telle la substance noire, l'ATV contient des tachykinines endogènes (substance P, neurokinine A) et les récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> des tachykinines (Dam *et al.*, 1990; Stoessl & Hill, 1990; Shughrue *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998). L'étude fonctionnelle de l'ATV s'est plutôt effectuée en relation avec l'activité comportementale puisque les voies dopaminergiques mésocorticales-mésolimbiques qui proviennent de l'ATV sont reliées à la régulation des voies motrices du système nerveux central (Kandel & Schwartz, 1991). Ainsi, l'injection de la substance P, de la neurokinine A et de l'analogue de la substance P (DiMe-C7 : [pGlu<sup>6</sup>, MePhe<sup>8</sup>, Sar<sup>9</sup>]-SP(5-11)) dans l'ATV du rat provoque une augmentation des épisodes de secousse corporelle, d'exploration et de locomotion (Elliott & Iversen, 1986). L'ATV libère la substance P et on a rapporté que les niveaux de ce neuropeptide sont diminués après un stimulus douloureux à une patte (par un choc électrique) chez le rat. Cependant, les niveaux de neurokinine A ne sont pas altérés par cette manipulation (Bannon *et al.*, 1986). On a ainsi émis l'hypothèse que les taux de substance P diminuent suite à sa libération dans l'ATV en condition de stress (Bannon *et al.*, 1986).

Il est intéressant de noter que des conditions de stress activent les voies dopaminergiques A10 dont l'origine se situe dans l'ATV sans affecter la voie A9 qui origine de la substance noire (Bannon & Roth, 1983; Bannon *et al.*, 1986). Or, les tachykinines de l'ATV modulent l'activité de la voie dopaminergique A10 puisque les niveaux de dopamine observés dans le noyau accumbens et dans le cortex préfrontal augmentent suite à l'injection, dans l'ATV, d'un agoniste sélectif des récepteurs NK<sub>3</sub> (senktide) chez le cobaye anesthésié (Marco *et al.*, 1998). Ces effets sont complètement inhibés par l'addition d'un antagoniste sélectif des récepteurs NK<sub>3</sub>, le SR 142801 (Marco *et al.*, 1998). De plus, l'addition de senktide ou de neurokinine B sur des tranches d'ATV de rat provoque une augmentation locale de la concentration de dopamine (Seabrook *et al.*, 1995).

### 1.5.3.1 La schizophrénie

Une hyperactivité de la voie dopaminergique mésocorticale-mésolimbique qui origine de l'ATV fait partie intégrante des mécanismes impliqués dans la schizophrénie. Les fibres immunoréactives à la substance P effectuent un contact synaptique direct avec les neurones dopaminergiques de l'ATV (Tamiya *et al.*, 1990). Chez le rat, des comportements de catalepsie ont été observés suite à une administration sous-cutanée d'antagonistes dopaminergiques (Anderson *et al.*, 1995). Ces effets ont été atténués par une injection (sous-cutanée) préalable du CP-99,994, un antagoniste sélectif des récepteurs NK<sub>1</sub> des tachykinines (Anderson *et al.*, 1995). Ce comportement caractérisé par une immobilité et une posture anormale est associé à un mauvais fonctionnement du système extrapyramidal et aux effets secondaires des anti-psychotiques chez l'humain (Hornykiewicz, 1973). D'autre part, on a observé une augmentation significative de

récepteurs NK<sub>1</sub> dans plusieurs régions du cortex pré-frontal des patients atteints de schizophrénie (Tooney *et al.*, 2001). Les antagonistes des tachykinines pourraient donc représenter une avenue intéressante dans la recherche fondamentale de nouveaux traitements contre les effets secondaires des anti-psychotiques.

### **1.5.3.2 Implication de l'ATV dans la régulation centrale des fonctions cardiovasculaires**

Quoique très peu étudié, quelques travaux ont suggéré un rôle potentiel de l'ATV dans la régulation centrale des fonctions cardiovasculaires. Ainsi, une stimulation électrique et chimique de l'ATV provoque une diminution de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque chez le rat anesthésié (Kirouac & Ciriello, 1997). Par contre, on observe un effet totalement opposé (augmentation de pression artérielle) chez le lapin (Tan *et al.*, 1983) et le rat éveillé (Cornish & van den Buuse, 1994; van den Buuse, 1998). D'autre part, l'injection d'un analogue de la substance P, le DiMe-C7 ([pGlu<sup>6</sup>, MePhe<sup>8</sup>, Sar<sup>9</sup>]-SP(5-11)), dans l'ATV fait plutôt augmenter la pression artérielle et la fréquence cardiaque chez le rat (Cornish & van den Buuse, 1994, 1995; van den Buuse, 1998). Ces effets cardiovasculaires ont été bloqués par un pré-traitement i.v. avec les antagonistes sélectifs aux récepteurs D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> de la dopamine et V<sub>1</sub> de la vasopressine. Les auteurs ont proposé que l'effet presseur du DiMe-C7 administré dans l'ATV est relayé par une libération systémique de vasopressine et par une activation centrale des voies dopaminergiques mésocorticales-mésolimbiques (Cornish & van den Buuse, 1995).

## 1.6 La région périaqueductale grise: réponses comportementales d'agressivité

La région périaqueductale grise est associée aux comportements d'agressivité et de réaction de défense face à un danger chez le rat. Ainsi, son activation par microinjection d'acides aminés excitateurs provoque une réaction de défense comportementale, somatique et viscéromotrice complète caractérisée par des augmentations du rythme respiratoire, de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque, une vasoconstriction des lits vasculaires rénaux et une vasodilatation des lits vasculaires des muscles squelettiques des membres inférieurs (Hilton & Redfern, 1986). Différents stimuli de stress aigu tels un choc électrique à une patte et une immobilisation font augmenter les concentrations de substance P dans cette région (Rosén *et al.*, 1992). Bien qu'une densité très élevée de substance P et du récepteur NK<sub>1</sub> ait été observée dans cette région (Dam *et al.*, 1990), leur rôle dans la réponse cardiovasculaire suite à un stimulus douloureux n'a pas encore été élucidé.

## 1.7 L'amygdale, site central du stress émotionnel

Avec plusieurs noyaux de l'hypothalamus (dont le noyau paraventriculaire), le *locus coeruleus*, le noyau parabrachial et la région périaqueductale grise, l'amygdale est impliquée dans les réponses cardiovasculaires induites par des stimuli de stress, d'émotion intense et de défense (Smith *et al.*, 1980; Galeno *et al.*, 1984; Levine *et al.*, 1990; Bandler & Shipley, 1994; Davis *et al.*, 1994). Une lésion bilatérale du noyau central de l'amygdale provoque une inhibition de l'hypertension artérielle chez le SHR (Galeno *et al.*, 1982). Il est plus particulièrement suggéré que l'amygdale participe aux mécanismes centraux de

l'hypertension artérielle causée par un stress émotionnel prolongé (Wu *et al.*, 1999). Or, cette même région possède des fibres neuronales contenant la substance P et son récepteur NK<sub>1</sub> (Ljungdahl *et al.*, 1978a). Une administration locale de substance P dans l'amygdale centrale provoque une augmentation de pression artérielle (Schneider *et al.*, 1986). Les tachykinines de l'amygdale représentent donc une cible intéressante dans l'étude des mécanismes centraux impliqués dans l'hypertension artérielle.

## **1.8 Implication des tachykinines dans d'autres pathologies d'origine centrale**

On a attribué aux tachykinines une telle diversité de fonctions physiologiques et pathologiques qu'il est difficile de ne pas se sentir envahi par tant d'informations. Dans cette avant-dernière partie de l'Introduction, je vais brièvement discuter de chaque pathologie d'origine centrale qui a été associée à un mauvais fonctionnement des systèmes de neuromodulation dirigés par les tachykinines.

### **1.8.1 L'anxiété et la dépression**

Plusieurs évidences pharmacologiques ont associé les tachykinines à la dépression et aux troubles anxieux. En effet, à l'aide de modèles expérimentaux d'anxiété chez la souris et le primate, un effet anxiolytique a été démontré suite à des traitements avec deux antagonistes sélectifs des récepteurs NK<sub>2</sub> des tachykinines, le SR 48968 et le GR 159897 (Stratton *et al.*, 1993; Walsh *et al.*, 1995). Le récepteur NK<sub>1</sub> pourrait également jouer un rôle dans cette pathologie puisque l'injection i.c.v. d'agonistes (substance P, GR73632) et d'antagonistes (FK 888, CP 96345, NKP608) pour ce récepteur provoque respectivement un effet anxiogène et anxiolytique chez la souris (Zernig *et al.*, 1992; Teixeira *et al.*,

1996), le cobaye (Rupniak *et al.*, 2000) et le rat (Vassout *et al.*, 2000; Gavioli *et al.*, 2002). Ces résultats ont été reproduits chez l'humain où l'antagoniste NK<sub>1</sub>, le MK-869 a montré des effets anxiolytiques et antidépresseurs (Kramer, 2000; Rupniak, 2002).

### 1.8.2 Le sevrage aux opiacés

Une relation étroite a été établie entre les tachykinines et les peptides opiacés puisque les effets cardiovasculaires de la substance P injectée par voie i.c.v. chez le rat éveillé sont atténués par une injection préalable de morphine (Itoi *et al.*, 1994b) et ils sont accentués par un antagoniste des opiacés (naloxone) (Petty & Read, 1982). On suggère ainsi que les peptides opiacés centraux inhibent les voies neuronales qui augmentent l'activité du tonus sympatho-surrénalien et qui sont activées par la substance P (Petty & Read, 1982; Itoi *et al.*, 1994b). On connaît depuis un certain temps l'influence inhibitrice pré-synaptique de la morphine sur la libération de substance P provoquée par l'injection *in vitro* de potassium dans des tranches de moelle épinière et d'hypothalamus chez le rat (Jessel, 1977; Micevych *et al.*, 1984). À l'instar des tachykinines, les peptides opiacés et leurs récepteurs ont été identifiés dans plusieurs noyaux de l'hypothalamus dont celui du noyau paraventriculaire (Sar *et al.*, 1978; Rossier *et al.*, 1979; Goodman *et al.*, 1980; Sawchenko *et al.*, 1982a, 1982b; Mansour *et al.*, 1995). À l'instar des tachykinines (voir section 1.3 Hypothalamus), l'influence cardiovasculaire des opiacés endogènes du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus est perturbée par un traitement intra-veineux avec un antagoniste des récepteurs V<sub>1</sub> de la vasopressine (Lessard & Bachelard, 2002).

Dans des modèles expérimentaux, on peut reproduire les symptômes de sevrage aux opiacés que l'on observe chez l'humain. En effet, une administration aiguë de

naloxone, un antagoniste spécifique mais non sélectif des récepteurs opiacés, chez le rat, le cobaye ou la souris traités de façon chronique à la morphine provoque une série de comportements stéréotypés. Ceux-ci sont caractérisés par une agitation générale, une augmentation de locomotion, d'exploration, de secousses corporelles, de frémissements, par des défécations et des grincement de dents (Marshall & Buccafusco, 1985a,b; Brent *et al.*, 1987; Chahl & Thornton, 1987; Buccafusco & Shuster, 1997), accompagnés d'augmentations de pression artérielle et de fréquence cardiaque (Marshall & Buccafusco, 1985b). Ces effets comportementaux observés suite à un retrait des opiacés sont associés à une augmentation de la libération de substance P dans l'hypothalamus, le striatum, l'aire tegmentale ventrale et le bulbe rachidien des rats (Bergstrom *et al.*, 1984; Zhou *et al.*, 1998).

Chez le rat, une atténuation des symptômes de sevrage à la morphine a été observée suite à l'administration i.c.v. d'un antagoniste sélectif aux récepteurs NK<sub>1</sub> des tachykinines, le RP 67580 (Maldonado *et al.*, 1993).

### 1.8.3 La migraine

La migraine est caractérisée par la survenue récurrente de "céphalées" (maux de têtes) souvent accompagnées de nausées, vomissements, intolérance à la lumière et au bruit, irritabilité, troubles de la vision, vertiges, troubles mnésiques, hypotension et pâleur (Capobianco *et al.*, 1996). Bien que mal comprise, on associe cette affection à une inflammation vasculaire d'origine cérébrale. Étant donné leur rôle prépondérant dans les mécanismes d'inflammation neurogénique, les tachykinines, en particulier la substance P et son récepteur NK<sub>1</sub> sur les vaisseaux cérébraux ont été soupçonnés de participer aux

mécanismes de la migraine. De plus, les sinus veineux et les vaisseaux de la dure mère, potentiellement impliqués dans la migraine, reçoivent des fibres immunoréactives à la substance P (Edvinsson & Uddman, 1981; Edvinsson *et al.*, 1983; Suzuki *et al.*, 1989). Des antagonistes sélectifs aux récepteurs NK<sub>1</sub> ont donc été évalués pour combattre la migraine. Les résultats cliniques ont cependant été décevants (Elliott & Seward, 1997; Goldstein *et al.*, 1997; Longmore *et al.*, 1997; May & Goadsby, 2001). En effet, lors d'une étude clinique, un antagoniste hautement sélectif aux récepteurs NK<sub>1</sub> (lanepitant ou LY 303870 : (R)-1-[N-(2-methoxybenzyl)acetylamino]-3-(1*H*-indol-3-yl)-2-[N-(2-(4-(piperidin-1-yl)acetyl)amino]-propane) a été administré par voie orale à plusieurs doses et n'a pas montré d'effets significatifs sur la diminution de l'intensité de la douleur causée par la migraine (Goldstein *et al.*, 1997). On pourrait expliquer cet échec par le choix de la voie d'administration (oral) qui pourrait diminuer la biodisponibilité de l'agent. Cependant, on ne peut exclure la possibilité que l'hypothèse d'une inflammation neurogénique par les tachykinines ou par d'autres médiateurs pro-inflammatoires ne s'applique pas à la migraine.

#### 1.8.4 Les mécanismes centraux du vomissement

Les neurones immunoréactifs à la SP font synapse avec les corps cellulaires des neurones catécholaminergiques du NTS et de l'*area postrema*, deux régions cérébrales impliquées dans les mécanismes de la nausée et du vomissement (Ljungdahl *et al.*, 1978a; Pickel *et al.*, 1979). De plus, l'injection de SP dans ces deux régions causent le vomissement chez le chien et le furet (Carpenter *et al.*, 1984; Knox *et al.*, 1993). Aussi, les récepteurs NK<sub>1</sub> des tachykinines ont été identifiés dans le NTS et le noyau moteur dorsal du nerf vague impliqués dans les mécanismes centraux du vomissement (Helke *et al.*,

1984; Yamazoe *et al.*, 1984). Or, une administration d'un antagoniste sélectif des récepteurs NK<sub>1</sub> des tachykinines, le CP 99994, dans l'*area postrema* ou par voie i.v. diminue de façon significative les épisodes de vomissement chez le furet (Bountra *et al.*, 1993; Tattersall *et al.*, 1993; Ariumi *et al.*, 2000). En clinique, on a rapporté une diminution partielle du vomissement causé par un traitement anti-cancéreux (thérapie cisplatine), suite à l'ingestion orale d'antagonistes des récepteurs NK<sub>1</sub> des tachykinines (GR-205171, CP 122721, CJ-11974, MK869) (Kris *et al.*, 1996; Diemunsch & Grelot, 2000; Gesztes *et al.*, 2000; Hesketh, 2001). Ces antagonistes représentent donc une piste intéressante dans le traitement des effets secondaires nuisibles de certains médicaments.

### 1.8.5 L'épilepsie

L'épilepsie est un état clinique qui correspond à une excitation transitoire de toute une population de cellules nerveuses qui déchargent ensemble (Domart & Bourneuf, 1989). En situations clinique et expérimentale, il est suggéré que les cellules de l'hippocampe, étroitement associées au phénomène des "crises d'épilepsie", possèdent le gène préprotachykinine-A responsable de la synthèse de la substance P. Ces neurones diminuent l'excitation des afférences corticales en situation normale (Sloviter, 1994). Or, une diminution de fibres exprimant la substance P a été rapportée dans l'hippocampe de patients souffrants d'épilepsie (Sloviter, 1987, 1994; de Lanerolle *et al.*, 1992). Ces diminutions concordent donc avec une incapacité de réduire l'excitabilité des cellules de l'hippocampe dans les crises épileptiques. Cependant, une autre étude a plutôt rapporté une augmentation de l'expression de la substance P et de l'ARNmessenger de son précurseur, PPT-A, dans l'hippocampe des rats atteints d'épilepsie de type *Status Epilepticus* (pathologie provoquée de façon chimique par l'administration de lithium et de

pilocarpine. Ce traitement provoque une hyperexcitabilité des récepteurs glutamatergiques) (Liu *et al.*, 1999, 2000). De plus, l'injection de substance P dans l'hippocampe des rats *Status Epilepticus* augmente la durée des crises épileptiques provoquées par un courant électrique local. Cet effet amplificateur est bloqué par une co-injection de deux antagonistes NK<sub>1</sub> : spantide II et RP 67580 (Liu *et al.*, 1999). Le modèle expérimental pourrait expliquer ces divergences.

### **1.8.6 Rôle potentiel des tachykinines centrales dans l'hypertension artérielle**

La remarquable complexité des mécanismes impliqués dans l'hypertension artérielle a été revue brièvement dans l'avant-propos de l'Introduction Générale. Dans cette section, je me limiterai aux implications potentielles des tachykinines et de leurs récepteurs dans cette anomalie. Chez les patients atteints d'hypertension essentielle, les taux plasmatiques de substance P se révèlent moins élevés que chez les sujets normotendus (Faulhaber *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1991). Les mêmes résultats ont été obtenus chez le SHR comparativement aux rats WKY (Chen *et al.*, 1991). Parallèlement à ces résultats, une augmentation des récepteurs NK<sub>1</sub> des tachykinines a été observée dans les ganglions sympathiques supérieurs des SHR en comparaison aux rats WKY (Schoborg *et al.*, 2000). On suggère ainsi que : 1) le manque de substance P en périphérie peut contribuer au développement ou au maintien de l'hypertension puisque ces tachykinines en périphérie sont de puissants agents vasodilatateurs ; 2) l'augmentation des récepteurs

NK<sub>1</sub> des tachykinines dans les ganglions sympathiques pourrait contribuer à l'augmentation de l'activité sympathique chez le SHR.

D'autre part, les sites de liaison à la substance P dans la médulla ventrolatérale sont significativement augmentés chez le SHR comparativement aux rats WKY (Nakamura & Hayashi, 1984; Shigematsu *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1991). La voie SPergique bulbo-spinale module l'activité des fibres pré-ganglionnaires sympathiques, lesquelles sont reconnues pour être suractivées dans l'hypertension artérielle (Chen *et al.*, 1991). Il n'est donc pas impossible que les tachykinines du bulbe rachidien, surtout la substance P, soient libérées de façon tonique chez le SHR pour maintenir un tonus sympathique élevé par une stimulation continue des fibres pré-ganglionnaires sympathiques dans la région intermédiolatérale de la moelle épinière.

#### **1.8.6.1 L'héritage scientifique de la clonidine**

Au cours de la première moitié du vingtième siècle, le traitement à la clonidine (catapress) était largement répandu pour traiter l'hypertension artérielle. Cet agent pharmacologique active les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques du cerveau (Buccafusco & Spector, 1980b). On a longtemps cru que l'effet anti-hypertenseur de la clonidine était relayé au système catécholaminergique central tout en étant conscient que les nombreux effets secondaires du traitement (sédation, bouche sèche, dépression, analgésie, constipation) constituent un indice d'activité non spécifique anti-cholinergique de la drogue. Toutefois, les catécholamines centrales ne sont pas impliquées dans la réduction de l'activité sympathique et de l'effet anti-hypertenseur de la clonidine (Haeusler, 1974; Reynoldson *et al.*, 1979). En effet, on croit plutôt que l'activité accrue des nerfs

sympathiques et l'hypertension qui en découle est dépendante de l'activité des voies cholinergiques centrales (Buccafusco & Spector, 1980b). Ainsi, un pré-traitement à la clonidine (i.v.) inhibe l'augmentation de pression artérielle causée par l'injection i.v. de physostigmine, un inhibiteur de la cholinestérase (enzyme qui inactive l'acétylcholine) actif au niveau central (Buccafusco *et al.*, 1980a). De plus, l'addition de clonidine provoque une diminution des taux d'acétylcholine dans plusieurs régions du cerveau de rat dont l'hypothalamus (69%), le bulbe rachidien-protubérance annuaire (43%) et le mésencéphale (39%) mais n'affecte pas les niveaux d'acétylcholine dans le striatum et l'hippocampe (Buccafusco *et al.*, 1980a). Les régions où l'on observe ces diminutions des taux d'acétylcholine sont comparables à la distribution du ligand  $^3\text{H}$ -clonidine : hypothalamus >> mésencéphale > bulbe rachidien-protubérance annuaire > hippocampe > striatum (U'Prichard *et al.*, 1977). Ces derniers sites de liaison ne sont pas situés sur des terminaisons nerveuses de type monoamine puisqu'un traitement à la 6-hydroxydopamine n'a pas affecté la distribution de la  $^3\text{H}$ -clonidine (U'Prichard *et al.*, 1977). On croit plutôt que les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, situés sur des neurones cholinergiques (possiblement en pré-synaptique), seraient responsables de l'effet anti-hypertenseur de la clonidine (Buccafusco *et al.*, 1980a).

Ainsi, les voies cholinergiques centrales semblent être impliquées dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR. À l'instar des tachykinines, l'augmentation de pression artérielle observée suite à une stimulation cholinergique est accrue chez le SHR comparativement à leur témoin normotendu (Buccafusco & Spector, 1980b). De plus, une réponse anti-hypertensive et une bradycardie ont été observées chez le SHR suite à une inhibition des voies centrales cholinergiques par injection i.c.v (mais non i.v.)

d'hémicholinium qui n'affecte pas la pression artérielle chez le WKY (Brezenoff & Caputi, 1980; Buccafusco & Spector, 1980b). La substance P augmente la libération d'acétylcholine dans les terminaisons nerveuses périphériques (Wali, 1985) et centrales (Malthe-Sphirensen *et al.*, 1978; Klugman *et al.*, 1980); notamment au niveau des interneurons cholinergiques du striatum où les trois récepteurs des tachykinines sont impliqués (Arenas *et al.*, 1991). De plus, les effets cardiovasculaires de la substance P injectée dans l'hypothalamus ou les ventricules cérébraux latéraux sont inhibés par un traitement (i.c.v. ou intra-hypothalamique) avec plusieurs antagonistes de l'acétylcholine dont l'atropine (Klugman *et al.*, 1980; Trulson & Himmel, 1985; Tomlinson *et al.*, 1990) et l'hémicholinium-3 à une dose suffisante pour détruire les voies cholinergiques du cerveau (Trimarchi *et al.*, 1986), et aussi par un traitement avec la clonidine (Petty & Reid, 1982). La réponse cardiovasculaire de la substance P semble donc nécessiter la présence de voies cholinergiques intactes. À l'instar des tachykinines, les voies cholinergiques centrales feraient partie intégrante des mécanismes de réaction de défense cardiovasculaire et comportementale suite à un stress environnemental (Buccafusco & Brezenoff, 1979; Brezenoff & Caputi, 1980). D'autre part, une provocation de cette réaction de défense par une stimulation électrique dans l'hypothalamus ou par un stimulus environnemental amène l'apparition de l'hypertension chez le rat (Folkow & Rubinstein, 1966; Perhach *et al.*, 1975).

On peut donc émettre l'hypothèse que les tachykinines du système nerveux central libèrent l'acétylcholine dans un ou plusieurs noyaux centraux de façon tonique pour maintenir une pression artérielle élevée chez le SHR. Ainsi, l'addition d'un antagoniste des tachykinines dans le cerveau des SHR devrait provoquer un effet anti-hypertenseur. À

cet effet, les récepteurs NK<sub>3</sub> sont plus particulièrement ciblés puisque par analogie avec l'intestin, les récepteurs NK<sub>3</sub> sont localisés en pré-synaptique sur les neurones cholinergiques et facilitent la libération d'acétylcholine (Holzer & Holzer-Petsche, 1997). Si ces récepteurs occupent la même position au niveau central, on pourrait s'attendre à ce que les antagonistes NK<sub>3</sub> provoquent les mêmes effets anti-hypertenseurs que la clonidine qui inhibe la libération d'acétylcholine. Il est connu que l'activation des récepteurs NK<sub>3</sub> par injection de neurokinine B ou de senktide dans la substance noire et l'aire tegmentale ventrale provoque une augmentation d'acétylcholine dans le striatum du rat (Arenas *et al.*, 1991; Guzman *et al.*, 1993; Steinberg *et al.*, 1995) et le septum du cobaye (Marco *et al.*, 1998).

### **1.9 Problématique et justification de l'étude**

Des études neuropharmacologiques effectuées dans notre laboratoire ont permis de caractériser les réponses cardiovasculaires, comportementales et rénales induites par l'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) des cinq tachykinines connues et d'agonistes sélectifs chez le rat normotendu (Prat *et al.*, 1994; Picard *et al.*, 1994,1995; Yuan & Couture, 1997; Cellier *et al.*, 1997,1999). Dans l'une de ces études, l'administration i.c.v. de senktide, un agoniste sélectif des récepteurs NK<sub>3</sub>, provoque une augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle (Cellier *et al.*, 1997). Ces effets sont bloqués par un traitement intra-veineux avec l'halopéridol, un antagoniste dopaminergique (Cellier & Couture, 1997). Ces résultats suggèrent que les effets i.c.v. du senktide dérivent, en totalité ou en partie, de l'activation d'une ou de plusieurs voies dopaminergiques centrales. De façon générale, les voies dopaminergiques centrales proviennent de trois régions importantes: l'hypothalamus, l'aire tegmentale ventrale et la

substance noire (Cooper *et al.*, 1996). Dans cette thèse, le choix de la substance noire comme cible des effets i.c.v du senktide repose sur trois arguments:

- 1) La présence d'une concentration élevée de substance P, de neurokinine A et de récepteurs des tachykinines dans le noyau.
- 2) Le rôle suggéré de la substance noire et de sa voie dopaminergique nigrostriée dans la régulation des baroréflexes et de la pression artérielle.
- 3) La modulation par les tachykinines de la voie dopaminergique nigrostriée via l'activation du récepteur NK<sub>3</sub> situé sur les corps cellulaires dopaminergiques de la zone compacte du noyau.

Hypothèse de travail de la première étude:

Les tachykinines et leurs récepteurs dans la substance noire exercent un rôle dans la régulation centrale des fonctions cardiovasculaires chez le rat normotendu.

Objectifs spécifiques de la première étude:

- 1) Mesurer les effets cardiovasculaires et comportementaux induits par des agonistes sélectifs aux trois récepteurs des tachykinines injectés directement dans la substance noire chez le rat normotendu, éveillé et non immobilisé.
- 2) Caractériser pharmacologiquement les réponses par des injections préalables d'antagonistes sélectifs aux trois récepteurs des tachykinines dans la substance noire.

- 3) Définir le mécanisme d'action périphérique de ces effets par des traitements intra-veineux à l'aide d'antagonistes adrénergiques et muscariniques.

Les résultats de la première étude suggèrent que les tachykinines de la substance noire modulent l'activité cardiaque *via* l'activation des trois récepteurs et indépendamment des changements sur la pression artérielle et l'activité comportementale, chez le rat normotendu. Les études s'accordent pour reconnaître le rôle potentiel de la voie dopaminergique nigrostriée dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR (van den Buuse *et al.*, 1991; Linthorst *et al.*, 1994). Or, cette même voie dopaminergique est modulée par les tachykinines *via* l'activation des récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> (Marco *et al.*, 1998). Ainsi, la deuxième partie de cette thèse consistait à déterminer l'influence des tachykinines endogènes de la substance noire dans la régulation centrale des fonctions cardiovasculaires chez le rat spontanément hypertendu (SHR).

Hypothèse de travail de la deuxième étude:

Une dysfonction de l'activité excitatrice des tachykinines sur la voie nigrostriée peut altérer la libération de dopamine dans le striatum et ainsi contribuer au maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR.

Objectifs spécifiques de la deuxième étude:

- 1) Mesurer les effets cardiovasculaires et comportementaux induits par des agonistes sélectifs aux trois récepteurs des tachykinines injectés directement dans la substance

noire chez le SHR et son témoin WKY. Comparer les réponses avec celles de la première étude chez le rat Wistar.

- 2) Mesurer les effets cardiovasculaires et comportementaux induits par des antagonistes sélectifs aux trois récepteurs des tachykinines injectés directement dans la substance noire chez le SHR, éveillé et non immobilisé.
- 3) Déterminer, par une étude de liaison en autoradiographie, l'affinité (mesure du Kd pour le ligand [<sup>125</sup>I]-HPP-senktide) et la densité des récepteurs NK<sub>3</sub> (liaison spécifique) dans la substance noire et dans trois autres régions du cerveau (aire tegmentale ventrale, amygdale, hippocampe) chez le SHR et son témoin WKY.

Les résultats de la deuxième étude appuient fortement l'hypothèse d'une hyperactivité de la voie dopaminergique nigrostriée par l'activation tonique des récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines au niveau de la substance noire. Ce mécanisme pourrait intervenir dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR. Or, les récepteurs NK<sub>3</sub> sont distribués de façon abondante dans plusieurs régions cérébrales ayant un rôle cardiovasculaire, dont l'hypothalamus et le bulbe rachidien (Minamino *et al.*, 1984; Merchanthaler *et al.*, 1992). Il n'est donc pas exclu que les récepteurs NK<sub>3</sub> puissent participer au maintien de l'hypertension artérielle à un autre niveau que la voie dopaminergique nigrostriée.

Hypothèse de travail de la troisième étude:

Determiner le rôle des tachykinines endogènes cérébrales dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR.

Objectifs spécifiques de la troisième étude:

- 1) Mesurer la pression artérielle moyenne suite à l'administration i.c.v. et i.v. de plusieurs antagonistes sélectifs pour chacun des récepteurs des tachykinines chez le SHR.
- 2) Mesurer la pression artérielle moyenne suite à l'administration i.c.v. de l'antagoniste sélectif aux récepteurs NK<sub>3</sub> (SB222200) chez le SHR bi-néphrectomisé. Ce traitement vise à évaluer la participation du système rénal et rénine-angiotensine dans l'effet anti-hypertenseur du SB 222200.
- 3) Mesurer les taux circulants des catécholamines (épinephrine, norépinephrine, dopamine) et de l'hormone vasopressine au pic de l'effet anti-hypertenseur du SB 222200 et trois jours suivant l'injection de l'antagoniste, lorsque le SHR est redevenu hypertendu.

# **CHAPITRE II**

## **PREMIER ARTICLE**

### **MODULATION OF CARDIAC ACTIVITY BY TACHYKININS IN THE RAT SUBSTANTIA NIGRA**

**Andrée Lessard & Réjean Couture**

Département de Physiologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal,  
Montréal, Québec, Canada

**Br. J. Pharmacol.** 134 (2001) 1749-1759

## Résumé de l'étude

L'objectif de cette étude était de déterminer l'influence des tachykinines et de leurs récepteurs dans les mécanismes de régulation cardiovasculaire au niveau de la substance noire chez le rat éveillé. La pression artérielle moyenne, la fréquence cardiaque ainsi que l'activité comportementale ont été mesurées suite à l'injection d'agonistes sélectifs pour les récepteurs NK<sub>1</sub> ([Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP), NK<sub>2</sub> ([β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10)) et NK<sub>3</sub> (senktide) des tachykinines dans la substance noire (Tableau 2-1). Une courbe dose-réponse a été effectuée pour les trois agonistes où d'importantes tachycardies ont été mesurées en absence de changements de pression artérielle et de l'activité comportementale. Des antagonistes sélectifs aux récepteurs NK<sub>1</sub> (RP 67580), NK<sub>2</sub> (SR 48968) et NK<sub>3</sub> (R-820) (Tableau 2-2) ont été administrés dans la substance noire, 15 min avant l'injection des agonistes respectifs. Les agonistes ont été ré-injectés seuls 24h après le traitement aux antagonistes pour vérifier la réversibilité des inhibitions. Chaque rat n'a reçu qu'un seul antagoniste. Tous les antagonistes utilisés lors de cette étude ont démontré une inhibition sélective et réversible des tachycardies provoquées par l'administration intra-nigrale des agonistes respectifs.

Afin de déterminer les mécanismes périphériques impliqués dans les tachycardies, un antagoniste β<sub>1</sub>-adrénergique (aténolol) a été injecté seul ou avec un antagoniste muscarinique (atropine) par voie i.v., 15 min avant l'injection intra-nigrale des agonistes. Les tachycardies provoquées par l'injection des agonistes NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> ont été bloquées par

l'aténolol alors que celles de l'agoniste NK<sub>1</sub> ont nécessité une co-injection de l'aténolol et de l'atropine pour obtenir une inhibition complète.

L'observation des coupes histologiques en *post-mortem* a permis de rejeter tous les sujets dont le site d'injection se situait à côté de la substance noire. Une injection d'agonistes dans ces sites n'a montré aucun effet cardiovasculaire ou comportemental significatif comparativement au véhicule.

En conclusion, cette étude met en évidence un nouveau circuit neuronal impliqué dans le contrôle autonome central du rythme cardiaque chez le rat. Les trois récepteurs des tachykinines sont susceptibles de jouer un rôle dans ce mécanisme.

**Tableau 2-1 :** Nom et structure des agonistes des tachykinines utilisés dans les chapitres II à IV de cette thèse.

Nom	Structure	Sélectivité (%)			Référence
		NK <sub>1</sub>	NK <sub>2</sub>	NK <sub>3</sub>	
[Sar <sup>9</sup> ,Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]SP	H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Sar-Leu-Met(O <sub>2</sub> )-NH <sub>2</sub>	135	inactif	inactif	Regoli <i>et al.</i> , 1988
[β-Ala <sup>8</sup> ]NKA(4-10)	H-Asp-Ser-Phe-Val-β-Ala-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	0.05	251	5.87	Rovero <i>et al.</i> , 1989
Senktide	Suc-Asp-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	0.01	0.1	85	Wörmser <i>et al.</i> , 1986

Les valeurs de sélectivité sont tirées de l'ouvrage de Guard & Watson, *Neurochem, Int.* 18(2) : 149-165, 1991. Les pourcentages sont comparés avec les tachykinines naturelles. Ainsi, pour les récepteurs NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub>, 100% d'affinité est attribuée respectivement à la substance P, à la neurokinine A et à la neurokinine B.

**Tableau 2-2** : Nom et structure des antagonistes des tachykinines utilisés dans les chapitres II à IV de cette thèse.

Nom	Structure	Sélectivité			Référence
		NK <sub>1</sub>	NK <sub>2</sub>	NK <sub>3</sub>	
RP 67580	(±) 7,7-diphenyl-2[1-imino-2(2-methoxy-phenyl)-ethyl] perhydroisoindol-4-one(3aR, 7aR)	4.16	Ki (nM) 10,000	10,000	Garret <i>et al.</i> , 1991
SR 48968	(S)-N-methyl-N[4-(4-acetylamino-4-phenylpiperidino)-2-(3,4-dichlorophenyl)butyl]benzamide)	>5000	Ki (nM) 0.51	>5000	Emonds-Alt <i>et al.</i> , 1992
SR 142801	(S)-(N)-(1-(3-(1-benzoyl-3-(3,4-dichlorophenyl)piperidin-3-yl)propyl)-4-phenylpiperidin-4-yl)-N-metylacetamine	2000	Ki (nM) 100	15	Emonds-Alt <i>et al.</i> , 1995
R-820	(3-indolylcarbonyl-Hyp-Phg-N(Me)-Bzl)	5.38	pA <sub>2</sub> (nM)	7.6	Regoli <i>et al.</i> , 1994
SB 235375	((S)-(-)-(α-ethylbenzyl)-3-(carboxymethoxy)-2-phenylquinoline-4-carboxamide	>100,000	Ki (nM) 209	2.2	Hay <i>et al.</i> , 2002
SB 222200	((S)-(-)-N-(α-ethylbenzyl)-3-methyl-2-phenylquinoline-4-carboxamide)	>100,000	Ki (nM) 250	4.4	Sarau <i>et al.</i> , 2000

La sélectivité est donnée par les valeurs de constante d'inhibition (Ki) ou de pA<sub>2</sub>.

1. The effects of tachykinin NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptor agonists and antagonists were measured on blood pressure (MAP) and heart rate (HR) after bilateral microinjection into the substantia nigra (SN) of awake, unrestrained rats.
2. Increasing doses (25pmol-1nmol) of selective agonists at NK<sub>1</sub> ([Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP), NK<sub>2</sub> ([β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10)) and NK<sub>3</sub> (senktide) receptors into the SN produced tachycardia which was selectively and reversibly blocked by the prior injection of tachykinin antagonists at NK<sub>1</sub> (RP67580, 250 pmol), NK<sub>2</sub> (SR48968, 250 pmol) and NK<sub>3</sub> (R-820, 500 pmol) receptor. A rapid fall in MAP followed by a pressor response was seen with 1 nmol of [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP. Behavioural activity was elicited by 1 nmol of [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (sniffing > face washing = grooming) and senktide (sniffing > wet dog shake > rearing = locomotion). Tachykinin antagonists had no direct cardiovascular or behavioural effects.
3. The tachycardia produced by 100 pmol of [β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10) or senktide was abolished by an i.v. treatment with atenolol (β<sub>1</sub>-adrenoceptor antagonist, 5 mg kg<sup>-1</sup>) while that evoked by [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP was reduced. A combination of atenolol (5 mg kg<sup>-1</sup>) and atropine (muscarinic antagonist, 1 mg kg<sup>-1</sup>) blocked the response evoked by [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP.
4. These data suggests that the SN is a potential site of cardiac modulation by tachykinins. In addition to the withdrawal of the cardiovagal activity by NK<sub>1</sub> receptor, the three tachykinin receptors appear to increase the sympatho/adrenal drive to the heart. This occurs independently

of changes in MAP and behaviour. Hence, this study highlights a new central mechanism of cardiac regulation.

**Keywords:** Tachykinin; Tachykinin NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors; substantia nigra; autonomic regulation; substance P.

**Abbreviations:** aCSF, artificial cerebrospinal fluid; ANOVA, analysis of variance; HR, heart rate; i.v., intravenous; i.c.v., intracerebroventricular; MAP, mean arterial blood pressure; NKA, neurokinin A; SN, substantia nigra; SHR, spontaneously hypertensive rat; SP, substance P.

## Introduction

The substantia nigra (SN ; A9) is a midbrain nucleus traditionally associated with the central control of motor activity (Gerfen, 1992). Additional evidence also suggests its involvement in central cardiovascular regulation (Barbeau *et al.*, 1969 ; Micieli *et al.*, 1987 ; Van den Buuse *et al.*, 1991 ; Lin & Yang, 1994). Electrical or chemical stimulation of SN leads to an increase in mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and striatal dopamine levels in anaesthetised rats (Lin & Yang, 1994). Since these cardiovascular effects were markedly attenuated by nigral 6-hydroxydopamine lesions or by blockade of striatal dopamine receptors, it was suggested that the nigro-striatal dopaminergic pathway is involved in these responses (Lin & Yang, 1994). Lesion of the nigro-striatal dopaminergic pathway attenuates the development of hypertension in young spontaneously hypertensive rats that points to a putative role for this neuronal pathway in the development of hypertension (Van den Buuse *et al.*, 1991 ; Linthorst *et al.*, 1994).

Tachykinins are known to modulate nigro-striatal dopaminergic neurons by stimulating the release, turnover and metabolism of striatal dopamine via the activation of neurokinin-1 (NK<sub>1</sub>) and neurokinin-3 (NK<sub>3</sub>) receptors in the SN (Reid *et al.*, 1990 ; Humpel *et al.*, 1991 ; Humpel & Saria, 1993 ; Bannon & Whitty, 1995 ; Marco *et al.*, 1998). Autoradiographic, immunohistochemical and *in situ* and/or solution hybridization studies revealed that the SN contains numerous substance P (SP) and neurokinin A (NKA) containing nerve terminals and tachykinin NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors (Helke *et al.*, 1990 ; Stoessl & Hill, 1990 ; Stoessl, 1994 ; Bannon & Whitty, 1995 ; Whitty *et al.*, 1995 ; Shughrue *et al.*, 1996 ;

Futami *et al.*, 1998). Also, SP and NKA are released *in vivo* (Lindefors *et al.*, 1989) and *in vitro* (Jessell, 1978 ; Humpel & Saria, 1989) in the SN from striato-nigral neurons which are thought to function as a positive feedback loop which regulates the activity of the nigro-striatal dopaminergic pathway.

Previous work from our laboratory has shown that central activation of tachykinin NK<sub>3</sub> receptors by intracerebroventricular (i.c.v.) injection of the selective agonist senktide causes increases of mean arterial pressure, heart rate and behavioural activity in conscious rats (Cellier *et al.*, 1997). Intravenous pre-treatment with the dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist haloperidol blocked those cardiovascular and behavioural changes and unmasked a vasopressin-dependent bradycardia (Cellier & Couture, 1997). Although anatomical and physiological studies suggest an interaction between tachykinins and the nigro-striatal dopamine pathway in the SN, there is a lack of information regarding the implication of tachykinins in cardiovascular regulation at the level of the SN. Therefore, the present study was undertaken to test the hypothesis that tachykinin receptors may modulate cardiovascular function following the activation of the nigro-striatal dopaminergic pathway. This was addressed by investigating the cardiovascular responses to bilateral microinjection of selective tachykinin agonists and antagonists at NK<sub>1</sub> ([Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP, Regoli *et al.*, 1988 ; RP 67580, Garret *et al.*, 1991), NK<sub>2</sub> ([β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10), Rovero *et al.*, 1989 ; SR 48968, Advenier *et al.*, 1992 ; Emonds-Alt *et al.*, 1992) and NK<sub>3</sub> (senktide, Wörmser *et al.*, 1986 ; R-820, Regoli *et al.*, 1994) receptors directly into the SN. The pseudopeptide NK<sub>3</sub> antagonist R-820 (Regoli *et al.*, 1994) was preferred to the non-peptide NK<sub>3</sub> antagonist SR 142801 (Emonds-Alt *et al.*, 1995) in this study because the latter was shown to act as a tachykinin

NK<sub>3</sub> receptor agonist when injected intracerebroventricularly or intrathecally in conscious rats (Cellier *et al.*, 1997 ; Couture *et al.*, 2000). The mechanism underlying the cardiovascular response to agonists was investigated by the prior intravenous injection of the selective  $\beta_1$ -adrenoceptor antagonist atenolol and the muscarinic antagonist atropine methyl nitrate. To avoid the spurious effects of anaesthesia and the stress induced by immobilisation, these studies were carried out in awake, unrestrained rats.

## Methods

### *Animal source and care*

Male Wistar rats (300-400 g) were purchased 3-5 days prior to experiments from Charles River, St-Constant, Québec, Canada and housed four to five per cage under a 12h light-dark cycle in a room with controlled temperature (20°C), humidity (53%) with food (Charles River Rodent) and tap water available *ad libitum*. The care of animals and research protocols conformed to the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal Care and approved by the Animal Care Committee of our University.

### *Animal preparation*

Male Wistar rats (n = 154) were anaesthetised with an intraperitoneal (i.p.) injection of 65 mg kg<sup>-1</sup> sodium pentobarbitone (Somnotol; M.T.C. Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada) and then positioned in a stereotaxic frame (David Kopf Instrumentation, Tujunga, CA, U.S.A.) with the incisor bar set at 3.3 mm below the interaural line. The skull was exposed, cleaned and a hole was drilled above each SN (coordinates : 5.3 mm posterior to the bregma, 2.3 mm lateral to the midline, 7.0 mm ventral from the skull surface ; Paxinos & Watson, 1986). Two 23-gauge stainless steel guide cannulae targeted 2 mm dorsal to each SN were implanted and fixed with two screws and dental cement to the skull. Stylets (31-gauge stainless steel) were inserted into each guide cannulae. Then, the skin was replaced and sutured. Animals were housed in individual plastic cages (40 cm X 23 cm X 20 cm) in the same controlled conditions and allowed to recover for seven days. Then, the rats were re-

anaesthetised with sodium pentobarbitone ( $65 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) and an intravascular siliconized (Sigmacote, Sigma, St-Louis, MO, U.S.A.) polyethylene tubing PE-50 catheter (Intramedics, Clay Adams, NJ, U.S.A.), filled with physiological saline containing  $100 \text{ i.u. ml}^{-1}$  heparin sodium salt (Sigma, St-Louis, MO, U.S.A.), was inserted into the abdominal aorta via the femoral artery for direct blood pressure recording. The catheter was tunneled subcutaneously to emerge at the back of the neck. Before surgery, the animals received Ethacilin ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.m., rogar/S.T.B. Inc., London, Ontario, Canada) and Ketoprophen (anafen,  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.m., MERIAL Canada Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada). Recovery from anaesthesia was monitored closely under a warming lamp to maintain the body temperature of animals. Rats with apparent abnormal behaviour (lost of  $> 25 \%$  of body weight, anorexia, weaknesses) were immediately humanely killed with an overdose of pentobarbitone. Thereafter, rats were housed individually in polyethylene cage with a top grid and returned to their resident room. Experimental protocols were initiated 48h after the final intervention, in conscious and unrestrained rats.

#### *Measurement of cardiovascular and behavioural parameters*

During all experiments, continuous direct recordings of blood pressure and heart rate were made respectively with a Statham pressure Transducer (P23ID) and a cardiac tachometer (model 7P4) (triggered by the arterial blood pressure pulse) coupled to a Grass polygraph (model 79; Grass Instruments Co., Quincy, MA, U.S.A.). Behavioural activity was measured as previously reported (Picard *et al.*, 1994). Briefly, during every consecutive period of 15 s, a score of 1 or 0 was given systematically depending on whether the animal showed the specific

type of behaviour or not, whatever its frequency, intensity or duration during that period. Summation of scores for the first 30 min period following SN injection gave the behavioural scores for face washing, grooming, sniffing and rearing. The maximal theoretical score was 120 (15 s intervals x 30 min). Wet dog shakes and locomotion (number of complete exploratory circles within the cage) behaviours were measured according to the number of episodes or frequency during the first 30 min period. Both cardiovascular and behavioural responses were measured 1 h after the rats were transported to an isolated and quiet testing room where only the experimenter had access. Rats remained in their resident cage but the top grid was removed and had no more access to the food and water for the duration of the experiment. When resting blood pressure and heart rate were stable, bilateral microinjections were made simultaneously into each SN of undisturbed, freely moving rats through 31-gauge stainless steel injectors that extend 2 mm beyond the previously implanted guide cannulae. The injectors were connected, via polyethylene tubing (PE-10, Intramedics, Clay Adams, NJ, U.S.A.), to two Hamilton microsyringes (5  $\mu$ l, Fisher Scientific Ltd, Montréal, Québec, Canada) and inserted into the guide cannulae without handling the rats. All solutions for microinjections were freshly prepared and injected (volume of 0.1  $\mu$ l) bilaterally into the SN over a period of 1 min.

### *Histology*

At the end of the experiments, the rats received 0.1  $\mu$ l of Evans Blue dye (Sigma, St Louis, MO, U.S.A.) bilaterally and they were immediately sacrificed with an overdose of sodium pentobarbitone. The brains were removed and fixed with 10% (v v<sup>-1</sup>) formol and 20%

(w v<sup>-1</sup>) sucrose. Coronal sections (40  $\mu\text{m}$ , cut on a freezing microtome) were mounted on glass slides and stained with cresyl violet for histological examination of the microinjection sites (Figure 1). Rats which showed any evidence of hemorrhage (n = 39) were excluded from the study.

### *Experimental protocols*

#### *Experiment 1 : Dose-response curves to SN microinjection of selective tachykinin agonists*

The rats were used on four consecutive days, during which they received initially a SN microinjection of artificial cerebrospinal fluid (aCSF) followed 60 min later by the injection of the selective NK<sub>1</sub> agonist [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (n=18), the selective NK<sub>2</sub> agonist [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10) (n=13) and the selective NK<sub>3</sub> agonist senktide (n=19) at random. Increasing doses of agonists were given at 24h apart on day 1 (25 pmol), day 2 (50 pmol), day 3 (100 pmol) and day 4 (1 nmol, the largest dose). On the same day, rats received a single dose of the three agonists at a minimum of 60 min intervals to enable blood pressure and heart rate to return to baseline values. Because the HR response to agonists at 1 nmol was prolonged and returned only slowly to pre-injection levels, only one or two agonists were given to a rat at this dose. Every dose refers to the summation of doses given on each side of the SN.

Preliminary studies were performed to control for tachyphylaxis. For that purpose, rats were used on two consecutive days during which they received one dose of a maximum of two different agonists at NK<sub>1</sub> (25 pmol, n = 8 and 1 nmol, n = 6), NK<sub>2</sub> (25 pmol, n = 9 and 1 nmol, n = 3) and NK<sub>3</sub> receptor (1 nmol, n = 3). Results showed a reproducible response to agonists when injected either at 25 pmol or 1 nmol one day apart. In addition, dose-response

curves on heart rate response (intensity and time-course) to NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> agonists were not significantly different (ANOVA, two-way) whatever the order of injection of agonists on day 1 to 4, suggesting that there is no cross desensitization between the three agonists.

*Experiment 2 : Cardiovascular effects of SN microinjection of selective tachykinin antagonists*

Rats that had previously (24h) received 25 pmol of either [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP, [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) or 50 pmol of senktide (the lowest dose which produced significant tachycardia) were given an intra-nigral microinjection of the NK<sub>1</sub> antagonist RP67580 (250 pmol against [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (n=10) or [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (n=4)), the NK<sub>2</sub> antagonist SR48968 (250 pmol against [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (n=6-8) or [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (n=6)) and the NK<sub>3</sub> antagonist R-820 (500 pmol against senktide (n=7-8) or [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (n=8)) ; after 15 min, intra-nigral microinjections of 25 or 50 pmol of the respective agonists were given. At least 120 min later, the same antagonist was re-injected and after 15 min, an agonist for a different receptor was given to test the selectivity of the antagonist. Each rat received only one antagonist. The agonists were re-injected alone 24h later to assess the reversibility of any inhibition occurring on the preceding day in the presence of antagonist. Doses of antagonists were based on pilot studies in which several doses of antagonists were tested to identify that required to block the cardiovascular effect of agonists. Preliminary studies revealed that an equimolar dose (1 nmol) of the NK<sub>3</sub> antagonist, R-820, did not alter the cardiovascular and behavioural effects of the NK<sub>3</sub> agonist, senktide (n=5). The doses of 1 and 10 nmol of R-820 were excluded because they required, respectively 30% (v v<sup>-1</sup>) and 60% (v

v<sup>-1</sup>) of dimethyl sulphoxide (DMSO) which were not tolerated by the animals. Therefore, this study was restricted to the dose of 500 pmol of R-820 with 15% (v v<sup>-1</sup>) DMSO which did not produce side effects.

### *Experiment 3: Mechanism of the cardiovascular responses to tachykinin agonists*

Rats that had previously (24h) received 100 pmol of either [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP, [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) or senktide were given an i.v. injection of the selective β<sub>1</sub>-adrenoceptor antagonist atenolol (5mg kg<sup>-1</sup>) or a combination of atenolol (5 mg kg<sup>-1</sup>) and the cholinergic muscarinic antagonist atropine methyl nitrate (1 mg kg<sup>-1</sup>) simultaneously. Doses of the latter antagonists were based on a previous study (Décarie & Couture, 1992). Intra-nigral microinjection of 100 pmol of [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (n=7), [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (n=14) and senktide (n=7) were given 10 min after the treatment. On the same day, each rat received a maximum of three microinjections into the SN at a minimum of 60 min intervals. The treatment with atropine alone was not performed because in pilot experiments we found that heart rate was markedly increased under cholinergic muscarinic receptor blockade. As a consequence, the ceiling effect of atropine masked the tachycardia produced by the tachykinin agonists injected into the SN. However, MAP was not affected by atropine given alone.

### *Drugs and solutions*

The composition of aCSF was, in nM: NaCl 128.6, KCl 2.6, MgCl<sub>2</sub> 2.0 and CaCl<sub>2</sub> 1.4; pH adjusted to 7.2. [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP was obtained from Peninsula Lab. Inc. (San Carlos, CA, USA) while [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) and succinyl-[Asp<sup>6</sup>, MePhe<sup>8</sup>]SP-(6-11) (senktide) were

purchased from Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA, U.S.A.). The non-peptide antagonists RP67580 and SR 48968 were provided by Dr. C. Garret (Rhone Poulenc, Paris, France) and J.-C. Brelière (Sanofi Recherche, Montpellier, France), respectively. The pseudopeptide antagonist R-820 was generously provided by Dr. J.L. Fauchère (Servier, Paris, France). Atenolol and atropine methyl nitrate were purchased from Sigma Chemicals Co (St Louis, MO, USA) and solubilized in saline (0.9%w v<sup>-1</sup>) for i.v. injection. [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP was solubilized in aCSF while senktide, [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) and all antagonists were solubilized in DMSO (Fisher Scientific, Montréal, Québec, Canada). The solution was then completed with aCSF and contained 1-15% (v v<sup>-1</sup>) DMSO. The stock solutions (10 mg ml<sup>-1</sup>) of agonists and antagonists were stored in aliquots of 100 μl at -20°C until use. In all experiments, vehicle (aCSF containing <15% DMSO) was injected as control and produced no significant changes on any parameters when compared to baseline values.

#### *Statistical analysis of data*

Results are expressed as means ± s.e. mean of (n) rats. Results were analysed for statistical significance by a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures followed by Bonferroni confidence intervals. Statistical differences on non-parametric episodes of behaviours were evaluated with a Kruskal-Wallis test. Only probability values (P) less than 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

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

The effects of four increasing doses of [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP on MAP and HR are shown in Figure 2. [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (25 pmol-1 nmol) evoked dose-dependent increases in HR which were significant ( $P < 0.05$ ) when compared to vehicle (aCSF) values ( $n=18$ ). Thus, the tachycardia was significant at 25 pmol (0.5-15 min,  $n=17$ ), 50 pmol (0.5-15 min,  $n=18$ ), 100 pmol (0.5-45 min,  $n=12$ ) and 1 nmol (0.5-60 min,  $n=8$ ). The maximum rise in HR was  $44 \pm 7$  bpm (25 pmol, 15 min),  $31 \pm 11$  bpm (50 pmol, 15 min),  $75 \pm 18$  bpm (100 pmol, 15 min) and  $105 \pm 25$  bpm (1 nmol, 3 min). Whereas [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP had no effect on MAP at doses between 25-100 pmol, it produced a rapid and transient fall in MAP ( $-12 \pm 2$  mmHg) at 1 nmol (0.5-1 min,  $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ). The above NK<sub>1</sub> agonist (1 nmol) produced a small but significant increase in MAP ( $8 \pm 3$  mmHg) ( $P < 0.05$ ) at 45-60 min post-injection.

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

The effects of four increasing doses of [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) on MAP and HR are shown in Figure 3. [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) evoked a tachycardia which was significant ( $P < 0.05$ ) at 25 pmol (0.5-30 min,  $n = 13$ ), 50 pmol (0.5-45 min,  $n = 14$ ), 100 pmol (2-45 min,  $n = 12$ ) and 1 nmol (0.5-45 min,  $n = 18$ ) when compared to vehicle (aCSF with 5-10% DMSO) values ( $n=14$ ). The maximum rise in HR was  $41 \pm 9$

bpm (25 pmol, 15 min),  $48 \pm 15$  bpm (50 pmol, 15 min),  $48 \pm 15$  bpm (100 pmol, 15 min) and  $36 \pm 16$  bpm (1 nmol, 30 min). [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (25-1000 pmol) had no significant effect on MAP when compared to vehicle values.

#### *Cardiovascular response induced by the NK<sub>3</sub> agonist senktide*

The effects of four increasing doses of senktide on MAP and HR are shown in Figure 4. Senktide evoked a tachycardia which was significant ( $P < 0.05$ ) at 50 pmol (0.5-15 min,  $n = 18$ ), 100 pmol (0.5-60 min,  $n = 13$ ) and 1 nmol (0.5-45 min,  $n = 9$ ). The maximum rise in HR was  $26 \pm 7$  bpm (25 pmol, 7 min,  $P > 0.05$ ),  $42 \pm 12$  (50 pmol, 15 min),  $69 \pm 14$  (100 pmol, 15 min) and  $47 \pm 16$  (1 nmol, 45 min). However, senktide had no significant effect on MAP when compared to vehicle values (aCSF with 10% DMSO) at any doses tested.

#### *Behavioural effects of [ $\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}$ ]SP, [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) and senktide*

No significant behavioural activity was associated with the injection of the three agonists from 25 to 100 pmol. At 1 nmol, [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) ( $n=18$ ) did not produce any significant effect on behaviour while [ $\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}$ ]SP evoked a significant increase ( $P < 0.01$ ,  $n = 8$ ) of behavioural activity (sniffing > wet dog shake > face washing = grooming = head scratching). Whereas senktide (1 nmol) produced a significant ( $P < 0.01$ ,  $n = 9$ ) increase on some of these behaviours (sniffing > wet dog shake > rearing = locomotion), it did not affect face washing, head scratching and grooming (Figure 5). The behaviours produced by the NK<sub>1</sub>

and NK<sub>3</sub> receptor agonists occurred concomitantly with the cardiovascular responses and presented a similar time course.

*Effects of RP67580 on [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP- and [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10)-induced responses*

The effects of the tachykinin NK<sub>1</sub> antagonist RP67580 against the tachycardiac responses to [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP and [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) are shown in Figure 6A. On day 1, the responses to [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (25 pmol, n = 10) and [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (25 pmol, n = 4) were quantitatively similar to those obtained in Figures 2 and 3. The peak response was reached at 10 min after injection of [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (51 ± 20 bpm) and 3 min after injection of [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (30 ± 5 bpm). On day 2, the response to [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP was abolished (P < 0.05) in the presence of RP67580 (250 pmol, n = 10) and was restored 24h later (44 ± 24 bpm). The same treatment with this antagonist had no significant effect on the response to [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (43 ± 24 bpm) (Figure 6A).

*Effects of SR48968 on [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10)- and [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP-induced responses*

The effects of the tachykinin NK<sub>2</sub> antagonist SR48968 against the tachycardiac responses to [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) and [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP are shown in Figure 6B. On day 1, the responses to [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (25 pmol, n = 8) and [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (25 pmol, n = 6) were quantitatively similar to those presented

in Figures 2 and 3. The response to  $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}] \text{SP}$  peaked at 15 min after injection ( $28 \pm 18$  bpm) while that to  $[\beta\text{-Ala}^8] \text{NKA}$  (4-10) peaked at 2 min after injection ( $33 \pm 11$  bpm). On day 2, the response to  $[\beta\text{-Ala}^8] \text{NKA}$  (4-10) was blocked ( $P < 0.05$ ) in the presence of SR48968 (250 pmol,  $n = 8$ ) and was restored 24h after treatment ( $47 \pm 15$  bpm). However, SR48968 failed to alter significantly the response to  $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}] \text{SP}$  ( $40 \pm 14$  bpm).

#### *Effects of R-820 on senktide- and $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}] \text{SP}$ -induced responses*

The effects of the tachykinin  $\text{NK}_3$  antagonist R-820 against the tachycardiac responses to senktide and  $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}] \text{SP}$  are shown in Figure 6C. On day 1, the responses to senktide (50 pmol,  $n = 8$ ) and  $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}] \text{SP}$  (50 pmol,  $n = 8$ ) were quantitatively similar to those presented in Figures 2 and 4. The response peaked at 30 min after injection of senktide ( $71 \pm 24$  bpm) and 15 min after injection of  $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}] \text{SP}$  ( $58 \pm 19$  bpm). On day 2, the response to senktide was blocked ( $P < 0.05$ ) by R-820 (500 pmol,  $n = 8$ ) and was restored 24h after treatment ( $43 \pm 24$  bpm). However, R-820 failed to alter significantly the response to  $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}] \text{SP}$  ( $46 \pm 11$  bpm).

When injected alone, the three antagonists (250 pmol of RP67580 and SR48968, 500 pmol of R-820) failed to elicit any significant cardiovascular or behavioural effects over a period of 60 min compared to vehicle values (data not shown).

*Effects of Atenolol and Atropine on [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP-induced responses*

The tachycardia induced by [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP in the presence of atenolol and atropine are shown in Figure 7A. On day 1, in non-atenolol pretreated rats, the response to [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (100 pmol, n=7) was significant between 1-45 min. The response peaked at 15 min after the injection ( $54 \pm 14$  bpm). On day 2, the response induced by [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP was not significantly reduced by the prior injection of atenolol (5 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.) although the remaining tachycardia was no more significant when compared to vehicle values. In a second group of rats, in non-atenolol and non-atropine pretreated rats, [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (100 pmol, n=7) evoked a similar tachycardia on day 1. On day 2, the response induced by [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP was completely blocked ( $P < 0.05$ ) by the prior simultaneous injection of atenolol (5 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.) and atropine methyl nitrate (1 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.).

*Effects of Atenolol on [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) -induced responses*

The tachycardia induced by [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) in the presence of atenolol is shown in Figure 7B. On day 1, in non-atenolol pretreated rats, the response to [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (100 pmol, n=14) was quantitatively similar (significant 1-45 min) to that presented in Figure 3. The response peaked at 2 min after the injection ( $45 \pm 9$  bpm). On day 2, the response induced by [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) was completely blocked ( $P < 0.05$ ) by the prior injection of atenolol (5 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.).

### *Effects of Atenolol on senktide -induced responses*

The tachycardia induced by senktide in the presence of atenolol is shown in Figure 7C. On day 1, in non-atenolol pretreated rats, the response to senktide (100 pmol, n=7) was quantitatively similar (significant 4-30 min) to that presented in Figure 4. The response peaked at 15 min after the injection ( $60 \pm 24$  bpm). On day 2, the response induced by senktide was completely blocked ( $P < 0.05$ ) by the prior injection of atenolol ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.v.).

### *Effects of agonists in control experiments*

Rats which showed injection sites beside the SN (■, Figure 1 ; after histological post-mortem examination) failed to evoke any significant cardiovascular and behavioural changes to  $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}] \text{SP}$  (100 pmol, n=7),  $[\beta\text{-Ala}^8] \text{NKA}$  (4-10) (100 pmol, n=4) or senktide (100 pmol, n=4) compared to vehicle values (data not shown). Therefore, the effects of agonists are unlikely to be due to the diffusion of the injection outside the SN. This possibility is also unlikely in this study because the volume ( $0.1 \mu\text{l}$ ) of injection is 5 to 10-fold smaller than those ( $0.5$  and  $1 \mu\text{l}$ ) generally employed in this nucleus (Humpel *et al.*, 1991 ; Humpel & Saria, 1993 ; Stoessl *et al.*, 1993 ; 1995). Finally, among the rats in which microinjection sites were accepted in this study, no differences could be seen in the size of the heart rate response whether the injection was within or very close to the pars compacta or pars reticulata of the SN.

## Discussion

Several lines of evidence support the role of tachykinins in central cardiovascular regulation (Culman & Unger, 1995 ; Culman *et al.*, 1997 ; Picard *et al.*, 1994 ; Cellier *et al.*, 1997 ; 1999) and in the modulation of the nigro-striatal dopaminergic system (Reid *et al.*, 1990 ; Humpel *et al.*, 1991 ; Humpel & Saria, 1993 ; Marco *et al.*, 1998). However, this study provides the first pharmacological evidence suggesting a putative role of these striato-nigral neuropeptides in cardiovascular regulation at the level of the substantia nigra. Bilateral microinjections of rather low doses (pmol range) of selective tachykinin NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptor agonists into SN produced significant tachycardia in awake, unrestrained rats. These effects are unlikely to be due to locomotor activity or to blood pressure changes because alterations in MAP (NK<sub>1</sub> agonist) and behaviour (NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> agonists) occurred only at the highest dose of agonists (1 nmol). Thus, these data confirm earlier studies showing that tachykinins enhance behavioural activity at the nmol range doses by activating NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptors in the SN (Stoessl *et al.*, 1993 ; 1995). Blood pressure was not significantly altered with tachykinin agonists except for the highest dose (1 nmol) of the NK<sub>1</sub> agonist. Indeed, a rapid and transient fall in MAP was observed followed by a late and small increase in MAP. This early fall in MAP may have activated the baroreflex and thus overestimated the tachycardiac response observed at this dose. In contrast to blood pressure and behavioural activity, low doses (25-50 pmol) of the tachykinin agonists at NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors were sufficient to modify heart

rate. This observation suggests a physiological role of these neuropeptides on heart rate modulation by a direct action in the SN. The tachycardia induced by the selective agonists was further characterized with highly selective antagonists and supports the involvement of the three tachykinin receptors. The antagonists tested blocked in a selective and reversible manner the heart rate increase produced by each agonist. Our hypothesis involving the three receptors is reinforced by the fact that the time-course of the cardiac response is different for each agonist. For instance, the tachycardia elicited by senktide was prolonged, in contrast to the rapid and short-lasting tachycardia produced by  $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}] \text{SP}$ . Also, the heart rate response to the  $\text{NK}_2$  agonist was not dose-dependent. This may be due to the relatively low density of  $\text{NK}_2$  receptors in SN unlike the abundance of  $\text{NK}_1$  and especially  $\text{NK}_3$  receptor binding sites, protein and mRNAs (Stoessl & Hill, 1990 ; Bannon & Whitty, 1995 ; Whitty *et al.*, 1995 ; Shughrue *et al.*, 1996 ; Futami *et al.*, 1998). Although a barely detectable signal of  $\text{NK}_2$  receptor mRNA was seen in this nucleus (Bannon & Whitty, 1995 ; Whitty *et al.*, 1995), we showed a weak immunoreactivity for the  $\text{NK}_2$  receptor in some fibres and cell bodies of medium size in the rostral SN pars reticulata (Zerari *et al.*, 1996).

At the doses tested, the three antagonists did not produce any significant behavioural effect. This is consistent with a previous study showing that  $\text{NK}_1$  (RP67580),  $\text{NK}_2$  (L-659,877) and  $\text{NK}_3$  ( $[\text{Trp}^7, \beta\text{-Ala}^8] \text{NKA}$  (4-10)) receptor antagonists (2 nmol) had no effect on grooming behaviour *per se* (Stoessl *et al.*, 1995). Tachykinin antagonists were also devoid of any cardiovascular activity. This

suggests that endogenous tachykinins may not play a primary role in the tonic control of blood pressure and heart rate at the level of the SN in normal rats. This is consistent with the general concept that tachykinins are not tonically active but are released in response to noxious stimuli and stress (Unger *et al.*, 1988 ; Culman & Unger, 1995 ; Culman *et al.*, 1997 ; Baulmann *et al.*, 2000). Nevertheless, the high sensitivity of the heart rate response to exogenous tachykinins suggests a potential role of these neuropeptides in the control of baroreflex activity in the SN.

Treatment with atropine methyl nitrate alone was not performed in this study because its i.v. injection caused a large tachycardia which masked that evoked by the tachykinin agonists in the SN. Blockade of ganglionic nicotinic receptors by atropine methyl nitrate is unlikely as this treatment did not affect blood pressure. The tachycardia which occurs in the presence of atropine methyl nitrate is most likely the consequence of the withdrawal of the vagal tone to the heart. In the presence of atenolol, the tachycardiac responses to the NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> agonists were abolished, suggesting the involvement of a sympathetic mechanism mediated by  $\beta_1$ -adrenoceptors. In contrast, the tachycardia induced by the NK<sub>1</sub> agonist was completely blocked only by a combination of atenolol and atropine, suggesting a double contribution of cardiac sympathetic fibres and a reduction of the cardiovagal drive in the response. It is therefore feasible that the NK<sub>1</sub> receptor stimulates a neural pathway different from that activated by NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors. The identification of these putative pathways involved in the regulation

of cardiac autonomic activity by intranigral tachykinins will deserve further investigations.

Moreover, the behavioural responses elicited by high doses of the NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> agonists in the SN had two different profiles. Whereas senktide enhanced sniffing, locomotion, rearing and wet dog shakes, [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP increased face washing, grooming, sniffing, wet dog shakes and head scratching. In agreement with this finding, senktide (1 nmol) was reported to increase locomotion and wet dog shakes (Stoessl *et al.*, 1993) while the NK<sub>1</sub> agonist [AcArg<sup>6</sup>,Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (6-11) (0.5 and 1 nmol) induced grooming (Stoessl *et al.*, 1995). In the same matter, the distinctive effects of NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptor agonists on behaviour could be related to the activation of different neuronal elements in the SN. Indeed, *in situ* and/or solution hybridization, autoradiographic and immunocytochemical studies have shown that NK<sub>3</sub> receptors are located mainly on dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (Stoessl & Hill, 1990; Stoessl, 1994 ; Bannon & Whitty, 1995 ; Whitty *et al.*, 1995 ; Shughrue *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 1998) while NK<sub>1</sub> receptors are mostly located on GABAergic neurons of the substantia nigra pars reticulata (Sivam & Krause, 1992 ; Stoessl, 1994 ; Bannon & Whitty, 1995). Furthermore, an *in vitro* electrophysiological study revealed that the NK<sub>1</sub> agonist, [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP, activates non-dopaminergic neurons (presumably GABAergic which represent about 9% of neurons) in the guinea-pig SN pars compacta ; in contrast, the NK<sub>3</sub> agonist, senktide, activates dopaminergic neurons (the large majority with 78% of neurons) of the same area. In the latter study, the selectivity of the response to

agonists was further confirmed with specific antagonists (Nalivaiko *et al.*, 1997). An *in vivo* microdialysis approach in guinea-pig has shown that senktide injected in the SN pars compacta evokes an increase of extracellular dopamine concentration in the striatum which was blocked by a selective NK<sub>3</sub> antagonist (Marco *et al.*, 1998). Thus, the heart rate response induced by the NK<sub>1</sub> agonist [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP could result from the activation of a GABAergic pathway, possibly the nigro-thalamo-cortico-striatal loop while that induced by the NK<sub>3</sub> agonist senktide may result from the direct activation of the nigro-striatal dopaminergic pathway. Further studies are required to confirm this hypothesis.

In conclusion, by using highly selective tachykinin receptor agonists and antagonists, it was shown that the activation of NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors in the SN leads to consistent tachycardia by a mechanism independent of behavioural activity and changes in blood pressure. It is suggested that the activation of the NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors into the SN evoked a tachycardia by enhancing the sympatho/adrenal drive to the heart while the NK<sub>1</sub> agonist-induced tachycardia results from a reduction of the vagal tone in coordination with an increase of cardiac sympathetic nervous activity. Thus, this study provides the first pharmacological evidence that tachykinin receptors in the substantia nigra are potentially involved in the central autonomic modulation of cardiac activity.

### Acknowledgements

Authors acknowledge Dr. C. Garret (Rhone Poulenc, France), Dr. J. C. Brelière (Sanofi Recherche, France) and Dr. J. L. Fauchère (Institut de recherches Servier, France) for the donation of RP67580, SR48968 and R-820, respectively. A. Lessard holds research traineeships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and FRSQ-FCAR program. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MT-14379).

## References

- ADVENIER, C., ROUISSI, N., NGUYEN, Q.T., EMONDS-ALT, X., BRELIERE, J.C., NELIAT, G., NALINE, E. & REGOLI, D. (1992). Neurokinin A (NK-2) receptor revisited with SR 48968, a potent non peptide antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**,1418-1424.
- BANNON, M.J. & WHITTY, C.J. (1995). Neurokinin receptor gene expression in substantia nigra : localization, regulation, and potential physiological significance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**,866-870.
- BARBEAU, A., GILLO-JOFFROY, L., BOUCHER, R., NOWACZYNSKI, W. & GENEST, J. (1969). Renin-aldosterone system in Parkinson's disease. *Science*, **165**,291-292.
- BAULMANN, J., SPITZNAGEL, H., HERDEGEN, T., UNGER, Th. & CULMAN, J. (2000). Tachykinin receptor inhibition and c-fos expression in the rat brain following formalin-induced pain. *Neuroscience*, **95 (3)**, 813-820.
- CELLIER, E., BARBOT, L., IYENGAR, S. & COUTURE, R. (1999). Characterization of central and peripheral effects of septide with the use of five tachykinin NK<sub>1</sub> receptor antagonists in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **127**,717-728.

- CELLIER, E., BARBOT, L., REGOLI, D. & COUTURE, R. (1997). Cardiovascular and behavioural effects of intracerebroventricularly administered tachykinin NK<sub>3</sub> receptor antagonists in the conscious rat. *Br. J. Pharmacol.*, **122**, 643-654.
- CELLIER, E. & COUTURE, R. (1997). Mechanism of cardiovascular and behavioural responses to central NK-3 receptor activation in conscious rat. *In International Tachykinin Conference : Tachykinins in Health and Disease, Cairns (Australia), September 7-11, Abstract book*, p.40.
- CHEN, L.-W., GUAN, Z.-L. & DING, Y.-Q. (1998). Mesencephalic dopaminergic neurons expressing neuromedin K receptor (NK<sub>3</sub>) : a double immunocytochemical study in the rat. *Brain Res.*, **780**, 150-154.
- COUTURE, R., TOMA, N. & BARBOT, L. (2000). SR142801 behaves as a tachykinin NK-3 receptor agonist on a spinal nociceptive reflex in the rat. *Life Sci.*, **66(1)**, 51-65.
- CULMAN, J., KLEE, S., OHLENDORF, C. & UNGER, Th. (1997). Effect of tachykinin receptor inhibition in the brain on cardiovascular and behavioral responses to stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280 (1)**, 238-246.
- CULMAN, J. & UNGER, Th. (1995). Central tachykinins : mediators of defence reaction and stress reactions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**, 885-891.

- DÉCARIE, A. & COUTURE, R. (1992). Characterization of the peripheral action of neuropeptide K on the rat cardiovascular system. *Eur. J. Pharmacol.*, **213**, 125-131.
- EMONDS-ALT, X., BICHON, D., DUCOUX, J.P., HEAULME, M., MILOUX, B., PONCELET, M., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., VILAIN, P., NELIAT, G., SOUBRIE, P., LE FUR, G. & BRELIERE, J.C. (1995). SR 142801, the first potent non-peptide antagonist of the tachykinin NK<sub>3</sub> receptor. *Life Sci.*, **56 (1)**, 27-32.
- EMONDS-ALT, X., VILAIN, P., GOULAOUIC, P., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., ADVENIER, C., NALINE, E., NELIAT, G., LEFUR, G. & BRELIERE, J.C. (1992). A potent and selective non peptide antagonist of the neurokinin A (NK-2) receptor. *Life Sci.*, **50**, PL101-PL106.
- FUTAMI, T., HATANAKA, Y., MATSUSHITA, K. & FURUYA, S. (1998). Expression of substance P receptor in the substantia nigra. *Mol. Brain Res.*, **54**, 183-198.
- GARRET, C., CARRUETTE, A., FARDIN, V., MOUSSAOUI, S., PEYRONEL, J.F., BLANCHARD, J.C. & LADURON, P.M. (1991). Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10208-10212.
- GERFEN, C.R. (1992). The neostriatal mosaic : multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Ann. Rev. Neurosci.*, **15**, 285-320.

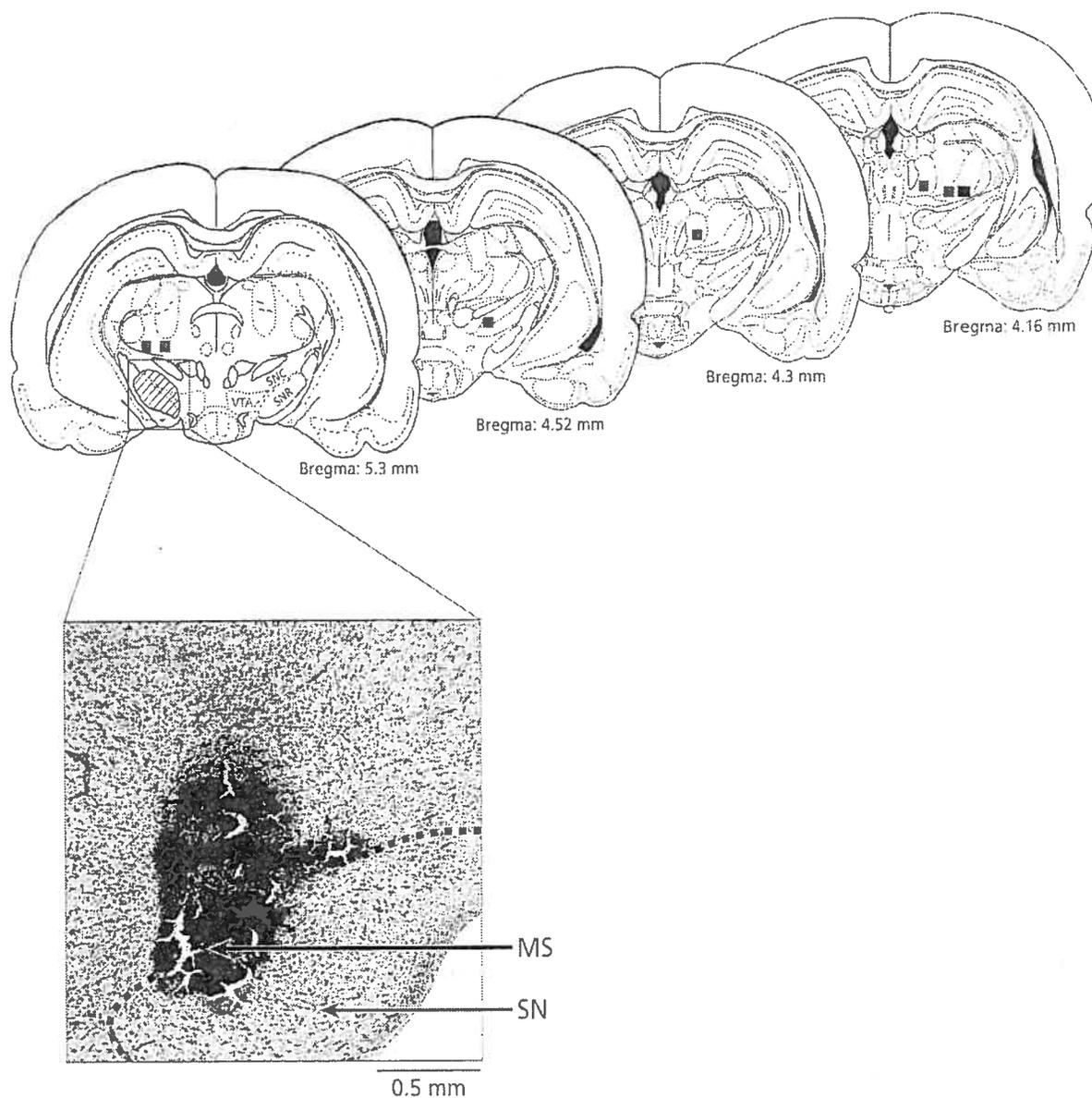
- HELKE, C.J., KRAUSE, J.E., MANTYH, P.W., COUTURE, R. & BANNON, M.J. (1990). Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms. *The FASEB journal*, **4**, 1606-1615.
- HUMPEL, C. & SARIA, A. (1993). Intranigral injection of selective neurokinin-1 and neurokinin-3 but not neurokinin-2 receptor agonists biphasically modulate striatal dopamine metabolism but not striatal preprotachykinin-A mRNA in the rat. *Neurosci. Lett.*, **157**, 223-226.
- HUMPEL, C. & SARIA, A. (1989). Effects of GABA and L-glutamic acid on the potassium-evoked in vitro release of substance P and neurokinin A-like immunoreactivities are different in the rat striatum and substantia nigra. *Neurosci. Lett.*, **105**, 159-163.
- HUMPEL, C., SARIA, A. & REGOLI, D. (1991). Injection of tachykinins and selective neurokinin receptor ligands into the substantia nigra reticulata increases striatal dopamine and 5-hydroxytryptamine metabolism. *Eur. J. Pharmacol.*, **195**, 107-114.
- JESSELL, T.M. (1978). Substance P release from the rat substantia nigra. *Brain Res.*, **151**, 469-478 .
- LIN, M.-T. & YANG, J.-J. (1994). Stimulation of the nigrostriatal dopamine system produces hypertension and tachycardia in rats. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 35)*, **266**, H2489-H2496.

- LINDEFORS, N., BRODIN, E., TOSSMAN, U., SEGOVIA, J. & UNGERSTEDT, U. (1989). Tissue levels and *in vivo* release of tachykinins and GABA in striatum and substantia nigra of rat brain after unilateral striatal dopamine denervation. *Expl. Brain Res.*, **74**, 527-534.
- LINTHORST, A.C.E., van GIERBERGEN, P.L.M., GRAS, M., VERSTEEG, D.H.G. & DE JONG, W. (1994). The nigrostriatal dopamine system : role in the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.*, **639**, 261-268.
- MARCO, N., THIRION, A., MONS, G., BOUGAULT, I., LE FUR, G., SOUBRIÉ, P. & STEINBERG, R. (1998). Activation of dopaminergic and cholinergic neurotransmission by tachykinin NK<sub>3</sub> receptor stimulation : an *in vivo* microdialysis approach in guinea pig. *Neuropeptides*, **32** (5), 481-488.
- MICIELI, G., MARTIGNONI, E., CAVALLINI, A., SANDRINI, G. & NAPPI, G. (1987). Postprandial and orthostatic hypotension in Parkinson's disease. *Neurology*, **37**, 386-393.
- NALIVAIKO, E., MICHAUD, J-C., SOUBRIÉ, P., LE FUR, G. & FELTZ, P. (1997). Tachykinin neurokinin-1 and neurokinin-3 receptor-mediated responses in guinea-pig substantia nigra : an *in vitro* electrophysiological study. *Neuroscience*, **78** (3), 745-757.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Toronto, Canada, Harbourt Brace Jovanovich.

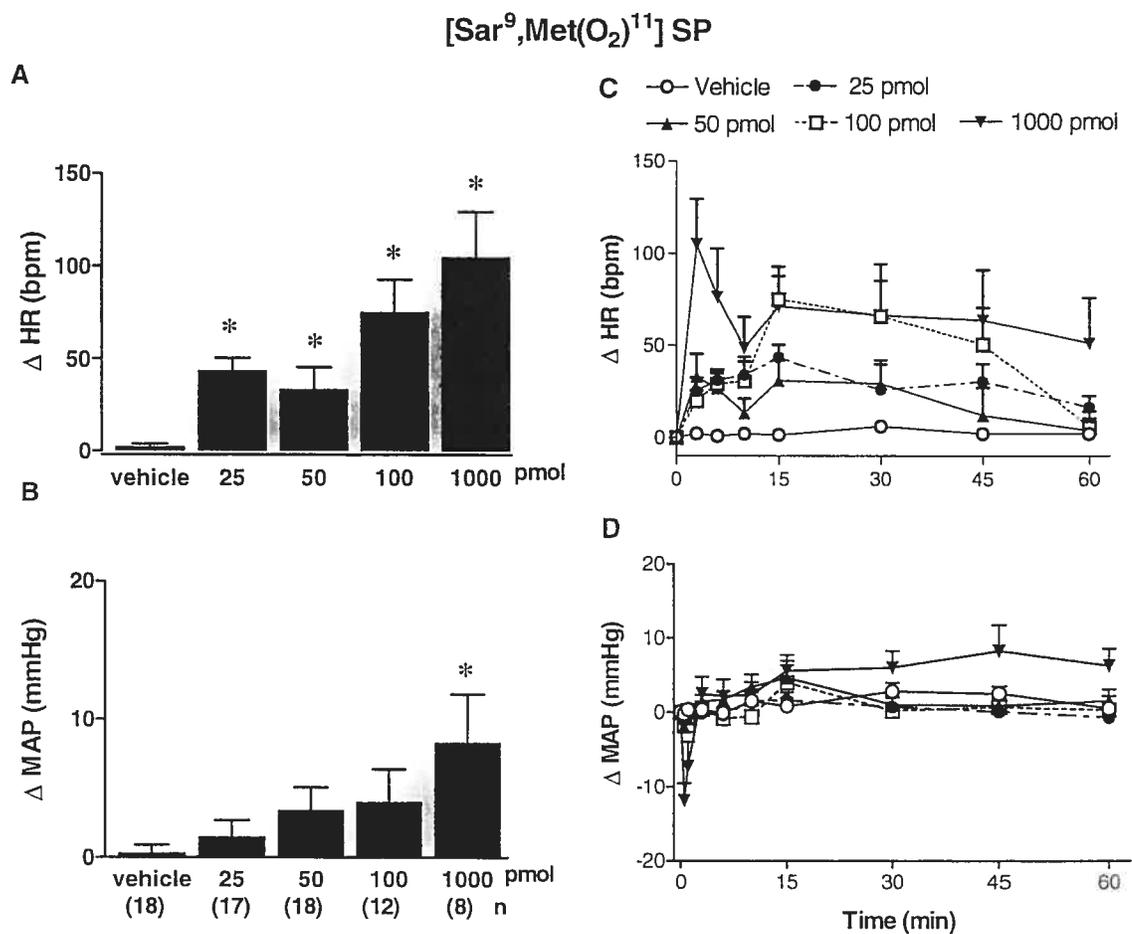
- PICARD, P., REGOLI, D. & COUTURE, R. (1994). Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered tachykinins in the rat : characterization of receptors with selective antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, **112**,240-249.
- REGOLI, D., DRAPEAU, G., DION, S. & COUTURE, R. (1988). New selective agonists for neurokinin receptors : pharmacological tools for receptor characterization. *Trends Pharmacol.Sci.*, **9**,290-295.
- REGOLI, D., NGUYEN, Q.T. & JUKIC, D. (1994). Neurokinin receptor subtypes characterized by biological assays. *Life Sci.*, **54**,2035-2047.
- REID, M.S., HERRERA-MARSCHITZ, M., HÖKFELT, T., LINDEFORS, N., PERSSON, H. & UNGERSTEDT, U. (1990). Striatonigral GABA, dynorphin, substance P and neurokinin A modulation of nigrostriatal dopamine release : evidence for direct regulatory mechanisms. *Exp. Brain Res.*, **82**,293-303.
- ROVERO, P., PESTELLINI, V., PATACCHINI, R., GIULIANI, S., SANTICIOLI, P., MAGGI, C.A., MELI, A. & GIACHETTI, A. (1989). A potent and selective agonist for the NK-2 tachykinin receptor. *Peptides*, **10**,593-595.
- SHUGHRUE, P.J., LANE, M.V. & MERCHENTHALER, I. (1996). *In situ* hybridization analysis of the distribution of neurokinin-3 mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, **372**,395-414.

- SIVAM, S.P. & KRAUSE, J.E. (1992). Tachykinin systems in the spinal cord and basal ganglia : influence of neonatal capsaicin treatment or dopaminergic intervention on levels of peptides, substance P-encoding mRNAs, and substance P receptor mRNA. *J. Neurochem.*, **59** (6), 2278-2284.
- STOESSL, A.J. (1994). Localization of striatal and nigral tachykinin receptors in the rat. *Brain Res.*, **646**,13-18.
- STOESSL, A.J., BRACKSTONE, M., RAJAKUMAR, N. & GIBSON, C.J. (1995). Pharmacological characterization of grooming induced by a selective NK-1 tachykinin receptor agonist. *Brain Res.*, **700**,115-120.
- STOESSL, A.J. & HILL, D.R. (1990). Autoradiographic visualization of NK-3 tachykinin binding sites in the rat brain, utilizing [<sup>3</sup>H]senktide. *Brain Res.*, **534**,1-7.
- STOESSL, A.J., POLANSKI, E. & FRYDRYSZAK, H. (1993). Effects of ageing on tachykinin function in the basal ganglia. *Brain Res.*, **632**,21-28.
- UNGER, Th., CAROLUS, S., DEMMERT, G., GANTEN, D., LANG, R.E., MASER-GLUTH, C., STEINBERG, H. & VEELKEN, R. (1988). Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat : pharmacological characterization. *Circ. Res.*, **63**,812-820.
- VAN DEN BUUSE, M., LINTHORST, A.C.E., VERSTEEG, D.H.G. & DE JONG, W. (1991). Role of brain dopamine systems in the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exp. Hyp.*, **A13** (5),653-659.

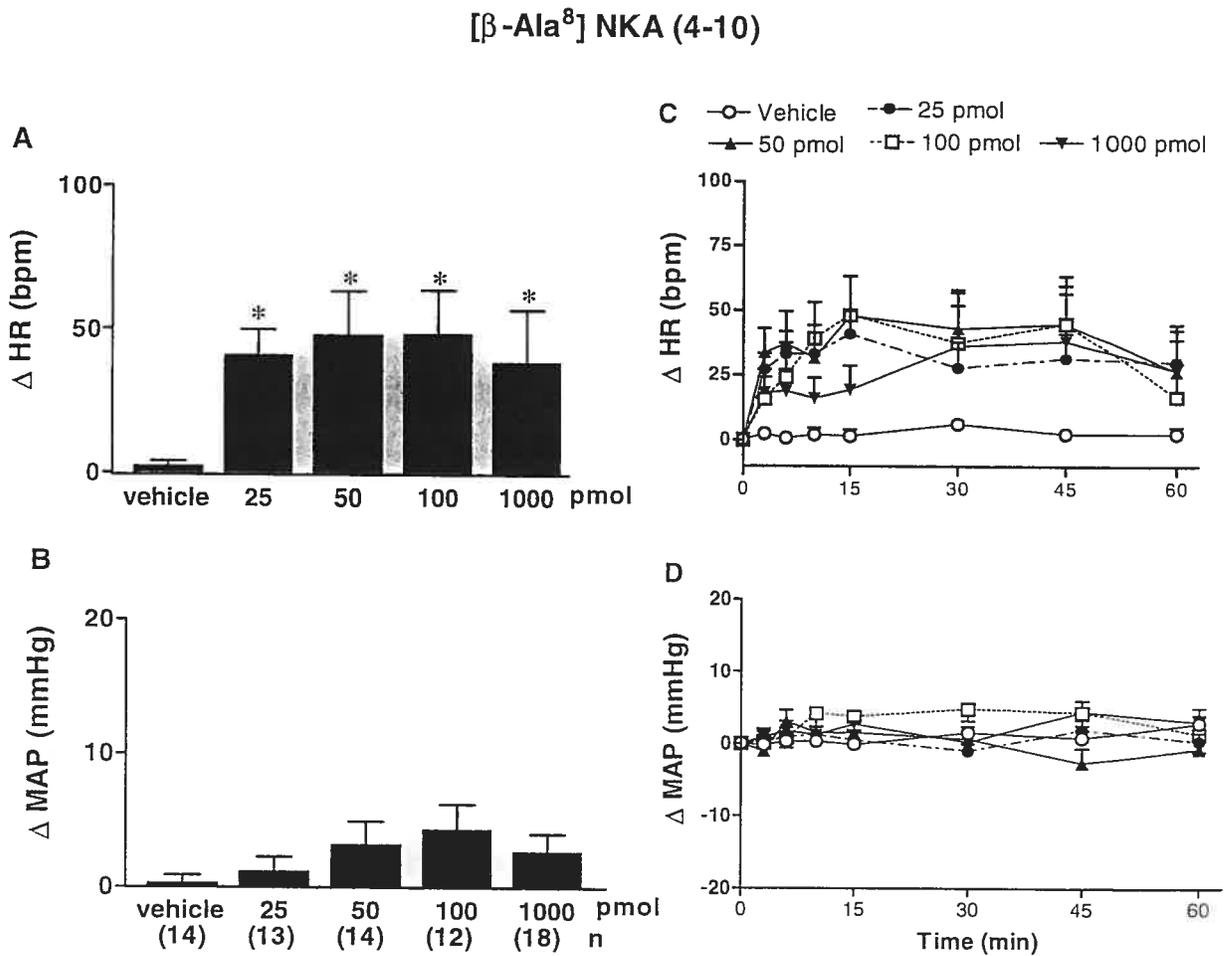
- WHITTY, C.J., WALKER, P.D., GOEBEL, D.J., POOSCH, M.S. & BANNON, M.J. (1995). Quantitation, cellular localization and regulation of neurokinin receptor gene expression within the rat substantia nigra. *Neuroscience*, **64** (2), 419-425.
- WÖRMSE, U., LAUFER, R., HART, Y., CHOREV, M., GILON, C. & SELINGER, Z. (1986). Highly selective agonists for substance P receptor subtypes. *EMBO J.*, **5**, 2805-2808.
- ZERARI, F., DION, S., KARPITSKIY, V., KRAUSE, J. & COUTURE, R. (1996). Immunocytochemical localization of tachykinin NK-2 receptors (NK-2R) in the rat central nervous system (CNS). In international multidisciplinary symposium : Peptide Receptors, Montreal (Canada), July 28-August 1, Abstract book, p.39.



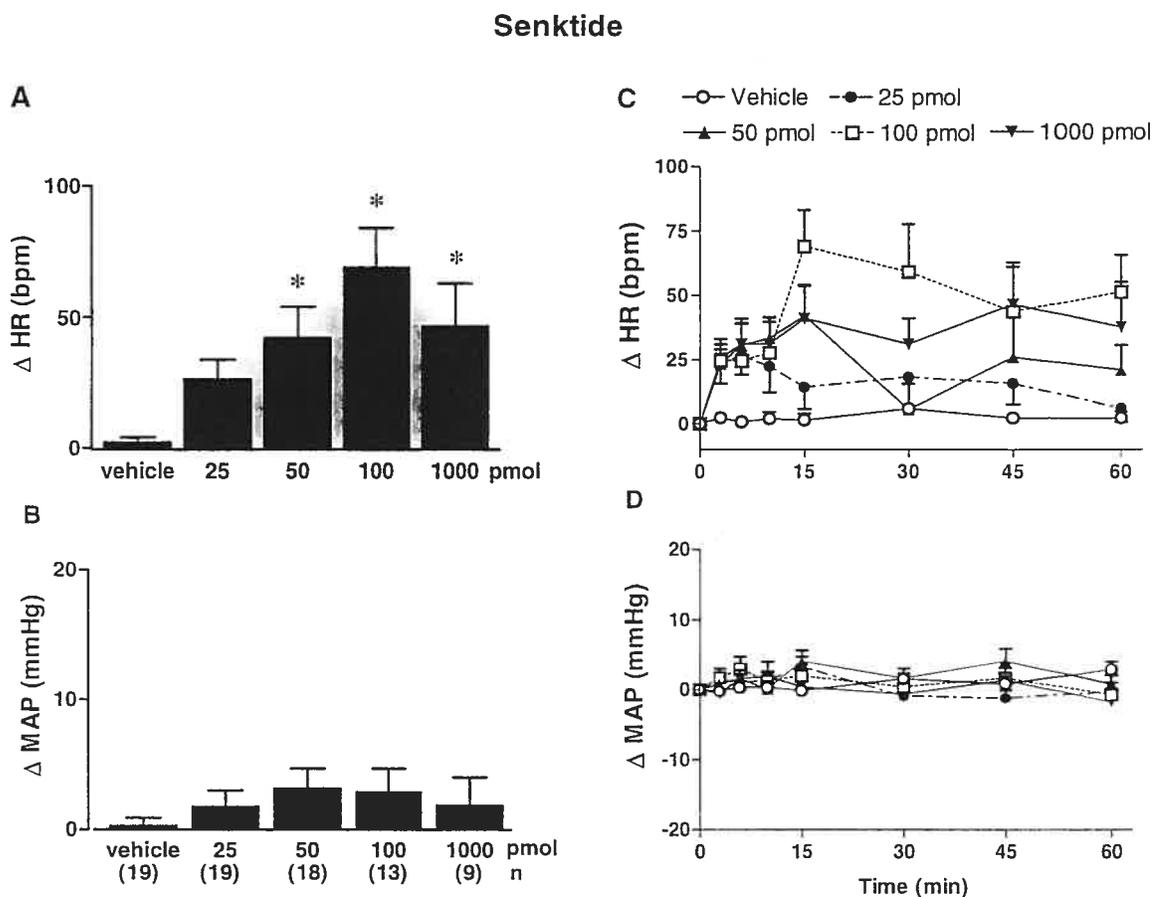
**Figure 1:** Identification of the microinjection sites in the substantia nigra (SN) (shaded areas) following post-mortem histological examination of microinjected Evans's blue ( $0.1 \mu\text{l}$  bilaterally). The hatched zone represents accepted microinjection sites and the squares represent microinjection sites ( $n=7$ ) excluded from the results and kept as a negative control. A rat was considered successfully injected when both cannula tips were shown to be slightly above SN or within a distance of 0.5 mm of the SN (AP= 5.3 mm posterior to the bregma) (Paxinos & Watson, 1986). Abbreviations : MS, microinjection site ; SN, substantia nigra ; SNC, SN pars compacta ; SNR, SN pars reticulata ; VTA, ventral tegmental area. Scale : 0.5 mm.



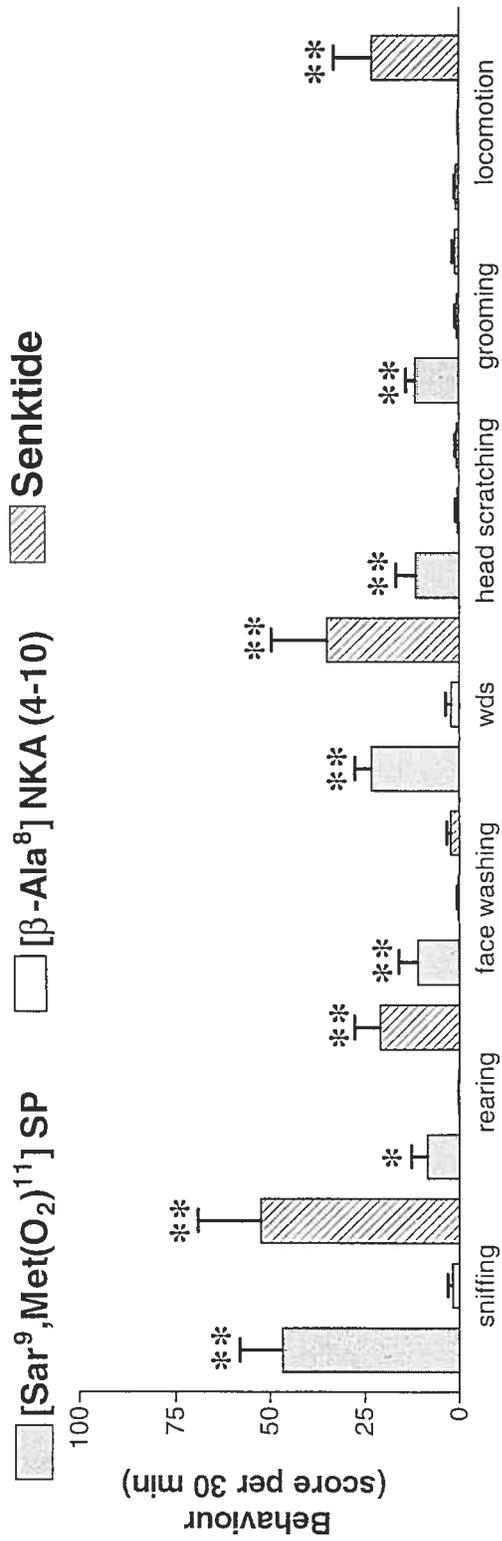
**Figure 2:** Maximal changes (A,B) and time-course effects (C,D) on heart rate ( $\Delta$  HR, A,C) and mean arterial pressure ( $\Delta$  MAP, B,D) following bilateral SN microinjection of vehicle (aCSF) or increasing doses of the NK<sub>1</sub> agonist [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP from 25 pmol to 1 nmol in conscious rats. Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of (n) rats. Comparison to vehicle values is indicated by \*P < 0.05 (one-way ANOVA followed by a test of Bonferroni). Basal values were : MAP: 105  $\pm$  8 mmHg and HR : 347  $\pm$  12 bpm.



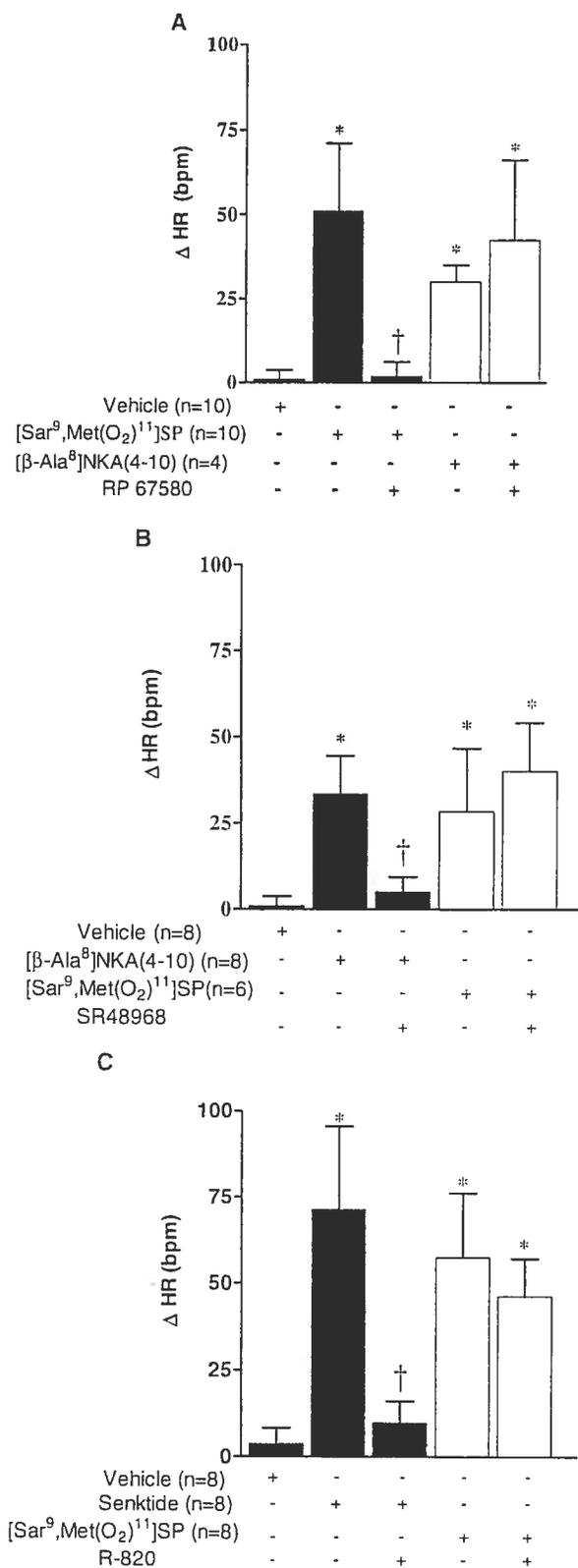
**Figure 3:** Maximal changes (A,B) and time-course effects (C,D) on heart rate ( $\Delta$  HR, A,C) and mean arterial pressure ( $\Delta$  MAP, B,D) following bilateral SN microinjection of vehicle (aCSF with 5-10 % DMSO) or increasing doses of the NK<sub>2</sub> agonist [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) from 25 pmol to 1 nmol in conscious rats. Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of (n) rats. Comparison to vehicle values is indicated by \* $P < 0.05$  (one-way ANOVA followed by a test of Bonferroni). Basal values were : MAP :  $108 \pm 4$  mmHg and HR :  $339 \pm 13$  bpm.



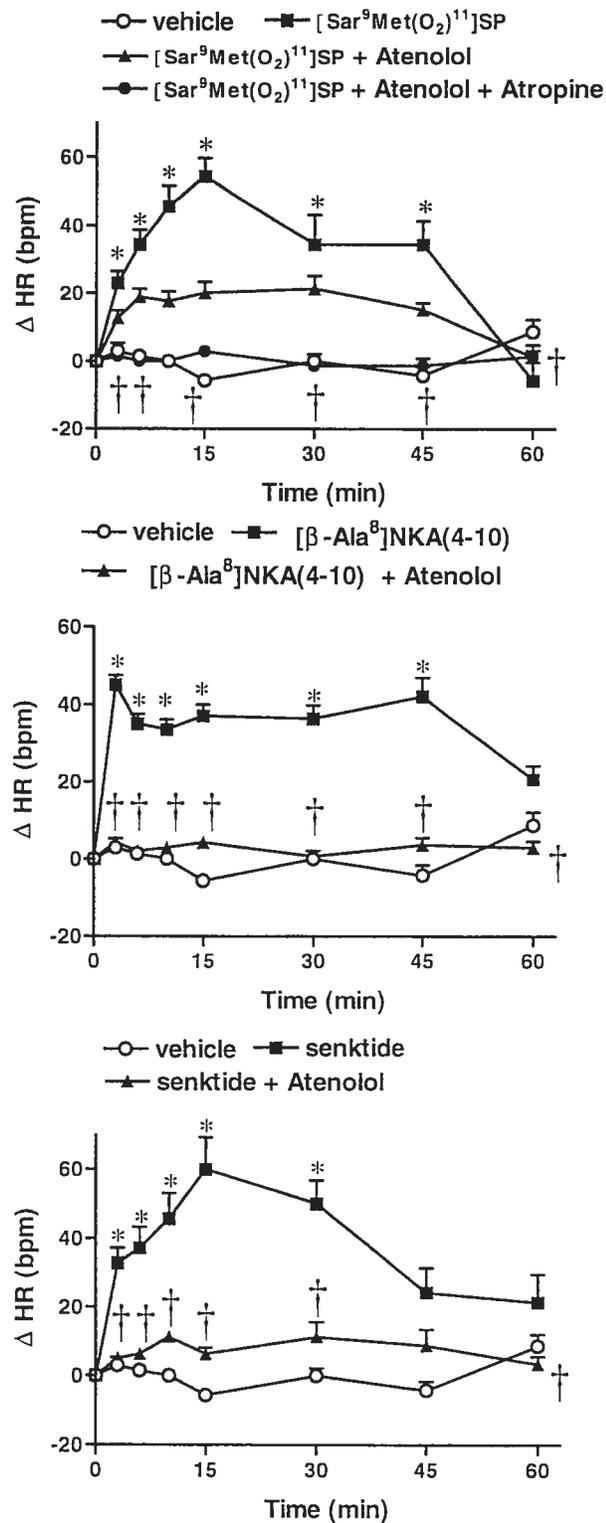
**Figure 4:** Maximal changes (A,B) and time-course effects (C,D) on heart rate ( $\Delta$  HR, A,C) and mean arterial pressure ( $\Delta$  MAP, B,D) following bilateral SN microinjection of vehicle (aCSF with 10% DMSO) or increasing doses of the NK<sub>3</sub> agonist senktide from 25 pmol to 1 nmol in conscious, unrestrained rats. Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of (n) rats. Comparison to vehicle values is indicated by \* $P < 0.05$  (one-way ANOVA followed by a test of Bonferroni). Basal values were : MAP :  $107 \pm 4$  mmHg and HR :  $343 \pm 14$  bpm.



**Figure 5:** Bar graphs showing maximum behavioural response (score per 30 min) including sniffing, rearing, face washing, wet dog shakes (wds), head scratching, grooming and locomotion following bilateral SN microinjection of 1 nmol of [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (n=8), [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (n=18) and senktide (n=13). Each bar represents the mean ± s.e.mean of (n) rats. \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 when compared to vehicle values (n=18, not shown as close to zero values) with a Kruskal-Wallis test.



**Figure 6:** Bar graphs showing maximum heart rate responses ( $\Delta$ HR) following bilateral SN microinjection of [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (25 pmol in A and B or 50 pmol in C), [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (25 pmol) and senktide (50 pmol) in the absence (-) and presence (+) of (A) RP67580 (250 pmol), (B) SR 48968 (250 pmol) and (C) R-820 (500 pmol) in conscious rats. Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of (n) rats. Statistical comparison was made to vehicle values (\*P < 0.05) or to the agonist alone (†P < 0.05), using one-way ANOVA followed by a test of Bonferroni.



**Figure 7:** Time-course effects on changes in heart rate ( $\Delta$ HR) following bilateral SN microinjection of vehicle (aCSF + 10% DMSO,  $n=7-14$ ), A [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (100 pmol,  $n = 7$ ), B [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (100 pmol,  $n = 14$ ) and C senktide (100 pmol,  $n=7$ ) in the absence or presence of atenolol (5 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.) or a combination of atenolol (5 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.) and atropine (1 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.) in conscious rats. Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of ( $n$ ) rats. Statistical comparison was made to vehicle values (\* $P < 0.05$ ) or to the agonist alone ( $\dagger P < 0.05$ ) (two-way ANOVA followed by a test of Bonferroni).

## **CHAPITRE III**

### **DEUXIÈME ARTICLE**

#### **IMPLICATION OF NIGRAL TACHYKININ NK-3 RECEPTORS IN THE MAINTENANCE OF HYPERTENSION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS: A PHARMACOLOGIC AND AUTORADIOGRAPHIC STUDY**

**<sup>1</sup>Andrée Lessard, <sup>1</sup>Maria M. Campos, <sup>2</sup>Witold Neugebauer & <sup>1</sup>Réjean  
Couture**

<sup>1</sup>Département de Physiologie, Faculté de Médecine, Université de  
Montréal, Montréal, Québec, Canada and <sup>2</sup>Institut de Pharmacologie, Faculté de  
Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

**Br. J. Pharmacol., 138 (2003) 554-563**

## Résumé de l'étude

Le but de cette étude est de déterminer l'influence des tachykinines de la substance noire dans la régulation centrale des fonctions cardiovasculaires chez le rat spontanément hypertendu (SHR). Les agonistes et les antagonistes sélectifs aux trois récepteurs des tachykinines ont été injectés dans la substance noire des SHR et de leur témoin Wistar-Kyoto (WKY) pour fin de comparaison avec les réponses obtenues dans la première étude avec les souches de rat normotendus Wistar. Chez le SHR, l'administration intranigrale de l'agoniste NK<sub>1</sub>, à 25 pmol, a provoqué une tachycardie et une augmentation significative de la pression artérielle. L'agoniste NK<sub>2</sub> a augmenté la fréquence cardiaque de façon similaire chez le SHR et le rat Wistar. Enfin, l'agoniste NK<sub>3</sub> n'a provoqué aucun effet cardiovasculaire ou comportemental significatif chez le SHR. Les antagonistes des récepteurs NK<sub>1</sub> (RP 67580) et NK<sub>2</sub> (SR 48968) n'ont provoqué aucun effet cardiovasculaire significatif chez les rats Wistar et SHR. Toutefois, l'antagoniste des récepteurs NK<sub>3</sub> (R-820) a réduit significativement la pression artérielle moyenne chez le SHR. Le même traitement n'a produit aucun changement de pression artérielle chez le rat Wistar et WKY.

L'observation des coupes histologiques en *post-mortem* a permis d'établir que les SHR dont le site d'injection se situe à l'extérieur de la substance noire ne manifestent aucun effet anti-hypertenseur suite à l'injection du R-820. De plus, l'injection i.c.v. et i.v.

de la même dose de R-820 n'a causé aucun changement cardiovasculaire chez le SHR, confirmant l'origine intra-nigrale de son effet anti-hypertenseur.

Une étude de liaison en autoradiographie a été réalisée pour vérifier si l'absence d'effet cardiovasculaire suite à l'injection intra-nigrale de l'agoniste des récepteurs NK<sub>3</sub> (senktide) chez le SHR était due à une diminution de l'affinité et/ou du nombre de récepteurs. Les résultats ont montré que la densité totale des sites de liaison du récepteur NK<sub>3</sub> ainsi que l'affinité du ligand radioactif pour le récepteur n'étaient pas altérées chez le SHR comparativement au WKY, et ce pour quatre régions du cerveau : la substance noire, l'aire tegmentale ventrale, l'amygdale et l'hippocampe. Afin de concilier ces résultats avec l'effet anti-hypertenseur de l'antagoniste NK<sub>3</sub> (R-820), nous proposons que les récepteurs NK<sub>3</sub> sont déjà occupés par leur ligand endogène dans la substance noire des SHR. Nous avançons l'hypothèse qu'il existerait une activation tonique de la voie dopaminergique nigrostriée par les tachykinines endogènes suite à l'activation des récepteurs NK<sub>3</sub> situés sur les corps cellulaires dopaminergiques de la portion compacte de la substance noire.

En conclusion, cette étude suggère un rôle pour les récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines de la substance noire dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR.

1. The role of nigral tachykinin NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors in central cardiovascular regulation was studied by measuring the effects of selective agonists and antagonists on mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) after bilateral microinjection into the substantia nigra of spontaneously hypertensive rats (SHR). Quantitative *in vitro* autoradiography was also performed in the midbrain of SHR and Wistar-Kyoto (WKY) with the NK<sub>3</sub> receptor ligand [<sup>125</sup>I]-HPP-Senktide.
2. Tachycardia was elicited by the NK<sub>1</sub> ([Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP) and NK<sub>2</sub> ([β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10)) agonists at 25 and 100 pmol while the NK<sub>3</sub> agonist (senktide, 50 and 100 pmol) had no significant effect. The three agonists had no effect on behaviour, and increases in MAP were elicited by the NK<sub>1</sub> agonist only.
3. Whereas antagonists at NK<sub>1</sub> (RP 67580, 500 pmol) and NK<sub>2</sub> (SR 48968, 500 pmol) receptors had no significant effect on MAP and HR, the NK<sub>3</sub> antagonist (R-820, 500 pmol) reduced MAP for over 3 h in SHR. That anti-hypertensive effect did not occur after intracerebroventricular or intravenous injection of R-820. Also, R-820 had no cardiovascular effect in WKY.
4. The affinity (K<sub>D</sub> : 0.7 nM) and densities of specific NK<sub>3</sub> receptor binding sites measured in the substantia nigra, ventral tegmental area, hippocampus and amygdala were not significantly different in SHR and WKY.
5. It is concluded that endogenous tachykinins exert a tonic activity on NK<sub>3</sub> receptors in the substantia nigra of SHR to maintain high blood pressure.

Hence, nigral tachykinin NK<sub>3</sub> receptors may represent a promising therapeutic target in the treatment of arterial hypertension.

**Key words:** tachykinins, NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> receptors, substantia nigra, central autonomic regulation, hypertension.

**Abbreviations:** aCSF, artificial cerebrospinal fluid; ANOVA, analysis of variance; HR, heart rate; i.c.v., intracerebroventricular; i.v., intravenous; MAP, mean arterial blood pressure; NKA, neurokinin A; SHR, spontaneously hypertensive rats; SN, substantia nigra ; SP, substance P; WKY, Wistar-Kyoto.

## Introduction

Compelling evidence suggests a role for tachykinin receptors in central autonomic cardiovascular regulation (Unger *et al.*, 1988; Culman & Unger, 1995; Culman *et al.*, 1997; Cellier *et al.*, 1997; 1999) and in the modulation of the nigro-striatal dopaminergic system (Reid *et al.*, 1990; Humpel *et al.*, 1991; Humpel & Saria, 1993; Bannon & Whitty, 1995; Nalivaiko *et al.*, 1997; Marco *et al.*, 1998). Tachykinins are known to modulate nigro-striatal dopaminergic neurons by stimulating the release, turnover and metabolism of striatal dopamine *via* the activation of neurokinin-1 (NK<sub>1</sub>) and neurokinin-3 (NK<sub>3</sub>) receptors in the substantia nigra (SN) (Reid *et al.*, 1990; Humpel *et al.*, 1991; Humpel & Saria, 1993; Bannon & Whitty, 1995; Marco *et al.*, 1998). Autoradiographic, immunohistochemical, *in situ* and/or solution hybridization and single cell reverse transcription-polymerase chain reaction techniques have shown the presence of substance P (SP) and neurokinin A (NKA) containing nerve terminals and tachykinin NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptors and/or their mRNA in the SN (Helke *et al.*, 1990; Stoessl & Hill, 1990; Stoessl, 1994; Bannon & Whitty, 1995; Whitty *et al.*, 1995; Shughrue *et al.*, 1996; Futami *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Ribeiro-Da-Silva *et al.*, 2000). Also, SP and NKA are released *in vivo* (Lindefors *et al.*, 1989) and *in vitro* (Jessel, 1978; Humpel & Saria, 1989) in the SN from striato-nigral projecting neurons.

Lesion of the nigro-striatal dopaminergic pathway attenuates the development of hypertension in young spontaneously hypertensive rats (SHR) that

points to a putative role for this neuronal pathway in the development of hypertension (Van den Buuse *et al.*, 1991; Linthorst *et al.*, 1994).

Previous studies have shown that central activation of tachykinin NK<sub>3</sub> receptors by i.c.v. injection of selective agonists (senktide or [MePhe<sup>7</sup>]NKB) leads to increases of mean arterial pressure, heart rate and behavioural activity in conscious rats (Itoi *et al.*, 1992; Picard *et al.*, 1994; Cellier *et al.*, 1997). Intravenous pre-treatment with the dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist haloperidol blocked those cardiovascular and behavioural changes and unmasked a vasopressin-dependent bradycardia (Cellier & Couture, 1997). Although anatomical and physiological studies suggest an interaction between tachykinins and the nigro-striatal dopamine pathway in normotensive rats, there is no information regarding the implication of tachykinins in hypertension at the level of the SN.

With the purpose to follow up the recent pharmacological evidence suggesting that the SN is a potential site of modulation of cardiac autonomic activity by tachykinins in the normotensive rat (Lessard & Couture, 2001), the present study was undertaken to assess the cardiovascular effects of selective tachykinin agonists and antagonists bilaterally injected into the SN of SHR. The respective agonists and antagonists were: [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (Regoli *et al.*, 1988) and RP 67580 (Garret *et al.*, 1991) for NK<sub>1</sub> receptors; [β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10) (Rovero *et al.*, 1989) and SR 48968 (Advenier *et al.*, 1992; Emonds-Alt *et al.*, 1992) for NK<sub>2</sub> receptors; senktide (Wörmser *et al.*, 1986) and R-820 (Regoli *et al.*, 1994) or SR 142801 (Emonds-Alt *et al.*, 1995) for NK<sub>3</sub> receptors. To avoid the spurious effects

of anaesthesia and the stress induced by immobilisation, these studies were carried out in awake, unrestrained rats. Moreover, *in vitro* autoradiography was performed to evaluate the density and dissociation constant ( $K_D$ ) of  $NK_3$  receptor binding sites in the SN and other midbrain areas of SHR and normotensive control Wistar-Kyoto rats (WKY).

## Methods

### *Animal source and care*

Male SHR (15 weeks,  $n = 88$ ) and age-matched WKY ( $n = 17$ ) were purchased 3-5 days prior to experiments from Charles River, St-Constant, Québec, Canada and housed four to five per cage under a 12h light-dark cycle in a room with controlled temperature (20°C), humidity (53%) with food (Charles River Rodent) and tap water available *ad libitum*. The care of animals and research protocols conformed to the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal Care and approved by the Animal Care Committee of our University.

### *Animal preparation*

Rats were anaesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of  $65 \text{ mg kg}^{-1}$  sodium pentobarbitone (Somnotol; M.T.C. Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada) and then positioned in a stereotaxic frame (David Kopf Instrumentation, Tujunga, CA, U.S.A.) with the incisor bar set at 3.3 mm below the interaural line. The skull was exposed, cleaned and a hole was drilled above each SN (coordinates : 5.3 mm posterior to the bregma, 2.0 mm lateral to the midline, 6.3 mm ventral from the skull surface for SHR and WKY ; Paxinos & Watson, 1998). Two 23-gauge stainless steel guide cannulae targeted 2 mm dorsal to each SN were implanted and fixed with two screws and dental cement to the skull. An additional group of SHR was implanted with one 23-gauge stainless steel guide

cannulae into the right lateral ventricle (coordinates : 1 mm posterior to the bregma, 1.4 mm lateral to the midline, 3.0 mm ventral from the skull surface, Paxinos & Watson, 1998). Stylets (31-gauge stainless steel) were inserted into the guide cannulae to avoid their obstruction and the loss of cerebrospinal fluid. Then, the skin was replaced and sutured. Animals were housed in individual plastic cages (40 cm x 23 cm x 20 cm) in the same controlled conditions and allowed to recover for 7 days. Then, the rats were re-anaesthetized with sodium pentobarbitone ( $65 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) and an intravascular siliconized (Sigmacote, Sigma-Aldrich Canada) polyethylene tubing PE-60 catheter (Intramedics, Clay Adams, NJ, U.S.A.), filled with physiological saline containing  $100 \text{ i.u. ml}^{-1}$  heparin sodium salt (Sigma-Aldrich Canada), was inserted into the abdominal aorta *via* the right femoral artery for direct blood pressure recording. The catheter was tunneled subcutaneously to emerge at the back of the neck. Another group of SHR was implanted with an intravenous (i.v.) siliconized polyethylene tubing PE-10 catheter, filled with physiological saline containing  $100 \text{ i.u. ml}^{-1}$  heparin sodium salt, into the right jugular vein for i.v. injection. The catheter was tunneled subcutaneously to emerge with the femoral catheter at the back of the neck. Before surgery, the animals received Ethacilin ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.m., rogar/S.T.B. Inc., London, Ontario, Canada) and Ketoprofen (anafen,  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.m., Merial Canada Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada). Recovery from anaesthesia was monitored closely under a warming lamp to maintain the body temperature of animals. Rats with apparent abnormal behaviour (lost of  $> 25 \%$  of body weight, anorexia, weaknesses) were immediately humanely killed with an overdose of

pentobarbitone. Thereafter, rats were housed individually in polyethylene cages with a top grid and returned to their resident room. Experimental protocols were initiated 48 h after the final intervention, in conscious and unrestrained rats.

#### *Measurement of cardiovascular parameters*

During all experiments, continuous direct recordings of blood pressure and heart rate were made respectively with a Statham pressure Transducer (P231D) and a cardiac tachometer (model 7P4) (triggered by the arterial blood pressure pulse) coupled to a Grass polygraph (model 79; Grass Instruments Co., Quincy, MA, U.S.A.). Cardiovascular responses were measured 1 h after the rats were transported to an isolated and quiet testing room where only the experimenter had access. Rats remained in their resident cage but the top grid was removed and had no more access to the food and water for the duration of the experiment which lasted for a period of 3-6 h. When resting blood pressure and heart rate were stable, microinjections were made simultaneously into each SN of undisturbed, freely moving rats using two hand-held Hamilton microsyringes (5  $\mu\text{l}$ , Fisher Scientific Ltd, Montréal, Québec, Canada) connected to 60 cm polyethylene tubing PE-10. Five to 10 min prior to injection, two 31-gauge stainless steel injectors, pre-connected to the PE-10 tubing, were inserted into the guide cannulae without handling the rats,. All solutions for microinjections were freshly prepared and injected (volume of 0.1  $\mu\text{l}$  in each SN, 1  $\mu\text{l}$  for i.c.v. and 1 ml  $\text{kg}^{-1}$  for i.v.) over a period of 1 min.

### *Measurement of behavioural parameters*

Behavioural activity was measured as previously reported (Picard *et al.*, 1994). Briefly, during every consecutive period of 15 s, a score of 1 or 0 was given systematically depending on whether the animal showed the specific type of behaviour or not, whatever its frequency, intensity or duration during that period. Summation of scores for the first 30 min period following SN injection gave the behavioural scores for face washing, grooming, sniffing and rearing. The maximal theoretical score was 120 (15 s intervals x 30 min). Wet dog shakes and locomotion (number of complete exploratory circles within the cage) behaviours were measured according to the number of episodes or frequency during the first 30 min period.

### *Histology*

At the end of the experiments, the rats received 0.1  $\mu$ l of Evans Blue dye (Sigma-Aldrich Canada) in each SN and they were immediately sacrificed with an overdose of sodium pentobarbitone. The brains were removed and fixed with 10% (v v<sup>-1</sup>) formalin and 20% (w v<sup>-1</sup>) sucrose. Coronal sections (40  $\mu$ m, cut on a freezing microtome) were mounted on glass slides and stained with cresyl violet for histological examination of the microinjection sites. Twenty-three out of 69 SHR (33 %) implanted in the SN were rejected either for evidence of cerebral haemorrhage (17 rats) or because the microinjection site was outside the accepted area (6 rats) (Figure 1). The latter 6 rats displayed no cardiovascular

effect to agonists (n = 2) or R-820 (n = 4). Thus, numbers indicated in results represent only rats which were included in the study.

### *Experimental protocols*

*Experiment 1 : cardiovascular effects of SN microinjection of selective tachykinin agonists* SHR (n=8) and WKY (n=3) received initially a microinjection of artificial cerebrospinal fluid (aCSF) into the SN followed 60 min later by the injection of 25 or 50 pmol of the selective NK<sub>1</sub> agonist [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP, the selective NK<sub>2</sub> agonist [β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10) and the selective NK<sub>3</sub> agonist senktide at random. Additional SHR received only the NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> agonists (n = 2) or only the NK<sub>3</sub> agonist (n = 3). The dose of 100 pmol of each agonist was given to four SHR at random and two additional rats received only NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> agonists. Only one dose of the same agonist was given to any animal. Agonists were injected at a minimum of 60 min intervals to enable blood pressure and heart rate to return to baseline values. Cardiovascular effects induced by agonists were not significantly different whatever their order of injection or if given alone or together to the same animal, suggesting the absence of cross desensitisation between the three agonists. Each dose refers to the summation of doses given on each side of the SN. Doses of agonists were chosen on the basis of our previous study in Wistar rats (Lessard & Couture, 2001).

*Experiment 2 : cardiovascular effects of SN microinjection of selective tachykinin antagonists*

In order to assess the contribution of endogenous tachykinins and their receptors, SHR were microinjected into the SN with one of the three antagonists (anti-NK<sub>1</sub>, RP 67580, 500 pmol, n = 5; anti-NK<sub>2</sub>, SR 48968, 500 pmol, n = 6 ; anti-NK<sub>3</sub>, R-820, 500 pmol, n = 12 or SR 142801, 500 pmol, n = 4). Each rat received only one antagonist and doses were chosen on the basis of their ability to block in a selective and reversible manner the cardiovascular effects induced by the over-mentioned tachykinin agonists following their SN injection in Wistar rats (Lessard & Couture, 2001).

Since intranigral microinjection of RP 67580 and SR 48968 had no cardiovascular effect in SHR (present study) and Wistar rats (Lessard & Couture, 2001) while R-820 reduced blood pressure in SHR, WKY received an intranigral microinjection of R-820 (500 pmol, n = 10) only. To control for the site of the anti-hypertensive action of R-820, two groups of SHR received R-820 into the right lateral ventricle (500 pmol, n = 8) and the right jugular vein (500 pmol, n = 6).

*Tissue preparation for autoradiography*

SHR (n = 5) and WKY (n = 4) used for autoradiography had previously received i.c.v. injection (500 pmol) of the NK<sub>1</sub> (RP 67580) and the NK<sub>2</sub> (SR 48968) antagonists which caused no cardiovascular effect in a parallel study. At least two days after the last i.c.v. injection, rats were sacrificed by an intra-arterial injection of an overdose of sodium pentobarbitone. Brains were immediately removed and frozen in 2-methyl butane cooled at - 45 to -55°C with liquid nitrogen, and then

stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Coronal sections ( $20\ \mu\text{m}$ ) were cut on a cryostat fixed at temperature varied between  $-11$  to  $-13\ ^{\circ}\text{C}$ . Slices were thaw-mounted on 0.2% gelatine/0.033% chromium potassium sulphate coated glass slides and stored at  $-80\ ^{\circ}\text{C}$ .

#### *Peptide iodination*

Iodination of HPP-Senkide was performed according to the chloramine T method (Hunter & Greenwood, 1962). Briefly,  $5\ \mu\text{g}$  of peptide were incubated in 0.05 M phosphate buffer for 30s in the presence of 0.5 mCi (18.5 MBq) of  $\text{Na}^{125}\text{I}$  and 220 nmol of chloramine T in a total volume of  $85\ \mu\text{l}$ . The monoiodinated peptide was then immediately purified by high pressure liquid chromatography on a C4 Vydac column ( $0.4 \times 250\ \text{mm}$ ) (The Separations Group, Hesperia, CA, USA) with 0.1% trifluoroacetic acid and acetonitrile as mobile phases. The specific activity of the iodinated peptide was calculated as  $2000\ \text{cpm}\ \text{fmol}^{-1}$  or  $1212\ \text{Ci}\ \text{mmol}^{-1}$ .

#### *In vitro receptor autoradiography*

Sections were thawed at room temperature, pre-incubated for 30 s in 25 mM PIPES buffer (pH 7.4;  $4^{\circ}\text{C}$ ) and incubated at room temperature for 90 min in 25 mM PIPES buffer (pH 7.4;  $4^{\circ}\text{C}$ ) containing: 1,10-phenanthroline 1 mM, dithiothreitol 1 mM, bacitracin 0.014%, captopril 0.1 mM, BSA 0.2 % (protease free) and magnesium chloride 7.5 mM in the presence of 0.7-1.7 nM of  $[\text{}^{125}\text{I}]\text{-HPP-Senkide}$  in order to construct a saturation curve. The non-specific binding was

determined in the presence of 1  $\mu\text{M}$  of unlabelled HPP-Senkide or senktide. At the end of the incubation period, slides were transferred sequentially through four rinses of 4 min each in 25 mM PIPES (pH 7.4, 4 °C) and dipped for 15 s in distilled water (4 °C) to remove the excess of salts and air-dried. [ $^3\text{H}$ ]-Hyperfilm was juxtaposed onto the slides in the presence of [ $^{125}\text{I}$ ]-microscales and exposed at room temperature for 24 h. The films were developed in D-19 (Kodak developer) and fixed in Kodak Ektaflo. Autoradiograms were quantified by densitometry using an image analysis system (MCID<sup>TM</sup>, Imaging Research Inc., Ontario, Canada). Standard curves from [ $^{125}\text{I}$ ]-microscales were used to convert density levels into femtomoles per milligram of tissue ( $\text{fmol mg}^{-1}$  tissue). Specific binding was determined by subtracting non-specific labelling from total binding taken from adjacent sections. Quantification of total and non-specific binding was made on 200 and 160 tissue sections in 5 SHR and 4 WKY, respectively that correspond to eight tissue sections per rat for each of the five concentrations of the radioligand. Anatomical parameters and nomenclature were determined according to Paxinos & Watson (1998).

[ $^{125}\text{I}$ ]-HPP-Senkide was chosen instead of [ $^3\text{H}$ ]-Senktide used in previous autoradiographic studies (Dam *et al.*, 1990; Stoessl & Hill, 1990; Stoessl, 1994; Langlois *et al.*, 2001) because the iodinated ligand has the advantage to display greater specific activity ( $1212 \text{ Ci mmol}^{-1}$ ) over the tritiated ligand ( $50\text{-}63.5 \text{ Ci mmol}^{-1}$ ). Hence, the time of tissue exposure to the [ $^3\text{H}$ ]-Hyperfilm can be reduced from 8-10 weeks with [ $^3\text{H}$ ]-Senktide to 1 day with [ $^{125}\text{I}$ ]-HPP-Senkide without affecting the selectivity of the agonist for the  $\text{NK}_3$  receptor.

### *Chemicals and materials*

The composition of aCSF was, in mM: NaCl 128.6, KCl 2.6, MgCl<sub>2</sub> 2.0 and CaCl<sub>2</sub> 1.4; pH adjusted to 7.2. [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP was obtained from Peninsula Lab. Inc. (San Carlos, CA, USA) while [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) and senktide were purchased from Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA, U.S.A.). The non-peptide antagonists RP 67580 (racemic form of 7,7-diphenyl-2[1-imino-2(2-methoxy-phenyl)-ethyl]perhydroisoindol-4-one (3aR, 7aR), SR 48968 ((S)-N-methyl-N-[4-(4-acetylamino-4-phenylpiperidino)-2-(3,4-dichlorophenyl)-butyl]benzamide) and SR 142801 ((S)-(N)-(1-(3-(1-benzoyl-3-(3,4-dichlorophenyl)piperidin-3-yl)propyl)-4-phenylpiperidin-4-yl)-N-methylacetamide) were provided by Dr. C. Garret (Rhone Poulenc, Paris, France) and X. Emonds-Alt (Sanofi Recherche, Montpellier, France), respectively. The antagonist R-820 (3-Indolyl-carbonyl-Hyp-Phg-N(Me)-Bzl) was generously provided by Dr. J.L. Fauchère (Servier, Paris, France). [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP was solubilized in aCSF while senktide, [β-Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) and all antagonists were solubilized in 1-15% (v v<sup>-1</sup>) DMSO (Fisher Scientific, Montréal, Québec, Canada). The solution was then completed with aCSF (i.c.v. and SN) or saline (i.v. injection) which contained 20% of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (Sigma-Aldrich Canada). Stock solutions (10 mg ml<sup>-1</sup>) of agonists and antagonists were stored in aliquots of 100 μl at -20°C until use. In all experiments, vehicle (aCSF containing 10 % DMSO) was injected as control and had no significant effect on any parameters when compared to baseline values. HPP-Senktide (3-4 hydroxyphenyl-propionyl-Asp-Asp-Phe-N-

MePhe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (MW:1006.5) is derived from the selective NK<sub>3</sub> receptor agonist senktide (Wörmser *et al.*, 1986). It was synthesized by W. Neugebauer (Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke, Canada). Autoradiographic [<sup>125</sup>I]-microscales (20 μm) and [<sup>3</sup>H]-Hyperfilm (single-coated, 24 x 30 cm) were purchased from Amersham Pharmacia Biotech Canada. Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulphonic-acid] (PIPES), 1,10-phenanthroline, dithiothreitol, bacitracin, captopril and bovine serum albumin (BSA) (protease free) were purchased from Sigma-Aldrich Canada.

#### *Statistical analysis of data*

Results are expressed as means ± s.e. mean of (n) rats. Results were analysed for statistical significance using a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures followed by Bonferroni confidence intervals. Statistical analysis for specific binding sites was performed with a Student's *t*-test for unpaired samples. Only probability values (P) less than 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

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

The effects on MAP and HR of two doses of [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP in SHR are shown in Figures 2A, 3A and 4B. [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (25 pmol and 100 pmol) evoked increases in HR and MAP which were significant ( $P < 0.05$ ) when compared to vehicle (aCSF) values ( $n = 8$ ). Thus, the tachycardia was significant at 25 pmol (5-45 min,  $n = 8$ ) and 100 pmol (5-15 min,  $n = 4$ ). The maximal rise in HR was  $71 \pm 24$  bpm (25 pmol, 30 min) and  $43 \pm 21$  bpm (100 pmol, 15 min). [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP produced an increase in MAP at 25 pmol (7-45 min,  $n = 8$ ) and 100 pmol (5-45 min,  $n = 4$ ) in SHR. The maximal rise in MAP was  $13 \pm 6$  mmHg (25 pmol, 30 min) and  $11 \pm 7$  mmHg (100 pmol, 15 min). There was no significant effect on behaviour. Baseline HR and MAP values were  $293 \pm 11$  bpm and  $160 \pm 7$  mmHg, respectively.

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

The effects on MAP and HR of two doses of [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) in SHR are shown in Figures 2B, 3B and 4C. [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) evoked a significant tachycardia ( $P < 0.05$ ) which was similar at 25 pmol (10-60 min,  $n = 10$ ) and 100 pmol (7-45 min,  $n = 6$ ) when compared to vehicle (aCSF with 7% DMSO) values ( $n = 10$ ). The maximal rise in HR was  $58 \pm 10$  bpm (25 pmol, 30 min) and  $40 \pm 19$  bpm (100 pmol, 45 min). [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (25 and 100 pmol) had no significant effect on MAP when compared to vehicle values. There was no significant effect

on behaviour. Baseline HR and MAP values were  $323 \pm 31$  bpm and  $161 \pm 9$  mmHg, respectively.

#### *Cardiovascular response induced by the NK<sub>3</sub> agonist senktide*

The effects on MAP and HR of two doses of senktide in SHR are shown in Figures 2C, 3C and 4D. Senktide at the dose of 50 pmol ( $n = 13$ ) and 100 pmol ( $n = 6$ ) had no significant effect on MAP and HR when compared to vehicle values ( $n = 13$ ). There was no significant effect on behaviour. Baseline HR and MAP values were  $338 \pm 25$  bpm and  $160 \pm 10$  mmHg, respectively.

#### *Effect of tachykinin agonists in WKY*

In WKY ( $n=3$ ), the NK<sub>1</sub> ( $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}] \text{SP}$ , 25 pmol), NK<sub>2</sub> ( $[\beta\text{-Ala}^8] \text{NKA}$  (4-10), 25 pmol) and NK<sub>3</sub> (senktide, 50 pmol) receptor agonists evoked increases in HR which were similar in amplitude and duration to the tachycardia measured in Wistar rats (Lessard & Couture, 2001). As observed in Wistar rats, 25 pmol of these agonists failed to alter MAP and behaviour in WKY (data not shown).

#### *Effects of tachykinin antagonists in SHR and WKY*

The effects on MAP of the NK<sub>1</sub> receptor antagonist RP 67580 (500 pmol,  $n = 5$ ) and the NK<sub>2</sub> receptor antagonist SR 48968 (500 pmol,  $n = 6$ ) in SHR are shown in Figure 5A. Neither of the two antagonists caused significant changes in MAP compared to vehicle values (aCSF with 10% DMSO,  $n = 6$ ). Both antagonists

also failed to alter HR (data not shown). Moreover, SN microinjection of the NK<sub>3</sub> antagonist SR 142801 (500 pmol, n = 4) was devoid of cardiovascular effect in this study (data not shown).

The effects on MAP of the NK<sub>3</sub> receptor antagonist R-820 (500 pmol) microinjected into the SN of SHR (n = 12) and WKY (n = 10) are shown in Figure 5B. Whereas R-820 failed to alter MAP when compared to vehicle values (aCSF with 10% DMSO, n = 12) in WKY, it reduced significantly ( $P < 0.05$ , 10 min-3h) MAP in SHR for a period that lasted over 3 h post-injection when compared to vehicle values (n = 12). The maximal fall in MAP was  $-18 \pm 5$  mmHg at 55 min. However, R-820 did not modify HR in both WKY and SHR (data not shown). Contrarily to SN microinjection, i.c.v. (500 pmol, n = 8) or intravenous (500 pmol, n = 6) injection of R-820 failed to elicit significant changes in MAP from time 0 to 3 h post-injection when compared to vehicle values (data not shown).

All tachykinin receptor antagonists tested in this study were devoid of behavioural activity in SHR and WKY. Four rats that had injection sites beside the SN after histological post-mortem examination failed to evoke any significant changes in MAP with 500 pmol R-820 (Figure 1).

#### *Midbrain NK<sub>3</sub> receptor binding sites in SHR and WKY*

Densities of total, non-specific and specific NK<sub>3</sub> receptor binding sites in the SN of SHR according to the concentration of [<sup>125</sup>I]-HPP-Senkide are shown in Figure 6. Non-specific binding defined in the presence of 1  $\mu$ M unlabelled senktide accounted for approximately 30% of total binding at ligand concentration of 1.3

nM. In all midbrain areas, only small amounts of specific NK<sub>3</sub> receptor binding sites were detected (Figure 7, Table 1). Specific binding with [<sup>125</sup>I]-HPP-Senktide in SN displayed a B<sub>max</sub> which was not significantly different in SHR (11.5 fmol mg<sup>-1</sup> of tissue) and WKY (10 fmol mg<sup>-1</sup> tissue). Likewise, no difference was seen between SHR and WKY regarding densities of specific NK<sub>3</sub> receptor binding sites in the ventral tegmental area, the hippocampus and the amygdala whatever the concentration of the radioligand (Table 1). Furthermore, the affinity of the binding as defined by the dissociation constant (K<sub>D</sub>) was identical in all these regions (0.7 nM) from both SHR and WKY.

## Discussion

The profile of the cardiovascular responses elicited by bilateral microinjection of low doses (pmol range) of selective tachykinin NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptor agonists into the SN of SHR is quite different from that obtained in normotensive rats using the same approach (Lessard & Couture, 2001). While a tachycardia occurred without changes in MAP with the NK<sub>1</sub> agonist in normotensive Wistar rats (Lessard & Couture, 2001) and WKY, same doses of agonist increased both heart rate and MAP in SHR. These results are consistent with a previous report showing a three-fold increase in pressor effect and a marked heart rate increase following i.c.v. injection of substance P in SHR when compared with age-matched WKY (Unger *et al.*, 1980). While the NK<sub>3</sub> agonist evoked a marked heart rate increase in the absence of blood pressure changes in Wistar rats (Lessard & Couture, 2001) and WKY, this agonist was found inactive on both cardiovascular parameters in SHR. However, the NK<sub>2</sub> agonist elicited a similar tachycardia in Wistar, WKY and SHR with no effect on blood pressure.

In previous experiments, the tachycardiac responses to NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> agonists were abolished in the presence of atenolol whereas a treatment with atenolol and atropine was required to block the tachycardiac response of the NK<sub>1</sub> agonist (Lessard & Couture, 2001). It was concluded that the three tachykinin receptors increase the sympatho/adrenal drive to the heart and that the NK<sub>1</sub> agonist can additionally inhibit cardiovagal activity. Therefore, it is likely that the pressor effect of the NK<sub>1</sub> agonist in SHR derived from the well documented

enhanced activity and reactivity of the sympathetic nervous system in SHR (De Champlain, 1998). Additionally, the inhibition of vagal activity by the NK<sub>1</sub> agonist might be altered in SHR. Indeed, the greater sympathetic drive in SHR is associated with a reduced vagal activity and baroreceptor reflex (Julius, 1988; Korner, 1989; De Champlain, 1998; Grassi *et al.*, 1998).

A quantitative *in vitro* autoradiography was performed to address possible changes in affinity or number of NK<sub>3</sub> receptors into the midbrain of SHR. This was tested as a putative mechanism to account for the lost of senktide-induced tachycardia in SHR. Data reveal that modest densities of NK<sub>3</sub> receptor binding sites are similarly distributed in SN, amygdala, hippocampus and ventral tegmental area in SHR and WKY. This is consistent with autoradiographic and *in situ* hybridization studies regarding the distribution of NK<sub>3</sub> receptor binding sites and mRNA in the midbrain of normotensive rats (Shughrue *et al.*, 1996; Langlois *et al.*, 2001). These studies revealed moderate density of NK<sub>3</sub> receptor binding sites in the rat midbrain. B<sub>max</sub> values measured in the SN with [<sup>125</sup>I]-HPP-Senktide (11.5 and 10 fmol mg<sup>-1</sup> tissue in SHR and WKY, respectively) are in the same range than the value previously reported with [<sup>3</sup>H]senktide (16 ± 3 fmol mg<sup>-1</sup> tissue) (Langlois *et al.*, 2001). This suggests that both radioligands yield similar results, yet [<sup>125</sup>I]-HPP-Senktide has the advantage to require only 24 h of exposure to the film contrary to 8-10 weeks needed for [<sup>3</sup>H]senktide which has a much lower specific activity. Moreover, [<sup>125</sup>I]-HPP-Senktide bound with higher affinity (K<sub>D</sub> = 0.7 nM) to midbrain areas than [<sup>3</sup>H]senktide (K<sub>D</sub> = 2.3-2.8 nM) to rat brain cortex and striatum (Dam *et al.*, 1990; Stoessl & Hill, 1990). Because both the dissociation

constant ( $K_D$  values) and densities of receptors in the four analysed midbrain areas were not significantly different between SHR and WKY, it is concluded that the reduced cardiovascular effect following microinjection of the NK<sub>3</sub> agonist in SHR is unlikely to be attributable to the loss of NK<sub>3</sub> receptors or to changes in affinity.

In SHR, the NK<sub>3</sub> antagonist R-820 reduced MAP for over 3 h when microinjected into the SN while, at the same dose, NK<sub>1</sub> (RP 67580) and NK<sub>2</sub> (SR 48968) antagonists were devoid of any cardiovascular effect. The latter receptor antagonists blocked in a selective and reversible manner the cardiovascular responses induced by i.c.v. or SN injection of selective tachykinin agonists mentioned above in Wistar rats (Picard *et al.*, 1994; Cellier *et al.*, 1999; Lessard & Couture, 2001). Likewise, R-820 inhibited the cardiovascular, antidiuretic and antinatriuretic effects induced by i.c.v. and/or nigral injection of senktide or [MePhe<sup>7</sup>]NKB (Cellier *et al.*, 1997; Yuan & Couture, 1997; Lessard & Couture, 2001), and the thermo-hypoalgesia induced by the intrathecal injection of the two NK<sub>3</sub> agonists in the rat tail-flick test (Couture *et al.*, 2000).

In previous studies, we showed that the high affinity human NK<sub>3</sub> receptor antagonist SR 142801 behaves as a tachykinin NK<sub>3</sub> receptor agonist (blocked by R-820) when injected intracerebroventricularly or intrathecally in conscious rats (Cellier *et al.*, 1997; Couture *et al.*, 2000). When injected into the SN, SR 142801 did not reproduce the fall in MAP observed with R-820 but was inactive as the agonist senktide. This was expected since this SR compound displays a low affinity at rat NK<sub>3</sub> receptors (Emonds-Alt *et al.*, 1995).

In the present study, rats which showed injection sites beside the SN failed to evoke any significant changes in MAP to agonists or R-820. Therefore, the described cardiovascular effects are unlikely to be due to the diffusion of the injection outside the SN. This possibility is also unlikely in this study because the volume (0.1  $\mu$ l) of injection is 5 to 10-fold smaller than the volume (0.5 and 1  $\mu$ l) generally employed in this nucleus (Humpel *et al.*, 1991; Humpel & Saria, 1993; Stoessl *et al.*, 1995). Furthermore, the cardiovascular responses to agonists are unrelated to changes of behavioural activity which occurred at doses higher than 1 nmol (Stoessl *et al.*, 1995; Lessard & Couture, 2001).

#### *A role for tachykinins in the tonic control of blood pressure in SHR*

Since the three antagonists did not affect resting blood pressure and heart rate upon their central administration (i.c.v. and SN) in Wistar or WKY, it appears that endogenous tachykinins do not play a primary role in the tonic control of blood pressure and heart rate in the brain of normotensive animals. However, data highlight a potential role for tachykinins in the maintenance of hypertension in SHR by activating tonically NK<sub>3</sub> receptors in the SN. Thus, the occupancy of NK<sub>3</sub> receptors by an over production of endogenous tachykinins may account for the lack of effect with senktide.

The distinctive effects of NK<sub>1</sub> and NK<sub>3</sub> receptor agonists could be related to the activation of different neuronal pathways from the SN. Indeed, *in situ* and/or solution hybridization, autoradiographic and immunocytochemical studies have shown that NK<sub>3</sub> receptors are located mainly on dopaminergic neurons in the

substantia nigra pars compacta (Stoessl & Hill, 1990; Stoessl, 1994; Bannon & Whitty, 1995; Whitty *et al.*, 1995; Shughrue *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998) while NK<sub>1</sub> receptors are mostly located on GABAergic neurons of the substantia nigra pars reticulata (Sivam & Krause, 1992; Stoessl, 1994; Bannon & Whitty, 1995). Electrophysiological and microdialysis studies reveal that senktide activates mostly dopaminergic neurons of the SN pars compacta that leads to an increase of extracellular dopamine concentration in the striatum (Nalivaiko *et al.*, 1997; Marco *et al.*, 1998). The activation of that dopaminergic pathway by senktide was blocked by selective NK<sub>3</sub> antagonists. Interestingly, an autoradiographic study suggests an up-regulation of dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in the caudate-putamen of SHR (Kirouac & Ganguly, 1993). It is tempting to suggest that the tonic activation of nigral NK<sub>3</sub> receptors by endogenous tachykinins is facilitated by an hyperactive dopaminergic nigro-striatal system in SHR. This neuronal pathway could be involved in the maintenance of hypertension in SHR.

Although the SN has been traditionally associated with the central control of motor activity, evidence suggests that this midbrain nucleus exerts a role in central cardiovascular regulation (Barbeau *et al.*, 1969 ; Micieli *et al.*, 1987 ; Van den Buuse *et al.*, 1991 ; Lin & Yang, 1994 ; Linthorst *et al.*, 1994). Electrical or chemical stimulation of the SN leads to increases in blood pressure, heart rate and striatal dopamine levels in anaesthetized rats (Lin & Yang, 1994). On the other hand, orthostatic and postprandial hypotension have been reported from patients with Parkinson's disease who are known to suffer from a degeneration of the nigrostriatal dopaminergic pathway (Barbeau *et al.*, 1969; Micieli *et al.*, 1987).

Also, lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway attenuates the development of hypertension in young SHR (Van den Buuse *et al.*, 1991 ; Linthorst *et al.*, 1994). In the present study, an attenuation of the arterial hypertension has been observed in SHR under blockade of nigral tachykinin NK<sub>3</sub> receptors.

### *Conclusion*

With the use of highly selective tachykinin receptor agonists and antagonists, it was evidenced that the modulation of cardiac activity by NK<sub>3</sub> receptor activation in the SN is markedly altered in SHR which is not the case for NK<sub>2</sub> receptors. This is unlikely the consequence of changes in receptor density and affinity. Although significant pressor responses were evoked by activation of NK<sub>1</sub> receptors, the latter do not appear to be tonically active in SHR contrary to NK<sub>3</sub> receptors. Hence, this study using selective antagonists provides the first pharmacological evidence suggesting a pathophysiological role for tachykinin NK<sub>3</sub> receptors in the maintenance of hypertension at the level of the substantia nigra.

## Acknowledgements

Authors acknowledge Dr. C. Garret (Rhone Poulenc, France), Dr. X. Emonds-Alt (Sanofi Recherche, France) and Dr. J. L. Fauchère (Institut de recherches Servier, France) for the donation of RP 67580, SR 48968/SR 142801 and R-820, respectively. Authors are also grateful to Dr. Jean-Guy Chabot (Douglas Hospital Research Center, Montreal) for his invaluable help and advices in autoradiography, and to Mr. Claude Gauthier for the Artwork. A. Lessard holds Studenships from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the FRSQ-FCAR program. M.M. Campos was awarded a post-doctoral Fellowship from the GRSNA at Université de Montréal. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MT-14379).

## References

- ADVENIER, C., ROUISSI, N., NGUYEN, Q.T., EMONDS-ALT, X., BRELIÈRE, J.-C., NELIAT, G., NALINE, E. & REGOLI, D. (1992). Neurokinin A (NK<sub>2</sub>) receptor revisited with SR 48968, a potent non peptide antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 1418-1424.
- BANNON, M.J. & WHITTY, C.J. (1995). Neurokinin receptor gene expression in substantia nigra : localization, regulation, and potential physiological significance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**, 866-870.
- BARBEAU, A., GILLO-JOFFROY, L., BOUCHER, R., NOWACZYNSKI, W. & GENEST, J. (1969). Renin-aldosterone system in Parkinson's disease. *Science*, **165**, 291-292.
- CELLIER, E., BARBOT, L., IYENGAR, S. & COUTURE, R. (1999). Characterization of central and peripheral effects of septide with the use of five tachykinin NK<sub>1</sub> receptor antagonists in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **127**, 717-728.
- CELLIER, E., BARBOT, L., REGOLI, D. & COUTURE, R. (1997). Cardiovascular and behavioural effects of intracerebroventricularly administered tachykinin NK<sub>3</sub> receptor antagonists in the conscious rat. *Br. J. Pharmacol.* **122**, 643-654.

- CELLIER, E. & COUTURE, R. (1997). Mechanism of cardiovascular and behavioural responses to central NK-3 receptor activation in conscious rat. *In International Tachykinin Conference :Tachykinins in Health and Disease, Cairns (Australia), September 7-11, Abstract book*, p.40.
- CHEN, L.-W., GUAN, Z.-L. & DING, Y.-Q. (1998). Mesencephalic dopaminergic neurons expressing neuromedin K receptor (NK<sub>3</sub>): a double immunocytochemical study in the rat. *Brain Res.*, **780**, 150-154.
- COUTURE, R., TOMA, N. & BARBOT, L. (2000). SR142801 behaves as a tachykinin NK-3 receptor agonist on a spinal nociceptive reflex in the rat. *Life Sci.*, **66(1)**, 51-65.
- CULMAN, J., KLEE, S., OHLENDORF, C. & UNGER, Th. (1997). Effect of tachykinin receptor inhibition in the brain on cardiovascular and behavioral responses to stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280 (1)**, 238-246.
- CULMAN, J. & UNGER, Th. (1995). Central tachykinins : mediators of defence reaction and stress reactions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**, 885-891.
- DAM, T.-V., ESCHER, E. & QUIRION, R. (1990). Visualization of neurokinin-3 receptor sites in rat brain using the highly selective ligand [<sup>3</sup>H]senktide. *Brain Res.*, **506**, 175-179.
- DE CHAMPLAIN, J. (1998). Participation du système nerveux autonome dans l'hypertension artérielle. *Médecine Sciences, Suppl. 2*, vol. **14**, 10-22.

EMONDS-ALT, X., BICHON, D., DUCOUX, J.-P., HEAULME, M., MILOUX, B., PONCELET, M., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., VILAIN, P., NELIAT, G., SOUBRIÉ, P., LE FUR, G. & BRELIÈRE, J.-C. (1995). SR 142801, the first potent non-peptide antagonist of the tachykinin NK<sub>3</sub> receptor. *Life Sci.*, **56** (1), PL27-PL32.

EMONDS-ALT, X., VILAIN, P., GOULAOUIC, P., PROIETTO, V., VAN BROECK, D., ADVENIER, C., NALINE, E., NELIAT, G., LE FUR, G. & BRELIÈRE, J.-C. (1992). A potent and selective non peptide antagonist of the neurokinin A (NK-2) receptor. *Life Sci.*, **50**, PL101-PL106.

FUTAMI, T., HATANAKA, Y., MATSUSHITA, K. & FURUYA, S. (1998). Expression of substance P receptor in the substantia nigra. *Mol. Brain Res.*, **54**, 183-198.

GARRET, C., CARRUETTE, A., FARDIN, V., MOUSSAOUI, S., PEYRONEL, J.-F., BLANCHARD, J.-C. & LADURON, P.M. (1991). Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 10208-10212.

GRASSI, G., CATTANEO, B.M., SERAVALLE, G., LANFRANCHI, A. & MANCIA, G. (1998). Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension*, **31**[part 1], 68-72.

- HELKE, C.J., KRAUSE, J.E., MANTYH, P.W., COUTURE, R. & BANNON, M.J. (1990). Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons : multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms. *FASEB J.*, **4**, 1606-1615.
- HUMPEL, C. & SARIA, A. (1989). Effects of GABA and L-glutamic acid on the potassium-evoked in vitro release of substance P and neurokinin A-like immunoreactivities are different in the rat striatum and substantia nigra. *Neurosci. Lett.* , **105**, 159-163
- HUMPEL, C. & SARIA, A. (1993). Intranigral injection of selective neurokinin-1 and neurokinin-3 but not neurokinin-2 receptor agonists biphasically modulate striatal dopamine metabolism but not striatal preprotachykinin-A mRNA in the rat. *Neurosci. Lett.*, **157**, 223-226.
- HUMPEL, C., SARIA, A. & REGOLI, D. (1991). Injection of tachykinins and selective neurokinin receptor ligands into the substantia nigra reticulata increases striatal dopamine and 5-hydroxytryptamine metabolism. *Eur. J. Pharmacol.*, **195**, 107-114.
- HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. (1962). Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, **194**, 495-496.
- ITOI, K., TSCHÖPE, C., JOST, N., CULMAN, J., LEBRUN, C., STAUSS, B. & UNGER, TH. (1992). Identification of the central tachykinin receptor subclass involved in substance P-induced cardiovascular and behavioural responses in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **219**, 435-444.

- JESSEL, T.M. (1978). Substance P release from the rat substantia nigra. *Brain Res.*, **151**, 469-478 .
- JULIUS, S. (1988). The blood pressure seeking properties of the central nervous system. *J. Hypert.*, **6**, 177-185.
- KIROUAC, G.J. & GANGULY, P.K. (1993). Up-regulation of dopamine receptors in the brain of the spontaneously hypertensive rat : an autoradiographic analysis. *Neuroscience*, **52 (1)**, 135-141.
- KORNER, P.I. (1989). Baroreceptor resetting and other determinants of baroreflex properties in hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **Suppl. 15**, 45-64.
- LANGLOIS, X., WINTMOLDERS, C., RIELE, P., LEYSEN, J. E. & JURZAK, M. (2001). Detailed distribution of neurokinin 3 receptors in the rat, guinea pig and gerbil brain : a comparative autoradiographic study. *Neuropharmacol.*, **40**, 242-253.
- LESSARD, A. & COUTURE, R. (2001). Modulation of cardiac activity by tachykinins in the rat substantia nigra. *Br. J. Pharmacol.*, **134**, 1749-1759.
- LIN, M.-T. & YANG, J.-J. (1994). Stimulation of the nigrostriatal dopamine system produces hypertension and tachycardia in rats. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 35)*, **266**, H2489-H2496.

- LINDEFORS, N., BRODIN, E., TOSSMAN, U., SEGOVIA, J. & UNGERSTEDT, U. (1989). Tissue levels and *in vivo* release of tachykinins and GABA in striatum and substantia nigra of rat brain after unilateral striatal dopamine denervation. *Expl. Brain Res.*, **74**, 527-534.
- LINTHORST, A.C.E., VAN GIERSBERGEN, P.L.M., GRAS, M., VERSTEEG, D.H.G. & DE JONG, W. (1994). The nigrostriatal dopamine system : role in the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.*, **639**, 261-268.
- MARCO, N., THIRION, A., MONS, G., BOUGAULT, I., LE FUR, G., SOUBRIÉ, P. & STEINBERG, R. (1998). Activation of dopaminergic and cholinergic neurotransmission by tachykinin NK<sub>3</sub> receptor stimulation : an *in vivo* microdialysis approach in guinea pig. *Neuropeptides*, **32 (5)**, 481-488.
- MICIELI, G., MARTIGNONI, E., CAVALLINI, A., SANDRINI, G. & NAPPI, G. (1987). Postprandial and orthostatic hypotension in Parkinson's disease. *Neurology*, **37**, 386-393.
- NALIVAIKO, E., MICHAUD, J.-C., SOUBRIÉ, P., LE FUR, G. & FELTZ, P. (1997). Tachykinin neurokinin-1 and neurokinin-3 receptor-mediated responses in guinea-pig substantia nigra : an *in vitro* electrophysiological study. *Neuroscience*, **78 (3)**, 745-757.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4<sup>th</sup> edition. California, USA: Academic Press, San Diego.

- PICARD, P., REGOLI, D. & COUTURE, R. (1994). Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered tachykinins in the rat: characterization of receptors with selective antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 240-249.
- REGOLI, D., NGUYEN, Q.T. & JUKIC, D. (1994). Neurokinin receptor subtypes characterized by biological assays. *Life Sci.*, **54**, 2035-2047.
- REGOLI, D., DRAPEAU, G., DION, S. & COUTURE, R. (1988). New selective agonists for neurokinin receptors : pharmacological tools for receptor characterization. *Trends Pharmacol.Sci.*, **9**, 290-295.
- REID, M.S., HERRERA-MARSCHITZ, M., HÖKFELT, T., LINDEFORS, N., PERSSON, H. & UNGERSTEDT, U. (1990). Striatonigral GABA, dynorphin, substance P and neurokinin A modulation of nigrostriatal dopamine release : evidence for direct regulatory mechanisms. *Exp. Brain Res.*, **82**, 293-303.
- RIBEIRO-DA-SILVA, A., McLEOD, A.L. & KRAUSE, J.E. (2000). Neurokinin receptors in the CNS. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. eds. Quirion, R., Björklund, A., Hökfelt, T. Vol. 16, Part I, Peptide Receptors. pp 195-240. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- ROVERO, P., PESTELLINI, V., PATACCHINI, R., GIULIANI, S., SANTICIOLI, P., MAGGI, C.A., MELI, A. & GIACHETTI, A. (1989). A potent and selective agonist for the NK-2 tachykinin receptor. *Peptides*, **10**, 593-595.

- SHUGHRUE, P.J., LANE, M.V. & MERCHENTHALER, I. (1996). *In situ* hybridization analysis of the distribution of neurokinin-3 mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, **372**, 395-414.
- SIVAM, S.P. & KRAUSE, J.E. (1992). Tachykinin systems in the spinal cord and basal ganglia : influence of neonatal capsaicin treatment or dopaminergic intervention on levels of peptides, substance P-encoding mRNAs, and substance P receptor mRNA. *J. Neurochem.*, **59 (6)**, 2278-2284.
- STOESSL, A.J. (1994). Localization of striatal and nigral tachykinin receptors in the rat. *Brain Res.*, **646**, 13-18.
- STOESSL, A.J., BRACKSTONE, M., RAJAKUMAR, N. & GIBSON, C.J. (1995). Pharmacological characterization of grooming induced by a selective NK-1 tachykinin receptor agonist. *Brain Res.*, **700**, 115-120.
- STOESSL, A.J. & HILL, D.R. (1990). Autoradiographic visualization of NK-3 tachykinin binding sites in the rat brain, utilizing [<sup>3</sup>H]senktide. *Brain Res.*, **534**, 1-7.
- UNGER, Th., CAROLUS, S., DEMMERT, G., GANTEN, D., LANG, R.E., MASER-GLUTH, C., STEINBERG, H. & VEELKEN, R. (1988). Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat : pharmacological characterization. *Circ. Res.*, **63**, 812-820.
- UNGER, Th., ROCKHOLD, R.W., YUKIMURA, T., RETTIG, R. & GANTEN, D. (1980). Blood pressure and heart rate responses to centrally administered

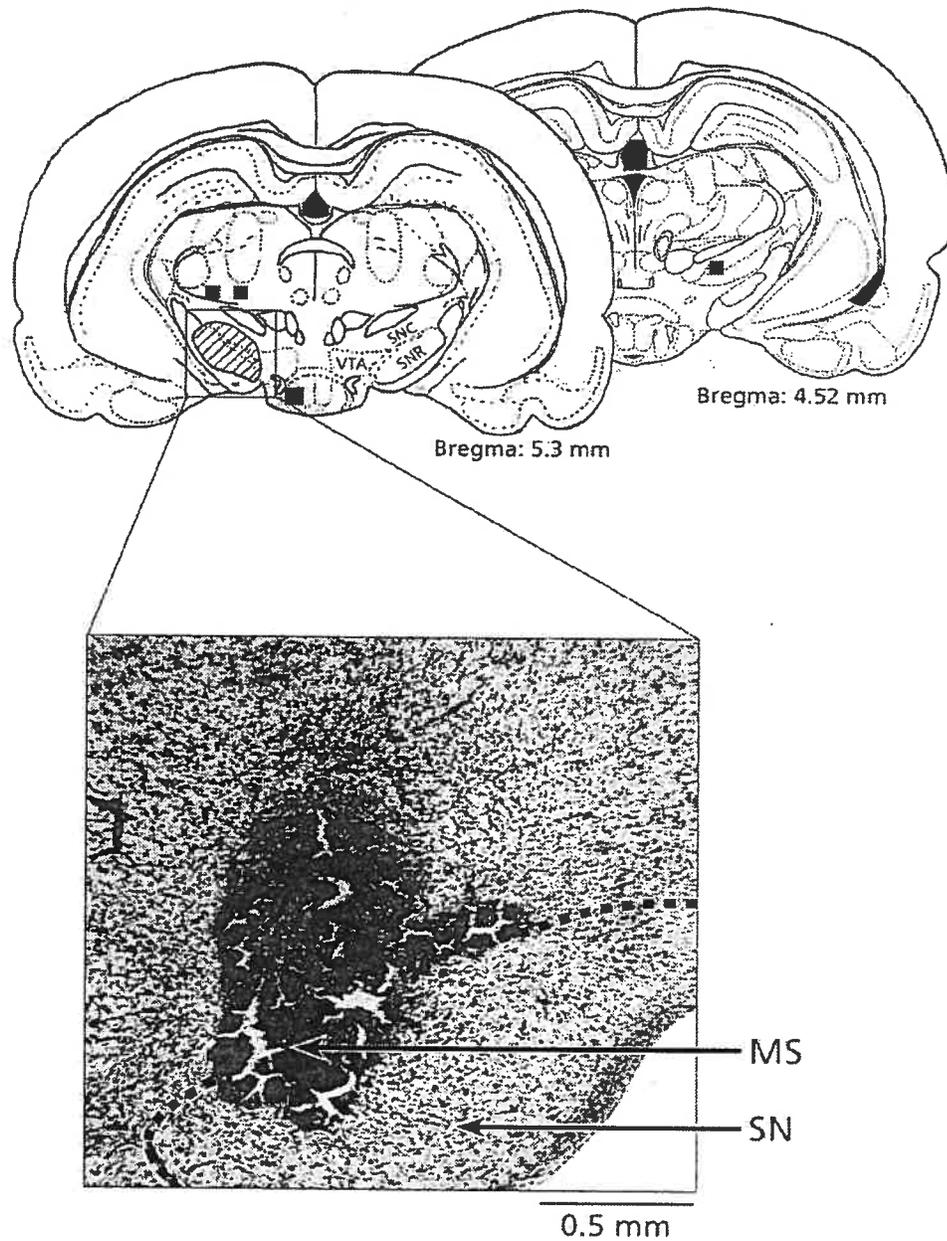
substance P are increased in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.*, **59 (6)**, 299s-302s.

VAN DEN BUUSE, M., LINTHORST, A.C.E., VERSTEEG, D.H.G. & DE JONG, W. (1991). Role of brain dopamine systems in the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Clin. Exp. Hyp.*, **A13 (5)**, 653-659.

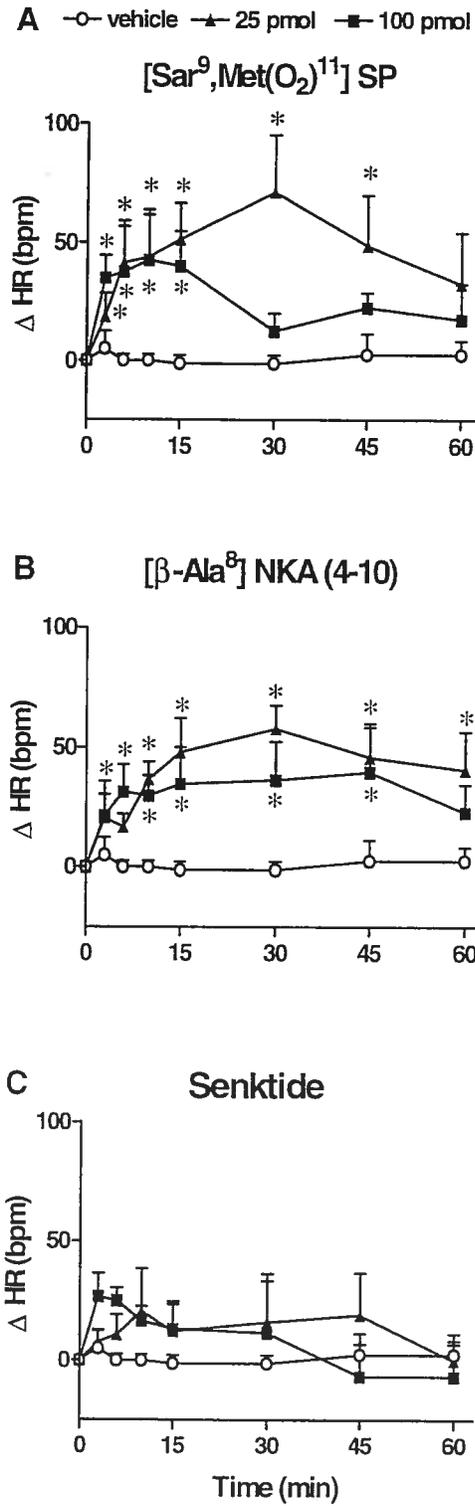
WHITTY, C.J., WALKER, P.D., GOEBEL, D.J., POOSCH, M.S. & BANNON, M.J. (1995). Quantitation, cellular localization and regulation of neurokinin receptor gene expression within the rat substantia nigra. *Neuroscience*, **64 (2)**, 419-425.

WÖRMSE, U., LAUFER, R., HART, Y., CHOREV, M., GILON, C. & SELINGER, Z. (1986). Highly selective agonists for substance P receptor subtypes. *EMBO J.*, **5**, 2805-2808.

YUAN, Y.D. & COUTURE, R. (1997). Renal effects of intracerebroventricularly injected tachykinins in the conscious saline-loaded rat: receptor characterization. *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 785-796.



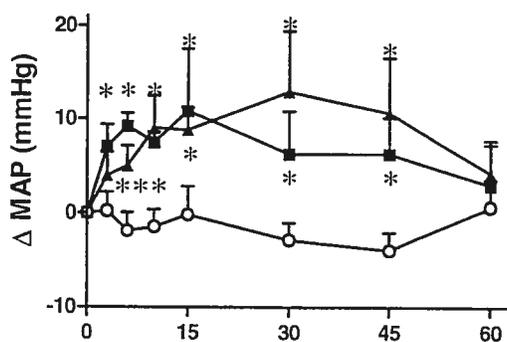
**Figure 1:** Identification of the microinjection sites in the substantia nigra (SN) following post-mortem histological examination of microinjected Evans Blue dye ( $0.1 \mu\text{l}$  bilaterally). The hatched zone represents accepted microinjection sites and the squares represent microinjection sites of R-820 ( $n = 4$ ) excluded from the results and kept as negative control for spread. A rat was considered successfully injected when both cannula tips were shown to be slightly above SN or within a distance of 0.5 mm of the SN (AP= 5.3 mm posterior to the bregma) (Paxinos & Watson, 1998). Abbreviations : MS, microinjection site ; SN, substantia nigra ; SNC, SN pars compacta ; SNR, SN pars reticulata ; VTA, ventral tegmental area. Scale : 0.5 mm.



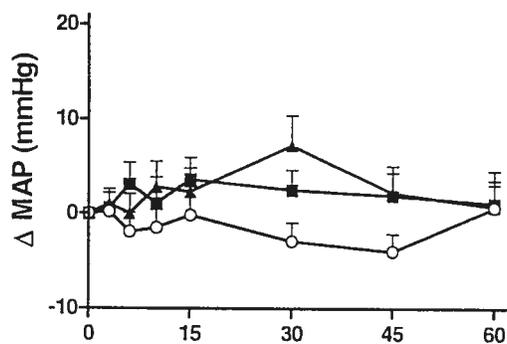
**Figure 2:** Changes in heart rate ( $\Delta$  HR) induced by SN microinjection of the vehicle (aCSF,  $n = 8-13$ ) or (A) the NK<sub>1</sub> agonist [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (25 pmol ( $n = 8$ ), 100 pmol ( $n = 4$ )); (B) the NK<sub>2</sub> agonist [ $\beta$ -Ala<sup>8</sup>]NKA (4-10) (25 pmol ( $n = 10$ ), 100 pmol ( $n = 6$ )) and (C) the NK<sub>3</sub> agonist senktide (50 pmol ( $n = 13$ ), 100 pmol ( $n = 6$ )) in SHR. Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of ( $n$ ) rats. Comparison to vehicle values is indicated by \* $P < 0.05$ .

A ○ vehicle ▲ 25 pmol ■ 100 pmol

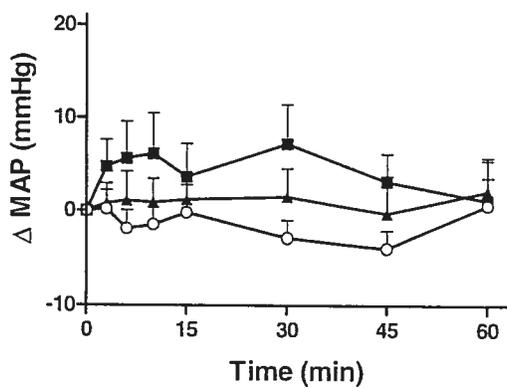
[Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>] SP



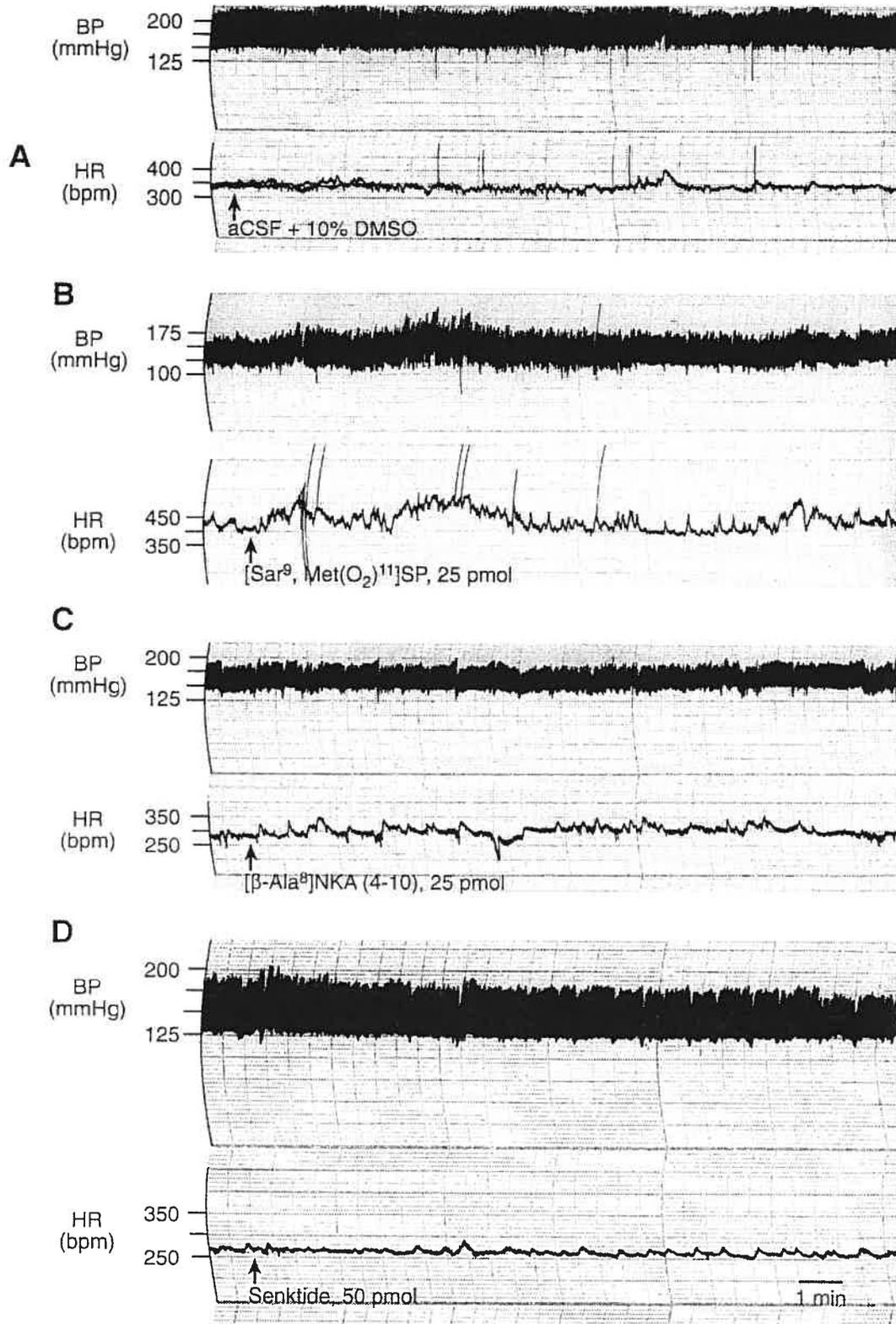
B [β-Ala<sup>8</sup>] NKA (4-10)



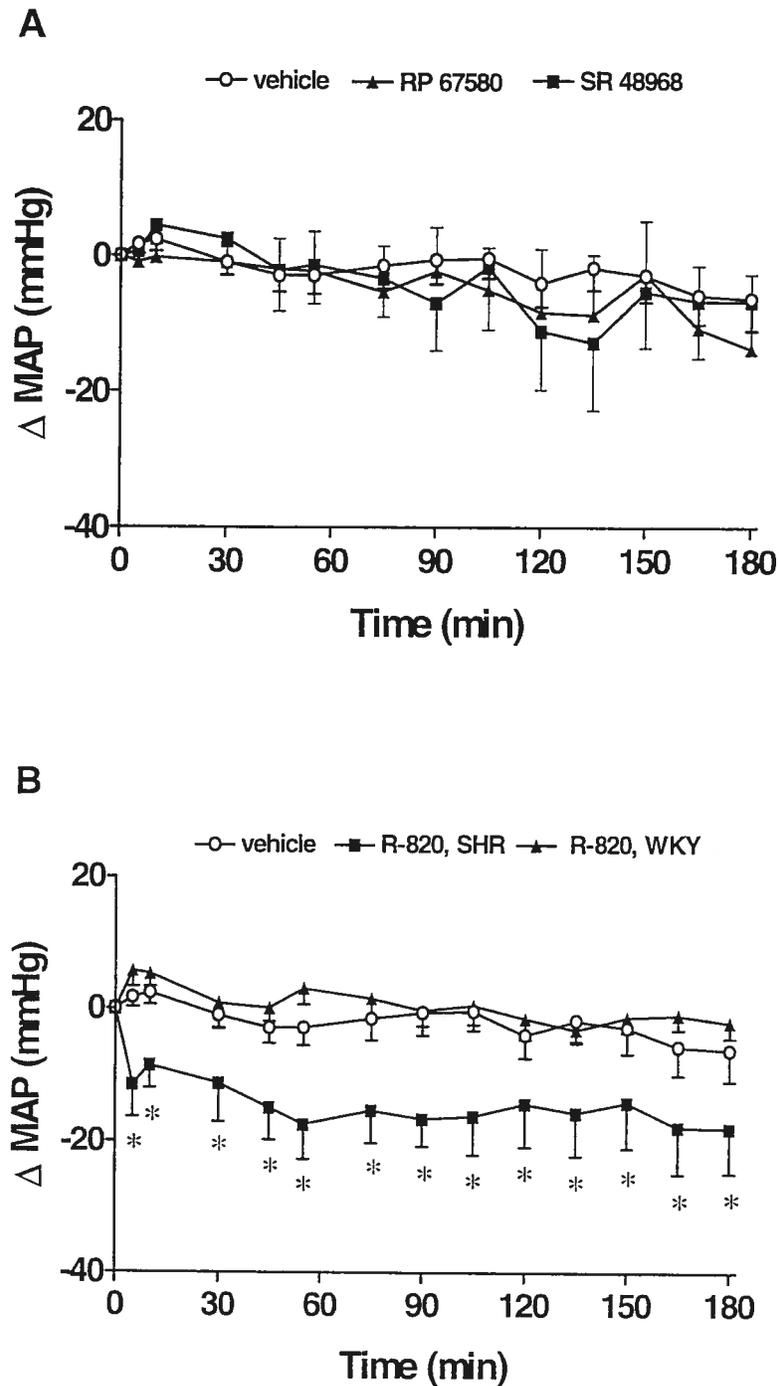
C Senktide



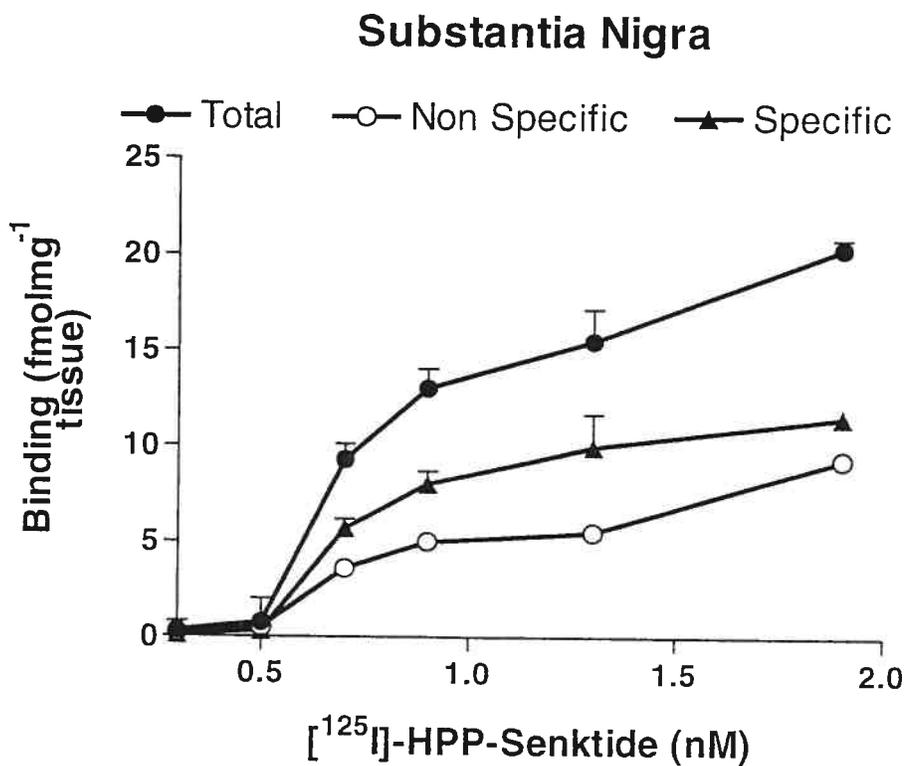
**Figure 3:** Legend as Figure 2 for changes in mean arterial pressure ( $\Delta$  MAP) in the same animals.



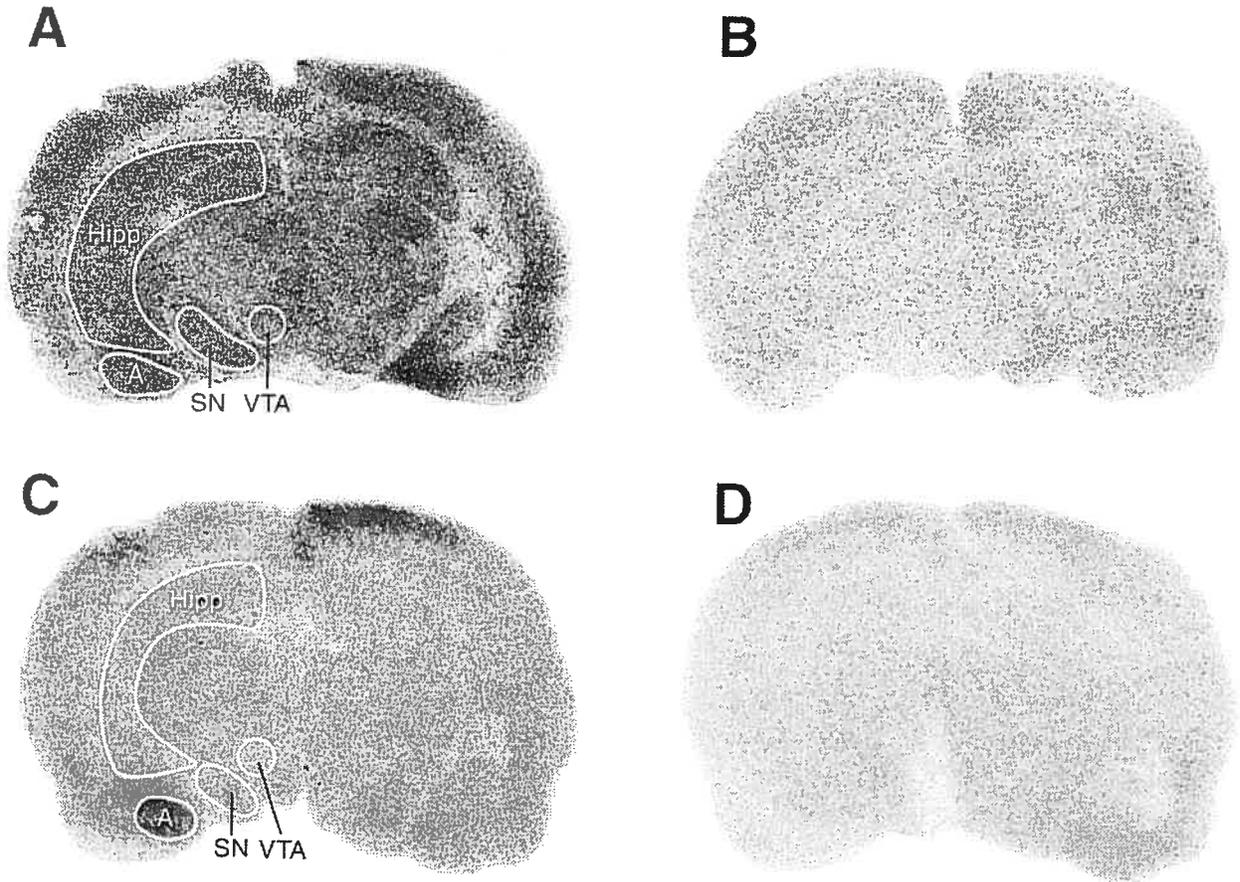
**Figure 4:** Original traces showing changes in heart rate (HR) and mean arterial pressure (MAP) induced by SN microinjection of (A) vehicle (aCSF with 10% DMSO), (B) the NK<sub>1</sub> agonist  $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}]\text{SP}$  (25 pmol), (C) the NK<sub>2</sub> agonist  $[\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}$  (4-10) (25 pmol) and (D) the NK<sub>3</sub> agonist senktide (50 pmol) in SHR.



**Figure 5:** Time-course effects on changes in mean arterial pressure ( $\Delta$  MAP) induced by SN microinjection of (A) vehicle (aCSF with 10% DMSO,  $n = 6$ ), RP 67580 (500 pmol,  $n = 5$ ) and SR 48968 (500 pmol,  $n = 6$ ) in SHR, and (B) vehicle (aCSF with 10% DMSO,  $n = 12$ ) and R-820 (500 pmol) in SHR ( $n = 12$ ) and WKY ( $n = 10$ ). Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of ( $n$ ) rats. Comparison to vehicle values is indicated by \* $P < 0.05$ .



**Figure 6:** Total, non-specific and specific binding (fmol mg<sup>-1</sup> tissue) of [<sup>125</sup>I]-HPP-Senkide as a function of its concentration in the substantia nigra of SHR. Non-specific binding was measured with the addition of 1 μM HPP-Senkide. Quantification was performed on 40 sections (4 sections per animal x 5 SHR) for each concentration (x 5 concentrations) corresponding to 200 sections for total and non-specific binding.



**Figure 7:** Autoradiographic distribution of  $[^{125}\text{I}]\text{-HPP-Senkide}$  binding sites in the midbrain of SHR (A,B) and WKY (C,D). Total binding measured with 0.7 nM  $[^{125}\text{I}]\text{-HPP-Senkide}$  is shown in panels A and C (left) while the non-specific binding in the presence of 1  $\mu\text{M}$  HPP-Senkide is shown in panels B and D. Each anatomical structure was delineated according to Paxinos and Watson (1998) as illustrated in panels A and C (right). The areas under the study are delimited by a white line.

Abbreviations : SN, substantia nigra; VTA, ventral tegmental area ; Hipp, hippocampus ; A, amygdala.

**Table 1**

Densities of specific NK<sub>3</sub> receptor binding sites (fmolmg<sup>-1</sup>) in four midbrain nuclei of SHR and WKY according to the concentration of [<sup>125</sup>I]-HPP-Senkide

(nM)	Substantia Nigra		Ventral Tegmental Area		Hippocampus		Amygdala	
	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY
0.7	5.7 ± 0.5	5.8 ± 1.0	4.4 ± 0.3	4.1 ± 1.0	5.6 ± 0.7	4.5 ± 1.8	6.8 ± 0.8	6.1 ± 1.2
0.9	8.0 ± 0.7	5.0 ± 0.6	6.0 ± 1.7	4.0 ± 0.6	7.0 ± 0.5	6.0 ± 0.4	10.0 ± 1.2	9.0 ± 0.6
1.3	9.9 ± 1.7	9.0 ± 1.5	6.6 ± 1.2	6.0 ± 1.6	9.2 ± 1.6	7.0 ± 1.6	11.0 ± 1.4	9.0 ± 2.3
1.5	9.1 ± 1.1	10.0 ± 0.7	6.8 ± 1.3	8.0 ± 1.5	8.8 ± 1.0	10.0 ± 1.6	9.3 ± 1.3	12.0 ± 0.8
1.7	11.5 ± 0.5	10.0 ± 0.7	5.4 ± 0.8	5.0 ± 3.5	9.8 ± 1.1	10.0 ± 3.9	10.6 ± 1.3	11.0 ± 4.0

# **CHAPITRE IV**

## **TROISIÈME ARTICLE**

### **CENTRAL ANTI-HYPERTENSIVE EFFECT OF TACHYKININ NK-3 RECEPTOR ANTAGONISTS IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RAT**

**Andrée Lessard, Marlène Laurin, Nobuharu Yamaguchi**

**& Réjean Couture**

Département de Physiologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal,  
Montréal, Québec, Canada

**Br. J. Pharmacol., en révision**

## Résumé de l'étude

Cette étude a pour but de déterminer le rôle des tachykinines endogènes cérébrales dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR. Pour ce faire, la pression artérielle moyenne (PAM) et la fréquence cardiaque ont été mesurées pendant plusieurs heures/jours suite à l'administration i.c.v. ou i.v. d'antagonistes NK<sub>1</sub> (RP 67580), NK<sub>2</sub> (SR 48968) et NK<sub>3</sub> (R-820, SB222200 et son énantiomère inactif SB 222201) aux tachykinines chez le SHR et le WKY. Chaque animal n'a reçu qu'un seul antagoniste. Alors que l'énantiomère inactif de l'antagoniste NK<sub>3</sub> et les antagonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> étaient dépourvus d'effet cardiovasculaire, l'administration i.c.v. des deux antagonistes NK<sub>3</sub> a provoqué un effet anti-hypertenseur complet chez le SHR (dose-dépendant pour le SB 222200) sans affecter la PAM des WKY. L'effet est provoqué par une inhibition des récepteurs NK<sub>3</sub> du cerveau puisqu'un traitement similaire par voie i.v. était sans effet. Il est intéressant de noter que cet effet anti-hypertenseur est assujéti à un cycle circadien puisque le décours temporel de l'effet anti-hypertenseur du SB 222200 diffère selon l'heure d'administration (injection à 7hAM, pic de la réponse à 3h post-injection; injection à 1hPM, pic de la réponse à 8h post-injection).

Dans le but de vérifier le(s) mécanisme(s) d'action périphérique des effets anti-hypertenseurs du SB 222200, des échantillons de plasma sanguin ont été recueillis au pic de l'effet anti-hypertenseur et trois jours après l'injection i.c.v. du SB 222200 lorsque la PAM était revenue à ses niveaux de base. Les catécholamines (épinéphrine,

norépinéphrine, dopamine) et la vasopressine ont été mesurées puis comparées pendant et après l'effet anti-hypertenseur chez les SHR. L'effet anti-hypertenseur a également été mesuré chez le SHR ayant été bi-néphrectomisé 6h avant l'injection du SB 222200. Les résultats montrent que les taux circulants des trois catécholamines et de la vasopressine n'ont pas été altérés de façon significative en présence du SB 222200. De plus, l'effet anti-hypertenseur du SB 222200 en matinée (7hAM) et en après-midi (1hPM) a été reproduit chez les SHR bi-néphrectomisés. Il est ainsi suggéré que le SB 222200 produit son effet anti-hypertenseur par un mécanisme indépendant de l'inhibition de l'activité du système nerveux sympatho-surrénalien et de la vasopressine.

En conclusion, cette étude propose que les récepteurs NK<sub>3</sub> cérébraux sont impliqués dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR. Bien que le mécanisme de l'effet anti-hypertenseur des antagonistes NK<sub>3</sub> demeure encore inconnu, il semblerait comporter une composante hormonale plutôt que neuronale à cause de l'influence circadienne et de l'entrée en action lente du composé.

1. Tachykinin receptor antagonists were injected intracerebroventricularly (i.c.v.) or intravenously (i.v.) to determine the putative role of endogenous tachykinins in the maintenance of arterial hypertension. Experiments were conducted in awake spontaneously hypertensive rats (SHR, 15 weeks old) and age-matched normotensive control Wistar Kyoto (WKY).
2. In SHR, two structurally unrelated NK<sub>3</sub> antagonists (R-820 and SB 222200, 500 pmol) reduced blood pressure when injected i.c.v. but not i.v. The anti-hypertensive effect of SB 222200 peaked at 3 h and faded at 6h post-injection (if injected at 07.00h) or had a slower onset and peaked at 8 h post-injection (if injected at 13.00h). The effect of R-820 was maximal at 24 h and lasted up to 48 h post-injection. Both antagonists failed to alter blood pressure in WKY.
3. The anti-hypertensive effect of SB 222200 was not associated with changes in plasma levels of catecholamines and vasopressin and it remained unchanged in SHR subjected to acute bilateral nephrectomy. Heart rate was not affected by either antagonist in SHR.
4. Blood pressure and heart rate were not affected by the i.c.v. injection of 500 pmol of tachykinin NK<sub>1</sub> (RP 67580) and NK<sub>2</sub> (SR 48968) receptor antagonists, by the inactive enantiomer of SB 222200 (SB 222201) and by the highly hydrophilic NK<sub>3</sub> antagonist (SB 235375) in both SHR and WKY.
5. Data suggest that brain tachykinins and NK<sub>3</sub> receptors are implicated in the maintenance of hypertension in SHR. Hence, these receptors may represent promising therapeutic target in the treatment of arterial hypertension.

**Keywords :** Tachykinins ; NK<sub>3</sub> receptor ; hypertension ; central autonomic regulation; catecholamines; vasopressin; spontaneously hypertensive rat

**Abbreviations:** aCSF, artificial cerebrospinal fluid; ANOVA, analysis of variance; AVP, arginine-vasopressin; DMSO, dimethyl sulphoxide; DOCA, deoxycorticosterone acetate; EDTA, ethylenediamine-tetraacetic acid; HPLC, high pressure liquid chromatography; HR, heart rate; i.c.v., intracerebroventricular/ly; i.v., intravenous/ly; MAP, mean arterial blood pressure; NKA, neurokinin A; NKB, neurokinin B; PVN, paraventricular nucleus; RIA, radioimmunoassay; SHR, spontaneously hypertensive rat; SP, substance P; WKY, Wistar-Kyoto rat

## Introduction

Substance P (SP), neurokinin A (NKA) and neurokinin B (NKB), the three main mammalian tachykinins, exert a variety of biological effects through the activation of three transmembrane G-protein-coupled receptors designated neurokinin-1 (NK<sub>1</sub>), NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> (Otsuka & Yoshioka, 1993). Evidence suggests a role for these neuropeptides in central cardiovascular regulation (Takano *et al.*, 1990; Culman & Unger, 1995; Culman *et al.*, 1997; Cellier *et al.*, 1997; 1999). In normotensive rats, intracerebroventricular (i.c.v.) injection of tachykinins or selective receptor agonists increases arterial blood pressure and heart rate (Takano *et al.*, 1990; Couture *et al.*, 1995; Cellier *et al.*, 1997; 1999) and causes inhibition of water and electrolyte renal excretion (Yuan & Couture, 1997). These responses are mediated by an increased sympathetic tone (the three tachykinin receptors) (Unger *et al.*, 1981; Takano *et al.*, 1990; Couture *et al.*, 1995) and the release of vasopressin (NK<sub>3</sub> receptor) (Polidori *et al.*, 1989; Massi *et al.*, 1991; Yuan & Couture, 1997). Microinjection of the selective NK<sub>3</sub> agonist senktide into the rat hypothalamic paraventricular nucleus also induces anti-diuretic and pressor effects which are blocked respectively by vasopressin V<sub>2</sub> and V<sub>1</sub> receptor antagonists (Nakayama *et al.*, 1992; Eguchi *et al.*, 1996). These studies are consistent with autoradiographic, immunocytochemical and *in situ* hybridisation localization of NK<sub>3</sub> receptor and its mRNA in the magnocellular part of the hypothalamic paraventricular and supraoptic

nuclei (for a seminal review see Ribeiro-da-Silva *et al.*, 2000). Moreover, a double fluorescence immunohistochemical study has shown that all vasopressin-immunoreactive neurons in the rat hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei produce NKB and co-express NK<sub>3</sub> receptors which suggests that these receptors mediate an auto-regulatory mechanism for vasopressin release (Hatae *et al.*, 2001).

Sparse information is presently available regarding the putative role of tachykinins in arterial hypertension. In the periphery, SP may act as a partial counterregulator of vasoconstriction in models of salt-dependent hypertension (Kohlmann *et al.*, 1997). For instance, an intravenous infusion of the NK<sub>1</sub> antagonist CP 96,345 increases arterial pressure in DOCA-salt rats, one-kidney-one clip renovascular hypertensive rats but not in salt-independent models such as spontaneously hypertensive rats and two-kidney-one clip renovascular hypertensive rats (Kohlmann *et al.*, 1997). High plasma levels of NKB are found in human pregnancy-induced hypertension and pre-eclampsia, and intravenous infusion of NKB in conscious female rats which simulates late pregnancy concentrations of NKB increases blood pressure (Page *et al.*, 2000). At this time, a central site of action for the pressor response to circulating NKB cannot be excluded. Recently, we have shown a significant decrease of blood pressure for over 3 h after microinjection of the selective NK<sub>3</sub> antagonist R-820 into the *substantia nigra* of SHR (15 weeks old), yet a similar treatment had no cardiovascular effect in age-matched normotensive control WKY (Lessard & Couture,

2001; Lessard *et al.*, 2003).

The aim of this study was to further investigate the role of central endogenous tachykinins in the maintenance of arterial hypertension in SHR. This was addressed by investigating the cardiovascular responses to intracerebral injection of selective tachykinin antagonists at NK<sub>1</sub> (RP 67580) (Garret *et al.*, 1991), NK<sub>2</sub> (SR 48968) (Advenier *et al.*, 1992) and NK<sub>3</sub> receptors (R-820, SB 235375 and SB 222200) (Regoli *et al.*, 1994; Sarau *et al.*, 2000; Hay *et al.*, 2002). Since results show that NK<sub>3</sub> antagonists reduced high blood pressure in SHR, peripheral mechanisms underlying the anti-hypertensive effect of SB 222200 were investigated by measuring possible decreases in plasma levels of catecholamines and vasopressin, and by assessing the influence of bilateral nephrectomy. The circadian rhythm of vasopressin and catecholamines release will be considered in the experimental design. Indeed, in the early morning, there is a marked rise in neuronal and hormonal sympathetic activity (Yamasaki *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 2003) while vasopressin release is maximal during the day and the lowest at night (Mens *et al.*, 1982; Windle *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 2000). To avoid the spurious effects of anaesthesia and the stress induced by immobilisation, the monitoring of cardiovascular function was conducted in awake, unrestrained rats. A preliminary report of this work has been presented elsewhere (Lessard & Couture, 2001).

## Methods

### *Animal source and care*

Male spontaneously hypertensive rats (SHR, 15 weeks old  $n = 116$ ) and age-matched Wistar-Kyoto rats (WKY,  $n = 35$ ) were purchased 3-5 weeks prior to experiments from Charles River, St-Constant, Québec, Canada, and housed under a 12 h light-dark cycle in a room with controlled temperature (22 °C), humidity (53 %) with food (Charles River Rodent) and tap water available *ad libitum*. The care of animals and research protocols conformed to the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal Care and approved by the Animal Care Committee of our University.

### *Animal preparation*

SHR and WKY were implanted with one 23-gauge stainless steel guide cannula into the right lateral ventricle (coordinates: 1 mm posterior to the bregma, 1.4 mm lateral to the midline, 3.0 mm ventral from the skull surface) (Cellier *et al.*, 1997; 1999). One week after the surgery, an intravascular siliconized polyethylene tubing PE-50 catheter, filled with physiological saline containing 100 i.u.  $\text{ml}^{-1}$  heparin sodium salt, was inserted into the abdominal aorta *via* the right femoral artery for direct blood pressure recording. Some animals also were implanted

with a siliconized PE-10 catheter, filled with physiological saline containing 100 i.u. ml<sup>-1</sup> heparin sodium salt, into the right jugular vein for i.v. injection (n = 11). The intravascular catheters were tunneled subcutaneously to emerge at the back of the neck with the i.c.v. catheter. A separate group of rats (n = 25) underwent bilateral nephrectomy through dorsolateral incision of the skin and muscles under halothane anesthesia. Before each surgery, the animals received Ethacilin (5 mg kg<sup>-1</sup>, i.m., rogar/S.T.B. Inc., London, Ontario, Canada) and Ketoprofen (anafen, 10 mg kg<sup>-1</sup>, i.m., Merial Canada Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada). Recovery from anaesthesia was monitored closely under a warming lamp to maintain the body temperature of animals. Thereafter, rats were housed individually in polyethylene cages (40 x 23 x 20 cm) with a top grid and returned to their resident room. Experimental protocols were initiated 48h after the last surgery (or 6h after bilateral nephrectomy) in conscious and unrestrained rats (Cellier *et al.*, 1997; 1999). Successful intravascular and i.c.v catheters implantation was confirmed in all rats used in the study after *post-mortem* examination.

#### *Measurement of cardiovascular parameters*

Blood pressure and heart rate (HR) were measured with a Statham pressure Transducer (P23ID) and a cardiac tachometer (model 7P4) coupled to a Grass polygraph (model 79; Grass Instruments Co., Quincy, MA, USA). Cardiovascular responses were measured 1 h

after the rats were transported to an isolated and quiet testing room where only the experimenter had access. Rats remained in their resident cage but the top grid was removed. When resting blood pressure and heart rate were stable, i.c.v. or i.v. injections were performed on undisturbed, freely moving rats through 31-gauge stainless steel injector (i.c.v.) or a polyethylene tubing (i.v.). The injector was inserted into the guide cannula without handling the rats. All solutions for injections were freshly prepared and injected ( $1 \mu\text{l}$ , i.c.v. ; bolus of  $0.1 \text{ ml kg}^{-1}$ , i.v.) over a period of 1 min.

### *Experimental protocols*

#### *Experiment 1 : Effect of i.c.v. tachykinin receptor antagonists*

SHR and WKY received at random an i.c.v. injection of selective antagonists (50-500 pmol) for the  $\text{NK}_1$  (RP 67580),  $\text{NK}_2$  (SR 48968) and  $\text{NK}_3$  receptor (R-820 ; SB 235375, SB 222200) or the vehicle (artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing less than 15% dimethyl sulphoxide (DMSO)). Each rat received only one antagonist at a single dose at 13.00 h. The inactive enantiomer of SB 222200 (SB 222201) was also injected as control. A separate group of SHR received i.c.v. SB 222200 early in the morning (07.00 h,  $n = 6$ ). Arterial blood pressure and heart rate were monitored for 8 h every day up to 4 days post-injection. Data

presented at selected time points are an average of 15 min recording. Higher doses than 500 pmol SB 222200 require more than 15% of DMSO which was not tolerated by rats (Lessard & Couture, 2001). Thus, antagonists were compared at equimolar doses based on their solubility in physiological medium and on previous studies showing their effectiveness to block the effect of their respective agonists in Wistar rat (Lessard & Couture, 2001) and to reverse hypertension (R-820) in SHR (Lessard *et al.*, 2003) after microinjection in the *substantia nigra*.

*Experiment 2 : Effect of i.v. tachykinin NK<sub>3</sub> antagonists*

To exclude peripheral leakage of i.c.v. injected NK<sub>3</sub> antagonists to general circulation, SHR received i.v. the NK<sub>3</sub> receptor antagonists (R-820 or SB 222200, 500 pmol) or the vehicle (saline containing less than 15% DMSO). Each rat received only one antagonist at random. Arterial blood pressure and heart rate were measured during the following 3 days as described above for i.c.v. injection.

*Experiment 3: Effect of i.c.v. SB 222200 in bilaterally nephrectomized SHR*

To exclude a possible effect of released vasopressin on kidneys, bilaterally nephrectomized SHR received an i.c.v. injection of SB 222200 (500 pmol) or the vehicle (n = 11) either at 07.00 h (n = 5) or at 13.00 h (n = 9). MAP and HR were measured continuously up to 24h post-injection.

*Experiment 4: Effect of i.c.v. SB 222200 on plasma levels of catecholamines and vasopressin*

Two groups of SHR were injected i.c.v. 500 pmol SB 222200 (13.00 h) and blood samples (2 ml) were collected from the intraaortic catheter in the awake animal at the time of the maximum decrease of blood pressure and 3 days apart in the absence of SB 222200 (control hypertensive values) at the same time point of the day to prevent any circadian influence. Measurements of vasopressin (Group 1, n = 8) and catecholamines (Group 2 that includes Group 1 and 8 additional rats) were made on the first and second ml blood sample, respectively. After collecting blood samples, rats received i.v. the same volume of ringer-lactate (273 mOsm l<sup>-1</sup>; pH: 6.7, Abbott Laboratories, Saint-Laurent, Québec, Canada). With this protocol, each rat had its own control value.

*Measurement of plasma catecholamines and vasopressin*

Catecholamines were extracted from plasma and quantified with high-pressure liquid chromatography (HPLC) according to previous methods (Remie & Zaagsma, 1986; Musso *et al.*, 1990) with some modifications (Yamaguchi, 1993). Briefly, 1 ml of blood was collected in a chilled glass tube containing 20 µl of preservative solution (pH 6.5) consisting of ethyleneglycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (95 mg ml<sup>-1</sup>) and

glutathione ( $60 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Tubes were then immediately centrifuged at  $4^\circ\text{C}$  and 3000 rpm for 20 min. Plasma was collected and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . To  $400 \mu\text{l}$  of plasma in a 15 ml glass tube with a screw cap,  $40 \mu\text{l}$  of an aqueous solution containing dihydroxybenzylamine ( $1 \text{ ng ml}^{-1}$ ), its mother solution being prepared with 0.2 M acetic acid, and 1 ml of 2 M  $\text{NH}_4\text{OH-NH}_4\text{CL}$  buffer (pH 8.7) that contains 0.1 % diphenylborate-ethanolamine and 0.5 % EDTA were added. After the addition of 5 ml of *n*-heptane containing 1 % *n*-octanol and 0.25 % tetraoctylammonium bromide, the sample solution was mixed by a rotating mixer for 5 min and centrifuged at 2,500 rpm for 5 min. Then 4 ml of the organic phase were transferred to a conic tube, mixed with 2 ml of *n*-octanol and  $400 \mu\text{l}$  of 0.08 M acetic acid, mixed for 5 min, and centrifuged at 2,500 rpm for 5 min. The organic phase was discarded, and the aqueous phase was transferred to the amber microtube for HPLC determination.

Vasopressin (AVP) was extracted according to the petro-ether method (Le Mellédo *et al.*, 2001) and measured by radioimmunoassay (RIA) (Bichet *et al.*, 1986). Briefly, 1 ml of blood was collected in 10 ml tubes containing EDTA. Tubes were immediately centrifuged at  $4^\circ\text{C}$  and 3000 rpm for 20 min. Plasma was then collected and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . For the assay, plasma samples were extracted with the petrol-ether method, evaporated to dryness and reconstituted in  $750 \mu\text{l}$  of buffer. Then  $200 \mu\text{l}$  of reconstituted sample were tested in duplicate. The RIA sensitivity is 0.1 pg per tube ( $0.5 \text{ pg ml}^{-1}$ ), with a 50% displacement of the tracer

(iodinated-AVP from Amersham) obtained for 1.2 pg per tube. The antiserum (AS-2849) was used at a final dilution of 1/2,500,000. The standard curve included 6 Bo and 10 concentrations in triplicate. Plasma samples were measured in duplicate. Intra- and inter-assay coefficients of variation for AVP plasma concentrations between 2 and 5 pg ml<sup>-1</sup> were less than 10%. Non-specific binding (with the charcoal separation method) was less than 3%. The laboratory technicians performing the catecholamines and vasopressin measurements were blind to the condition.

#### *Drugs and solutions*

The composition of aCSF was, in mM: NaCl 128.6, KCl 2.6, MgCl<sub>2</sub> 2.0 and CaCl<sub>2</sub> 1.4; pH adjusted to 7.2. The non-peptide antagonists RP 67580 ((±) 7,7-diphenyl-2[1-imino-2(2-methoxy-phenyl)-ethyl] perhydroisoindol-4-one(3aR, 7aR), and SR 48968 ((S)-N-methyl-N[4-(4-acetylamino-4-phenylpiperidino)-2-(3,4-dichlorophenyl)butyl]benzamide) were kind gifts from Dr. C. Garret (Rhône-Poulenc Rorer, Vitry sur Seine, France) and X. Emonds-Alt (Sanofi Recherche, Montpellier, France), respectively. The pseudo-peptide antagonist R-820 (3-indolylcarbonyl-Hyp-Phg-N(Me)-Bzl) was generously provided by Dr. J.L. Fauchère (Servier, Paris, France). The lipophilic non-peptide antagonist SB 222200 ((S)-(-)-N-(α-ethylbenzyl)-3-methyl-2-phenylquinoline-4-carboxamide), its inactive enantiomer SB 222201 and the hydrophilic SB 235375 ((S)-(-)-N-(α-ethylbenzyl)-3-(carboxymethyl)-2-

phenylquinoline-4-carboxamide) were provided by Dr. H. M. Sarau (GlaxoSmithKline, PA, USA). All antagonists were solubilized in DMSO (Fisher Scientific, Montréal, Québec, Canada) except the water soluble molecule SB 235375. Other drugs were purchased from Sigma (St-Louis, MO, USA). The solution was then completed with aCSF or saline and contained 1-15% (v v<sup>-1</sup>) DMSO. Vehicle (aCSF or saline containing less than 15% DMSO) was injected to all animals and failed to cause any significant cardiovascular changes.

#### *Statistical analysis of data*

Results are expressed as means  $\pm$  s.e. mean of (n) rats. Statistical differences between means within the same group (Table 2) were evaluated with Student's *t*-test for paired values. Multiple comparisons in relation with the time course of changes in mean arterial blood pressure and heart rate were analysed with a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the test of Bonferroni. Multiple comparisons to pre-injection values (Table 1) were evaluated with a one-way ANOVA and a *post hoc* Dunnett's test. Only probability values (P) less than 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

### *Cardiovascular response induced by i.c.v. and i.v. injections of SB 222200*

In SHR, the i.c.v. injection of SB 222200 at 13.00h significantly reduced MAP from 6 to 8 h (250 pmol, n = 7) and from 3 to 8 h post-injection (500 pmol, n = 8) when compared to vehicle values (Figure 1-A). The maximal decrease induced by 500 pmol was seen at 8h ( $-37 \pm 9$  mmHg,  $P < 0.01$ ) and MAP was back to pre-hypertensive levels ( $167 \pm 6$  mmHg) 48 h post-injection. At a lower dose (100 pmol, n = 7), SB 222200 had no significant effect on MAP when compared to vehicle values (Figure 1-A). In WKY, i.c.v. injection of SB 222200 (500 pmol, n = 12) had no significant effect on MAP when compared to vehicle values (n = 12) (Figure 1-A). When administered i.v. in SHR, SB 222200 (500 pmol, n = 7) slightly reduced MAP when compared to vehicle values, yet changes did not reach significant level (Figure 1-B). SB 222200 (250 or 500 pmol, i.c.v.) had no significant effect on HR in SHR (Table 1) and WKY (data not shown).

### *Cardiovascular response induced by i.c.v. and i.v. injections of R-820*

In SHR, the i.c.v. injection of R-820 (500 pmol, n = 10) at 13.00 h significantly decreased MAP at 24 and 48h post-injection when compared to vehicle values (n = 10) (Figure 2-A). A

lower dose (50 pmol, n = 6) of R-820 had no effect on MAP. The i.v. injection of 500 pmol R-820 was also inactive (basal:  $176 \pm 6$  mmHg; 24 h post R-820:  $172 \pm 6$  mmHg, n = 4,  $P > .05$ ). In WKY, 500 pmol R-820 (i.c.v., n = 4) had no significant effect on MAP (Figure 2-A). Whatever the doses tested i.c.v. or i.v., R-820 had no significant effect on HR in both SHR (Figure 2-B) and WKY (data not shown).

*Lack of effects of i.c.v. SB 235375, RP 67580, SR 48968, and SB 222201 in SHR and WKY*

When compared to vehicle values, none of the following antagonists injected i.c.v. at the dose of 500 pmol had a significant effect on MAP and HR in SHR for a period of 1-24 h post-injection: SB 235375 (n = 8), the selective NK<sub>1</sub> (RP 67580, n = 6) and NK<sub>2</sub> receptor antagonists (SR 48968, n = 5) and the inactive enantiomer of SB 222200 (SB 222201, n = 6) (Figure 1-C, Table 1). In WKY, blood pressure was not significantly altered for a period up to 8 h after i.c.v. injection of the same antagonists (500 pmol): maximal  $\Delta$  MAP were  $-14 \pm 3$  mmHg (RP 67580, n = 5),  $-6 \pm 6$  mmHg (SR 48968, n = 5),  $-5 \pm 4$  mmHg (SB 222201, n = 8),  $-11 \pm 4$  mmHg (vehicle, n = 6). All these drugs were injected in the afternoon.

*Cardiovascular response induced by i.c.v. SB 222200 in bilaterally nephrectomized SHR*

In contrast to data presented at 13.00 h (Figure 1-A), there was a quicker recovery toward baseline when 500 pmol of SB 222200 was administered i.c.v. at 07.00 h (Figure 3-A). The

maximal decrease in MAP peaked at 3h ( $-29 \pm 5$  mmHg,  $n = 6$ ,  $P < 0.01$ ) and the response was no more significant 6 h post-injection in SHR.

The time-course of the anti-hypertensive response induced by i.c.v. injection of 500 pmol SB 222200 at 07.00 h was quite similar and not significantly different in intact and bilaterally nephrectomized SHR (Figure 3-A). The same treatment with SB 222200 had no significant effect on heart rate in intact and bilaterally nephrectomized SHR (Figure 3-B). When the antagonist was injected at 13.00 h, the anti-hypertensive response was not significantly different in intact (maximal  $\Delta$ MAP =  $-37 \pm 9$  mmHg,  $n = 8$ ) and bilaterally nephrectomized SHR (maximal  $\Delta$ MAP =  $-40 \pm 16$  mmHg,  $n = 9$ ).

#### *Effect of SB 222200 on plasma levels of catecholamines and vasopressin in SHR*

Plasma levels of vasopressin, epinephrine, norepinephrine and dopamine measured in SHR at the peak of the maximal decrease in MAP (7-8h) induced by i.c.v. injection of 500 pmol SB 222200 were not significantly different from control values measured in the same animals (Table 2). Values of vasopressin were in the same range than those reported previously in SHR (Möhring *et al.*, 1979).

## Discussion

The present study provides the first pharmacological evidence that tachykinin NK<sub>3</sub> receptor antagonists exert dose-dependent and reversible anti-hypertensive effects when injected intracerebrally in SHR. This reduction of systemic blood pressure likely derives from specific blockade of brain NK<sub>3</sub> receptors because it was reproduced with two structurally unrelated molecules: a non-peptide (SB 222200) and a pseudo-peptide antagonist (R-820), while the inactive enantiomer SB 222201 was inactive. In addition to excluding non-specific CNS effects, the latter result with SB 222201 rules out the possibility that the decline in blood pressure over the recording period is merely due to the conditioning of the rats to recording apparatus. The dissimilar time course of the anti-hypertensive effect of R-820 and SB 222201 may be explained by their different pharmacological profiles: R-820 is more hydrophilic than SB 222200, a highly lipophilic molecule, which can rapidly diffuse into the brain after i.c.v. injection. The readily water soluble SB 235375 (Luttmann *et al.*, 2002) was found inactive most likely because it does not penetrate into the nervous tissue deeply enough to reach its target NK<sub>3</sub> receptors located beyond the circumventricular organs. While SB 222200 penetrates the blood brain barrier, R-820 does not (Regoli *et al.*, 1994; Sarau *et al.*, 2000). Thus the differential physico-chemical features of these molecules could explain why SB

222200 displays a quicker but shorter lasting effect than R-820. The site of action of these molecules is most likely located in the brain because both antagonists were ineffective when injected at similar doses in the systemic blood circulation. Even if SB 222200 crosses the blood brain barrier, the dose administered i.v. was insufficient to cause significant central effects. Our preliminary experiments have shown that i.v. injection of SB 222200 requires doses greater than  $1\text{mg kg}^{-1}$  to decrease systemic blood pressure. Recent results from our laboratory showed partial but significant decrease (about  $-20\text{ mmHg}$ ) of blood pressure during the first 3 h following microinjection of R-820 into the *substantia nigra* in SHR (Lessard et al., 2003). Thus, the inhibition of the nigro-striatal dopaminergic pathway may represent a putative target for i.c.v. NK<sub>3</sub> receptor antagonists in SHR, whereas other sites may also be involved.

Although heart rate was not affected by central administration of NK<sub>3</sub> antagonists, it is still uncertain whether the anti-hypertensive effect of these molecules is attributable to a decrease of cardiac output and/or peripheral resistance. We tested the hypothesis that the withdrawal of the sympathetic tone could be involved since it is well known that the activity and reactivity of this system are increased in experimental models of hypertension (de Champlain, 1990). I.c.v. injection of the NK<sub>3</sub> selective agonist senktide increased heart rate and blood pressure in normotensive rat (Cellier *et al.*, 1997) and in guinea-pig (Roccon *et al.*, 1996). This cardiovascular response was blocked by the prior i.c.v. injection of R-820 in rat

(Cellier *et al.*, 1997) and was ascribed to the activation of the sympathetic nervous system in guinea-pig (Roccon *et al.*, 1996). Also we recently suggested that the activation of NK<sub>3</sub> receptors in the rat *substantia nigra* evoked a tachycardia by enhancing the sympatho-adrenal drive to the heart (Lessard & Couture, 2001). However, the present study failed to show a significant reduction of plasma catecholamines at the peak of the anti-hypertensive effect of SB 222200. Although this finding provides an argument against a primary role for the sympatho-adrenal system, one cannot completely rule out that central NK<sub>3</sub> receptor antagonists may cause inhibitory action on sympathetic neurotransmission to specific organ beds (e.g., the vasculature). Differential effects of central NK<sub>3</sub> receptor activation and/or

inhibition on sympathetic outflow to the periphery may afford a reasonable explanation for the lack of changes on heart rate and the apparent discrepancy between the effects of NK<sub>3</sub> agonists and antagonists on the sympatho-adrenal system. I.c.v. agonists and antagonists can interact with different brain sites as consequence of dissimilarities in the physico-chemical properties of these molecules. Further studies will be necessary to explore these hypotheses.

Because the anti-hypertensive response displayed a slow onset and was subjected to a circadian cycle, a hormonal mechanism can take place. Incidentally, it was suggested that the hypothalamic NK<sub>3</sub> receptor is associated with the regulation of blood volume through a vasopressinergic-dependent mechanism. Indeed, NK<sub>3</sub> receptor agonists injected i.c.v. or

directly into the rat paraventricular nucleus of the hypothalamus increased plasma vasopressin levels (Polidori *et al.*, 1989; Massi *et al.*, 1991) and caused anti-diuretic, anti-natriuretic and pressor effects which were blocked by the prior i.c.v. injection of R-820 or by i.v. treatment with vasopressin V<sub>2</sub> and V<sub>1</sub> receptor antagonists (Nakayama *et al.*, 1992; Eguchi *et al.*, 1996; Yuan & Couture, 1997). However, the present results do not support the hypothesis that the anti-hypertensive effect of SB 222200 derived from an inhibition of the vasopressin release and the subsequent loss of its renal anti-diuretic action because plasma levels of vasopressin were not modified by SB 222200 and the anti-hypertensive effect of the drug persisted in bilaterally nephrectomized SHR. In addition to excluding a diuretic mechanism, results in bilaterally nephrectomized rats also exclude the participation of other renal influence such as the renin-angiotensin system.

Because i.c.v. NK<sub>3</sub> antagonists did not reduce blood pressure in normotensive WKY as already reported in Wistar rats (Couture *et al.*, 1995; Cellier *et al.*, 1997), it appears that central NK<sub>3</sub> receptors are unlikely to be involved in the central autonomic control of blood pressure in normotensive rats. On the other hand, they are likely activated by a greater basal release of NK<sub>3</sub> receptor agonists in the brain of SHR. Interestingly, NKB-like immunoreactive

contents were reported to be increased in discrete brain nuclei in SHR when compared to age-matched WKY (Nagashima *et al.*, 1984). It seems quite unlikely that the anti-hypertensive effects of SB 222200 and R 820 in SHR are mediated by central NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors mechanisms on the basis of the negative results obtained with antagonists at these receptors. While the role of central NK<sub>2</sub> receptors in brain functions remains elusive, central NK<sub>1</sub> receptors were reported to be associated with cardiovascular and behavioural responses occurring during stress and defence reaction (Culman & Unger, 1995; Culman *et al.*, 1997).

### *Conclusion*

This study provides the first pharmacological evidence that endogenous tachykinins exert greater tonic activation of central NK<sub>3</sub> receptors in SHR thereby contributing to the state of high blood pressure. The anti-hypertensive effect measured after the intracerebral injection of NK<sub>3</sub> antagonists appears to be unrelated to the inhibition of catecholamines and vasopressin release. Also, data rule out a diuretic effect and a renal endocrine component as putative mechanisms.

## Acknowledgements

The authors thank Dr Daniel Bichet (Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal) for the measurements of plasma vasopressin. The donation of the following compounds are also gratefully acknowledged: SB 222200/SB222201/SB 235375 from Dr Henry M. Sarau (GlaxoSmithKline, PA, USA), RP 67580 from Dr Claude Garret (Rhône-Poulenc Rorer, Vitry sur Seine, France), SR 48968 from Dr Xavier Emonds-Alt (Sanofi Recherche, Montpellier, France), and R-820 from Dr Jean-Luc Fauchère (Institut de recherches Servier, Paris, France). Andrée Lessard holds Studentships Awards from the Heart and Stroke Foundation of Canada and the FRSQ-FCAR program. This work was supported by a Grant-in-Aid from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-14379).

## References

- ADVENIER, C., ROUISSI, N., NGUYEN, Q.T., EMONDS-ALT, X., BRELIERE, J.C., NELIAT, G., NALINE, E. & REGOLI, D. (1992). Neurokinin A (NK<sub>2</sub>) receptor revisited with SR 48968, a potent non-peptide antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 1418-1424.
- BICHET, D.G., KORTAS, C., METTAUER, B., MANZINI, C., MARC-AURELE, J., ROULEAU, J.L. & SCHRIER, R.W. (1986). Modulation of plasma and platelet vasopressin by cardiac function in patients with heart failure. *Kidney Int.*, **29**, 1188-1196.
- CELLIER, E., BARBOT, L., IYENGAR, S. & COUTURE, R. (1999). Characterization of central and peripheral effects of septide with the use of five tachykinin NK<sub>1</sub> receptor antagonists in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **127**, 717-728.
- CELLIER, E., BARBOT, L., REGOLI, D. & COUTURE, R. (1997). Cardiovascular and behavioural effects of intracerebroventricularly administered tachykinin NK<sub>3</sub> receptor antagonists in the conscious rat. *Br. J. Pharmacol.*, **122**, 643-654.

- COUTURE, R., PICARD, P., POULAT, P. & PRAT, A. (1995). Characterization of the tachykinin receptors involved in spinal and supraspinal cardiovascular regulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**, 892-902.
- CULMAN, J., KLEE, S., OHLENDORF, C. & UNGER, TH. (1997). Effect of tachykinin receptor inhibition in the brain on cardiovascular and behavioral responses to stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 238-246.
- CULMAN, J. & UNGER, TH. (1995). Central tachykinins : mediators of defence reaction and stress reactions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**, 885-891.
- DE CHAMPLAIN, J. (1990). Pre- and postsynaptic adrenergic dysfunctions in hypertension. *J. Hypert.*, **8** (suppl.7), S77-S85.
- EGUCHI, T., TAKANO, Y., HATAE, T., SAITO, R., NAKAYAMA, Y., SHIGEYOSHI, Y., OKAMURA, H., KRAUSE, J.E. & KAMIYA, H.-O. (1996). Antidiuretic action of tachykinin NK-3 receptor in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res.*, **743**, 49-55.
- GARRET, C., CARRUETTE, A., FARDIN, V., MOUSSAOUI, S., PEYRONEL, J.F., BLANCHARD, J.C. & LADURON, P.M. (1991). Pharmacological properties of a

potent and selective nonpeptide substance P antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**,10208-10212.

HATAE, T., KAWANO, H., KARPITSKIY, V., KRAUSE, J.E. & MASUKO, S. (2001). Arginine-vasopressin neurons in the rat hypothalamus produce neurokinin B and co-express the tachykinin NK-3 receptor and angiotensin II type 1 receptor. *Arch. Histol. Cytol.*, **64**, 37-44.

HAY, D.W.P., GIARDINA, G.A.M., GRISWOLD, D.E., UNDERWOOD, D.C., KOTZER, C.J., BUSH, B., POTTS, W., SANDHU, P., LUNDBERG, D., FOLEY, J.J., SCHMIDT, D.B., MARTIN, L.D., KILIAN, D., LEGOS, J., BARONE, F.C., LUTTMANN, M.A., GRUGNI, M., RAVEGLIA, L.F. & SARAU, H.M. (2002). Nonpeptide tachykinin receptor antagonists. III. SB 235375, a low central nervous system-penetrant, potent and selective neurokinin-3 receptor antagonist, inhibits citric acid-induced cough and airways hyper-reactivity in guinea pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**, 314-323.

KOHLMANN, O., CESARETTI, M.L., GINOZA, M., TAVARES, A., ZANELLA, M.T., RIBEIRO, A.B., RAMOS, O.L., LEEMAN, S.E., GAVRAS, I. & GAVRAS, H. (1997). Role of substance P in blood pressure regulation in salt-dependent

experimental hypertension. *Hypertension*, **29** [part 2],506-509.

LE MELLÉDO, J.M., BRADWEJN, J., KOSZYCKI, D., BELLAVANCE, F. & BICHET, D. (2001). Arginine-vasopressin and oxytocin response to cholecystokinin-tetrapeptide. *Peptides*, **22**, 1349-1357.

LESSARD, A., CAMPOS, M.M., NEUGEBAUER, W. & COUTURE, R. (2003). Implication of nigral tachykinin NK<sub>3</sub> receptors in the maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats: a pharmacologic and autoradiographic study. *Br. J. Pharmacol.*, **138**, 554-563.

LESSARD, A. & COUTURE, R. (2001). Modulation of cardiac activity by tachykinins in the rat substantia nigra. *Br. J. Pharmacol.*, **134**, 1749-1759.

LESSARD, A. & COUTURE, R. (2001). Central tachykinin NK<sub>3</sub> receptor as a novel target for anti-hypertensive drugs. In *Peptide Receptors, from gene to therapy, An International Multidisciplinary Symposium, Montréal, Canada, July 29-August 2 2001, Abstract P 62, p.71.*

MASSI, M., SAIJA, A., POLIDORI, C., PERFUMI, M., GENTILI, L., COSTA, G. & DE CARO, G. (1991). The hypothalamic paraventricular nucleus is a site of action for

the central effect of tachykinins on plasma vasopressin. *Brain Res. Bull.*, **26**, 149-154.

MENS, W.B., ANDRINGA-BAKKER, E.A. & VAN WIMERSMA GREIDANUS, T.B. (1982). Changes in cerebrospinal fluid levels of vasopressin and oxytocin of the rat during various light-dark regimes. *Neurosci. Lett.*, **34** (1), 51-56.

MÖHRING, J., KINTZ, J. & SCHOUN, J. (1979). Studies on the role of vasopressin in blood pressure control of spontaneously hypertensive rats with established hypertension (SHR, stroke-prone strain). *J. Cardio. Pharmacol.*, **1**, 593-608.

MUSSO, N.R., VERGASSOLA, C., PENDE, A. & LOTTI, G. (1990). Simultaneous measurement of plasma catecholamines (norepinephrine, epinephrine, and dopamine) and free N-methyl dopamine (epinine) levels, by HPLC with electrochemical detection. *J. Liq. Chromatogr.*, **13**, 2217-2228.

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

- NAKAYAMA, Y., TAKANO, Y., SAITO, R. & KAMIYA, H.-O. (1992). Central pressor actions of tachykinin NK-3 receptor in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res.*, **595**, 339-342.
- OTSUKA, M. & YOSHIOKA, K. (1993). Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.*, **73**, 229-308.
- PAGE, N.M., WOODS, R.J., GARDINER, S.M., LOMTHAISONG, K., GLADWELL, R.T., BUTLIN, D.J., MANYONDA, I.T. & LOWRY, P.J. (2000). Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature*, **405**, 797-800.
- POLIDORI, C., SAIJA, A., PERFUMI, M., COSTA, G., DE CARO, G. & MASSI, M. (1989). Vasopressin release induced by intracranial injection of tachykinins is due to activation of central neurokinin-3 receptors. *Neurosci. Lett.*, **103**, 320-325.
- REGOLI, D., BOUDON, A. & FAUCHÈRE, J.-L. (1994). Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol. Rev.*, **46**, 551-599.
- REMIE, R. & ZAAGSMA, J. (1986). A new technique for the study of vascular presynaptic receptors in freely moving rats. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.*

20), **251**, H463-H467.

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

ROCCON, A., MARCHIONNI, D. & NISATO, D. (1996). Study of SR 142801, a new potent non-peptide NK<sub>3</sub> receptor antagonist on cardiovascular responses in conscious guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.*, **118**, 1095-1102.

SARAU, H.M., GRISWOLD, D.E., BUSH, B., POTTS, W., SANDHU, P., LUNDBERG, D., FOLEY, J.J., SCHMIDT, D.B., WEBB, E.F., MARTIN, L.D., LEGOS, J.J., WHITMORE, R.G., BARONE, F.C., MEDHURST, A.D., LUTTMANN, M.A., GIARDINA, G.A.M. & HAY, D.W.P. (2000). Nonpeptide tachykinin receptor antagonists. II. Pharmacological and pharmacokinetic profile of SB-222200, a central nervous system penetrant, potent and selective NK-3 receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **295**, 373-381.

- TAKANO, Y., NAGASHIMA, A., HAGIO, T., TATEISHI, K. & KAMIYA, H.-O. (1990). Role of central tachykinin peptides in cardiovascular regulation in rats. *Brain Res.*, **528**, 231-237.
- UNGER, TH., RASCHER, W., SCHUSTER, C., PAVLOVITCH, R., SCHÖMIG, A., DIETZ, R. & GANTEN, D. (1981). Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II : Role of the sympathetic nervous system and vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.*, **71**, 33-42.
- WALTERS, J.F., SKENE, D.J., HAMPTON, S.M. & FERNS, G.A.A. (2003). Biological rhythms, endothelial health and cardiovascular disease. *Med. Sci. Monit.*, **9** (1), RA1-8.
- WATANABE, K., VANECEK, J. & YAMAOKA, S. (2000). In vitro entrainment of the circadian rhythm of vasopressin-releasing cells in suprachiasmatic nucleus by vasoactive intestinal polypeptide. *Brain Res.*, **877**, 361-366.
- WINDLE, R.J., FORSLING, M.L. & GUZEK J.W. (1992). Daily rhythms in the hormone content of the neurohypophysial system and release of oxytocin and vasopressin in the male rat: effect of constant light. *J. Endocrinol.*, **133** (2), 283-

290.

YAMAGUCHI, N. (1993). In vivo evidence for adrenal catecholamine release mediated by nonnicotinic mechanism: local medullary effect of VIP. *Am. J. Physiol., (Reg. Int. Comp. Physiol.)*, **265**, R766-R771.

YAMASAKI, F., SCWARTZ, J.E. & GERBER, L.M. (1998). Impact of shift work and race/ethnicity on the diurnal rhythm of blood pressure and catecholamines. *Hypertension*, **32**, 417-423.

YUAN, Y.-D. & COUTURE, R. (1997). Renal effects of intracerebroventricularly injected tachykinins in the conscious saline-loaded rat : receptor characterization. *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 785-796.

### Figure Legends

**Figure 1:** Changes in mean arterial pressure ( $\Delta$ MAP) following (A) i.c.v. injection (13.00 h) of vehicle (n = 12) or SB 222200 at 100 pmol (n = 7), 250 pmol (n = 7) and 500 pmol (n = 8) in SHR or at 500 pmol in WKY (n = 12). Basal values were:  $177 \pm 3$  mmHg (vehicle),  $171 \pm 16$  mmHg (100 pmol),  $180 \pm 11$  mmHg (250 pmol),  $184 \pm 8$  mmHg (500 pmol) and  $131 \pm 3$  mmHg (500 pmol, WKY), (B) i.v. injection of vehicle (n = 12) or 500 pmol SB 222200 (n=7) in SHR. Basal values were:  $171 \pm 4$  mmHg (vehicle) and  $184 \pm 8$  mmHg (500 pmol), and (C) i.c.v. injection (13.00 h) of vehicle (n = 6) or SB 222201 (n = 6), SB 235375 (n = 8), RP 67580 (n = 6) or SR 48968 (n = 5) at the dose of 500 pmol. Basal values were:  $174 \pm 7$  mmHg (vehicle),  $172 \pm 1$  mmHg (SB 222201),  $195 \pm 13$  mmHg (RP 67580),  $182 \pm 10$  mmHg (SR 48968) and  $163 \pm 6$  mmHg (SB 235375). Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of (n) rats. Comparison to vehicle values is indicated by \*P<0.05, \*\*P<0.01.

**Figure 2:** Changes in mean arterial pressure ( $\Delta$ MAP) (A) and heart rate ( $\Delta$  HR) (B) following i.c.v. injection (13.00 h) of vehicle (n = 10) or R-820 at the dose of 50 pmol (n = 6) and 500 pmol in SHR (n = 10) or 500 pmol in WKY (n = 4). The dose of 500 pmol i.v. of R-820 (n = 4) is also shown on MAP in SHR. Basal values were:  $169 \pm 5$  mmHg and  $347 \pm 14$  bpm

(vehicle),  $170 \pm 4$  mmHg and  $344 \pm 22$  bpm (500 pmol R-820, i.c.v.),  $153 \pm 6$  mmHg (50 pmol R-820, i.c.v.),  $176 \pm 6$  mmHg (500 pmol R-820, i.v.), in SHR and  $134 \pm 5$  mmHg (R-820, 500 pmol, i.c.v.) in WKY. For the sake of clarity, only the dose of R-820 which decreased MAP was illustrated on HR. Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of (n) rats. Comparison to vehicle values is indicated by \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

**Figure 3:** Changes in mean arterial pressure ( $\Delta$ MAP) (A) and heart rate ( $\Delta$  HR)

(B) following i.c.v. injection (07.00 h) of 500 pmol SB 222200 in intact SHR (n = 6) and bilaterally nephrectomized SHR (n = 5) or vehicle in bilaterally nephrectomized SHR (n = 6). Basal values were:  $178 \pm 8$  mmHg and  $336 \pm 16$  bpm in intact SHR,  $175 \pm 5$  mmHg and  $330 \pm 43$  bpm in nephrectomized SHR (vehicle), and  $166 \pm 10$  mmHg and  $344 \pm 38$  bpm in nephrectomized SHR (SB 222200). Each point represents the mean  $\pm$  s.e.mean of (n) rats. Comparison to vehicle values is indicated by \*\* $P < 0.01$ . No statistical difference was found between intact and bilaterally nephrectomized SHR.

**Table 1:** Heart rate values (bpm) following i.c.v. injection of tachykinin antagonists in SHR.

Time	Vehicle	SB 222200	SB 222200	SB 222201	RP 67580	SR 48968	SB 235375
post-injection	(n=8)	250 pmol	500 pmol	500 pmol	500 pmol	500 pmol	500 pmol
(h)		(n=7)	(n=8)	(n=6)	(n=6)	(n=5)	(n=8)
0	347 ± 14	331 ± 12	363 ± 10	372 ± 19	373 ± 20	394 ± 22	301 ± 13
1	344 ± 12	347 ± 16	370 ± 11	368 ± 16	352 ± 17	378 ± 25	325 ± 29
2	351 ± 13	346 ± 19	366 ± 11	373 ± 16	382 ± 18	390 ± 20	340 ± 25
3	368 ± 16	353 ± 25	356 ± 10	387 ± 19	390 ± 24	394 ± 25	317 ± 25
4	359 ± 18	337 ± 28	374 ± 12	382 ± 15	392 ± 31	388 ± 20	305 ± 22
5	370 ± 18	337 ± 24	353 ± 12	393 ± 23	393 ± 31	398 ± 18	308 ± 20
6	361 ± 17	330 ± 22	362 ± 13	388 ± 16	387 ± 27	402 ± 23	313 ± 21
7	366 ± 17	331 ± 22	363 ± 9	388 ± 19	382 ± 26	402 ± 22	305 ± 22
8	360 ± 17	346 ± 15	359 ± 14	378 ± 16	367 ± 26	404 ± 23	304 ± 21
24	363 ± 10	373 ± 25	353 ± 11	—	—	—	296 ± 14

Values represent the mean ± s.e.m. of (n) rats. None of the antagonists produced statistical changes in heart rate after i.c.v. injection (comparison to pre-injection values at time 0 h).

**Table 2:** Values of mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), and plasma levels of vasopressin (Group 1) and catecholamines (Group 2) in the presence and absence (control) of SB 222200 (500 pmol, i.c.v.) in SHR

	Basal	SB 222200 7-8 h post- injection	Control
<i>Group 1</i>			
MAP (mmHg)	169 ± 4	133 ± 3**	170 ± 5
HR (beats min <sup>-1</sup> )	308 ± 22	290 ± 17	311 ± 16
Vasopressin (pg ml <sup>-1</sup> )	—	4.9 ± 2.0	6.9 ± 4.2
<i>Group 2</i>			
MAP (mmHg)	174 ± 3	136 ± 2**	172 ± 3
HR (beats min <sup>-1</sup> )	363 ± 10	353 ± 11	370 ± 19
Epinephrine (pg ml <sup>-1</sup> )	—	158 ± 52	187 ± 54
Norepinephrine (pg ml <sup>-1</sup> )	—	239 ± 31	253 ± 29

Dopamine (pg ml <sup>-1</sup> )	—	59 ± 7	49 ± 6
------------------------------------	---	--------	--------

---

Values represent the mean ± s.e.mean of 8 SHR (Group 1) and 16 SHR (Group 2)

\*\*P<0.01 when compared to control values (Student's *t*-test).

Figure 1

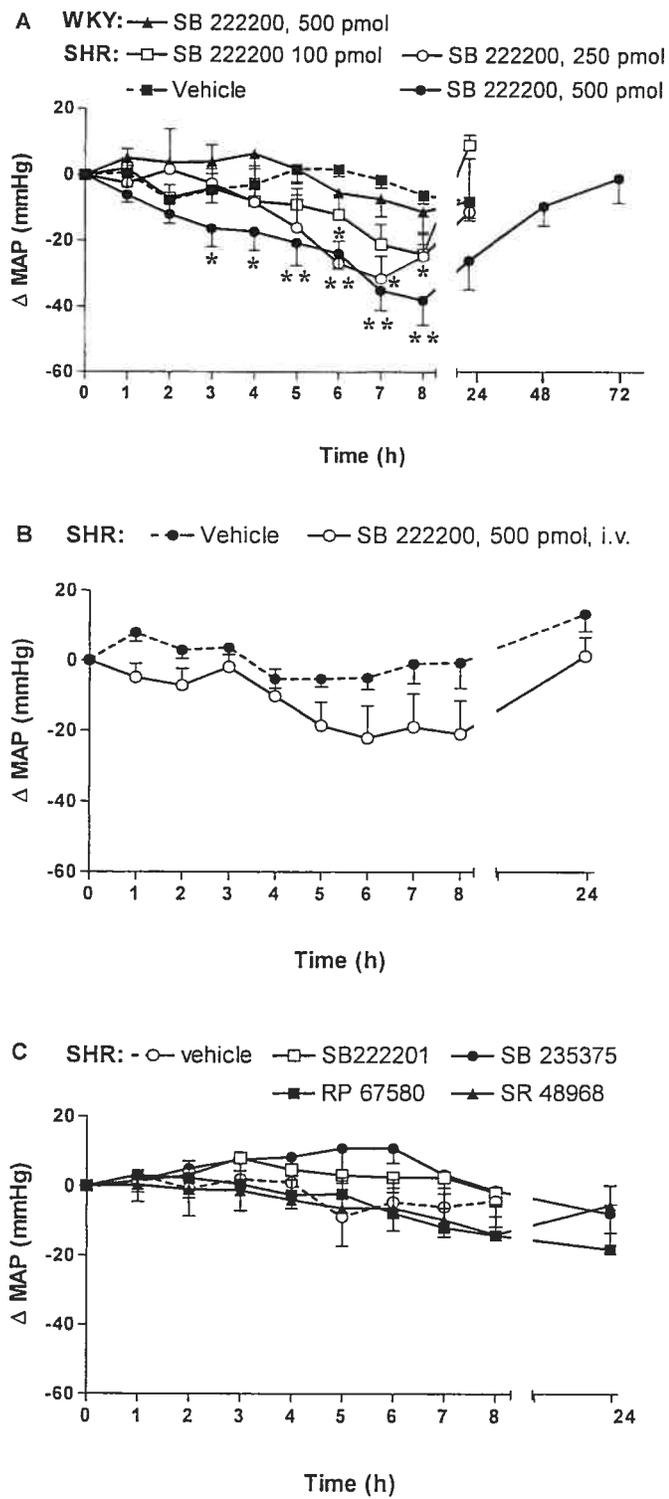
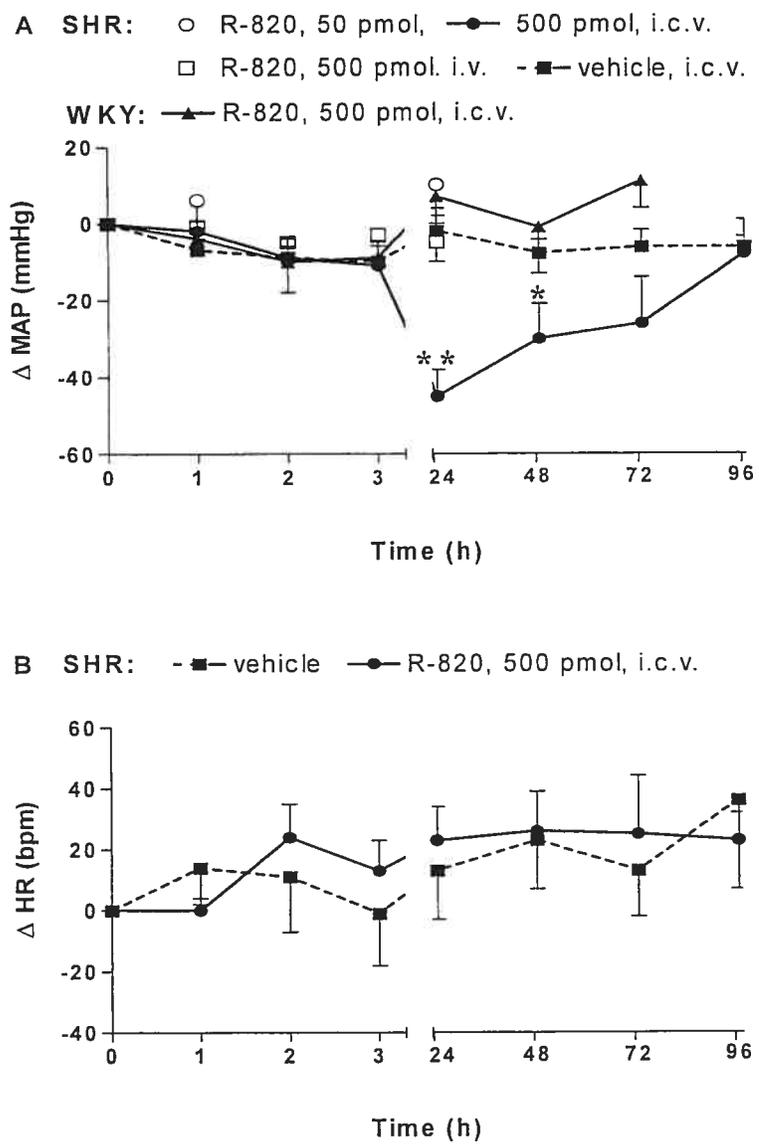
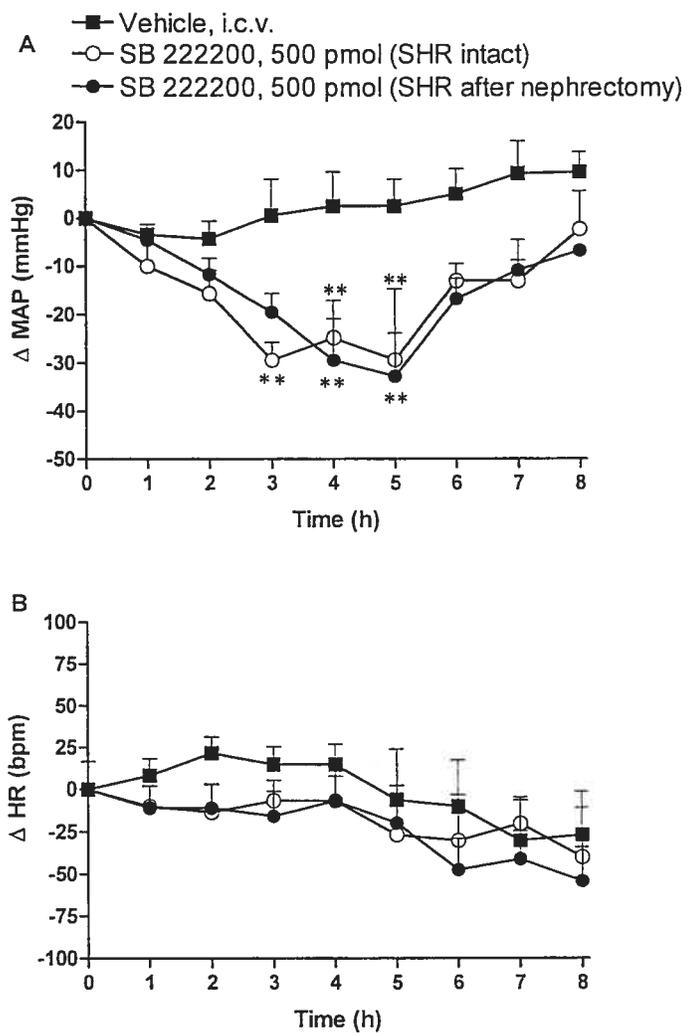


Figure 2



A Lessard, M Laurin, N Yamaguchi & R Couture  
Figure 3



# **CHAPITRE V**

## **QUATRIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES**

### **EFFETS CARDIOVASCULAIRES SUITE À L'ACTIVATION DES TROIS RÉCEPTEURS DES TACHYKININES DANS L'AIRE TEGMENTALE VENTRALE CHEZ LE RAT**

**Andrée Lessard & Réjean Couture**

Résultats non publiés

## 5.1 Introduction

L'aire tegmentale ventrale (ATV), région située dans la portion supérieure du mésencéphale, renferme les corps cellulaires des neurones dopaminergiques des voies mésocorticales-mésolimbiques (A10). Tel que mentionné dans l'Introduction (chapitre I), cette région contient des récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> des tachykinines, ainsi que la substance P et la neurokinine A (Stoessl & Hill, 1990; Dam *et al.*, 1990; Shughrue *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998). Les tachykinines de l'ATV modulent la libération de dopamine dans le noyau acumbens du striatum et dans le cortex préfrontal *via* l'activation du récepteur NK<sub>3</sub> (Marco *et al.*, 1998). Les études antérieures de ce laboratoire ont montré que les effets cardiovasculaires du senktide (agoniste des récepteurs NK<sub>3</sub>), injecté i.c.v. chez le rat, sont bloqués par un traitement i.v. avec l'halopéridol, un antagoniste spécifique mais non sélectif aux récepteurs dopaminergiques. La suite de ce projet consistait donc à évaluer l'implication de la voie A9 (nigrostriée) dans les effets cardiovasculaires du senktide. Nous avons également émis l'hypothèse que la voie A10 serait impliquée dans ces effets. L'étude sur la substance noire fut privilégiée puisqu'on lui a attribué un rôle potentiel dans le maintien de l'hypertension artérielle (van den Buuse *et al.*, 1991; Linthorst *et al.*, 1994). Puisque ces deux noyaux sont très rapprochés l'un de l'autre, il n'est pas impossible que les agents injectés dans la substance noire (0.1 µl dans chaque noyau) diffusent jusqu'à l'ATV et provoquent une partie des effets cardiovasculaires attribués à la substance noire.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré la pression artérielle et la fréquence cardiaque suite à des microinjections (0.2  $\mu$ l) d'agonistes NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> dans l'ATV chez le rat Wistar éveillé. Nous avons ensuite comparé ces résultats à ceux obtenus suite aux microinjectionx des mêmes agents dans la substance noire.

## 5.2 Matériel et méthodes

### 5.2.1 Implants chirurgicaux

Les soins prodigués aux animaux et les protocoles expérimentaux sont conformes aux lignes directrices du Conseil Canadien pour la protection des animaux et ont été approuvés par le Comité de déontologie animale de l'Université de Montréal. Les rats Wistar mâles (300-400g, Charles River, St-Constant, Québec, Canada) ont été anesthésiés au pentobarbital sodique ( $65 \text{ mgkg}^{-1}$ , i.p.) (Somnotol, MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada) puis placés sur une table stéréotaxique (David Kopf Instrumentation, Tujunga, CA, U.S.A.). Le crâne a été soigneusement nettoyé puis une canule guide (17 mm) a été insérée 2 mm au-dessus de l'ATV (coordonées : A.P. : 5.3 mm, L. : 0.7 mm, V. : 7.5 mm en référence au point Bregma, (Paxinos & Watson, 1986)). La canule guide a été fixée par l'application d'un ciment dentaire, la peau a été remplacée et suturée. Une période de récupération de 7 jours a été accordée aux rats, où ils ont reposé dans des cages de plastique individuelles (40 cm x 23 cm x 20 cm), sous un cycle lumière/obscurité de 12h avec accès libre à l'eau et à la nourriture.

Une semaine après la première chirurgie, les rats ont été ré-anesthésiés au pentobarbital sodique. Un cathéter de polyéthylène (PE-60, Intramedics, Clay Adams, NJ, U.S.A.) siliconisé (Sigmacote, Sigma, St-Louis, MO, U.S.A.) contenant de la saline physiologique héparinée (100 i.u./ml de saline, Sigma, St-Louis, MO, U.S.A.) a été

introduit dans l'aorte descendante via l'artère fémorale pour permettre la mesure des paramètres cardiovasculaires. Avant chaque chirurgie (insertion de la canule guide et du cathéter intra-aortique), les animaux ont reçu un antibiotique (Ethacilin, 5 mgkg<sup>-1</sup>, i.m., rogar/S.T.B. Inc., London, Ontario, Canada) et un analgésique (Anafen, 10 mgkg<sup>-1</sup>, i.m. MERIAL Canada Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada). Un seul animal a présenté un comportement anormal (perte de plus de 25% du poids corporel, faiblesse, anorexie) et a été sacrifié par une injection létale de pentobarbital sodique. Les protocoles expérimentaux ont été réalisés 48 h après la dernière intervention, chez les rats conscients et non immobilisés.

### **5.2.2 Mesure des paramètres cardiovasculaires et comportementaux**

Pendant toute la durée des expériences, la pression artérielle pulsatile et la fréquence cardiaque (FC) ont été mesurées de façon continue à l'aide d'un transducteur de pression Statham (P23ID) et d'un tachomètre cardiaque (modèle 7P4, activé par les pulsations de la pression sanguine), lesquels sont reliés à un polygraphe Grass (modèle 79; Grass Instruments co., Quincy, MA, U.S.A.). Le protocole a été exécuté au moins une heure après le transport des animaux dans la salle d'enregistrement, où seul l'expérimentateur a accès. Les animaux n'ont pas été changés de cage mais la grille a été enlevée, les privant ainsi de l'eau et de la nourriture pendant la durée de l'expérience (6h ou moins). Lorsqu'une pression artérielle et une fréquence cardiaque stables ont été obtenues, une aiguille à microinjection (19mm) a été insérée dans la canule guide sans manipulation de l'animal. L'aiguille à injection était reliée à un tube de polyéthylène (PE-

10, Intramedics, Clay Adams, NJ, U.S.A.) et une microseringue Hamilton (5  $\mu$ l, Fisher Scientific Ltd, Montréal, Québec, Canada). Toutes les solutions ont été injectées manuellement dans l'ATV (0.2  $\mu$ l) sur une période de 1 minute. L'activité comportementale a été mesurée selon une méthode décrite précédemment (Picard *et al.*, 1994; Cellier *et al.*, 1997, 1999; Lessard & Couture, 2001). En résumé, à chaque période de 15 secondes suivant l'injection de l'agoniste, un compte de 1 ou 0 a été accordé selon la manifestation ou non du comportement (reniflement, exploration, toilettage du museau et des pattes arrières, grattement de la tête) par le rat, indépendamment de sa durée ou de son intensité. La somme de tous ces comptes pour les 30 premières min post-injection (maximum : 120) fournit le compte total pour ces comportements. Le compte pour les secousses corporelles a été évalué en fonction du nombre d'épisodes durant les 30 premières min post-injection.

### 5.2.3 Histologie

À la fin de chaque expérience, les animaux ont été sacrifiés par une injection létale de pentobarbital sodique, puis 0.2  $\mu$ l de colorant (Evans Blue dye, Sigma, St-Louis, MO, U.S.A.) a été injecté dans la canule guide pour marquer l'emplacement des aiguilles à injection. Les cerveaux ont été prélevés et fixés dans une solution de formol 10% (v v<sup>-1</sup>) et de sucrose 20% (p v<sup>-1</sup>). Des sections coronales de cerveau ont été obtenues (40  $\mu$ m) à l'aide d'un cryostat à -15°C. Les coupes ont été placées sur des lames de verre, colorées au crésyl violet et soumises à des observations histologiques (Figure 1). Un seul rat a montré un site de microinjection à l'extérieur de l'ATV et a été exclu de l'analyse finale

des résultats. Celui-ci ne présentait cependant aucun effet cardiovasculaire significatif suite à l'injection des agonistes et présentait un comportement anormal (perte de motilité, anorexie, faiblesse générale). Une hémorragie cérébrale a été observée chez ce rat.

#### 5.2.4 Protocole expérimental : courbe dose-réponse aux agonistes

Le protocole utilisé est identique à celui de l'expérience 1 du chapitre II de cette thèse. En résumé, les rats ont été utilisés 4 jours consécutifs. Au jour 1, on a administré le véhicule (liquide cérébrospinal artificiel contenant 10% de diméthyle sulfoxyde, n=8) et, au moins 1 heure plus tard, les agonistes sélectifs aux récepteurs NK<sub>1</sub> ([Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP, n=8), NK<sub>2</sub> ([β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10), n=5) et NK<sub>3</sub> (senktide, n=6) ont été injectés à la dose de 25 pmol chez les mêmes animaux de façon aléatoire à intervalles d'au moins 1 heure pour permettre aux paramètres cardiovasculaires de retourner au niveau de base. Les mêmes agonistes ont été injectés les jours suivants à la dose de 50 pmol (jour 2), 100 pmol (jour 3, [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP et [β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10)) et 1 nmol (jour 4, [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP).

#### 5.2.5 Drogues et solutions utilisées

La composition du liquide cérébrospinal artificiel était, en mM : NaCl 128.6, KCl 2.6, MgCl<sub>2</sub> 2.0 et CaCl<sub>2</sub> 1.4; pH ajusté à 7.2. Le [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP provenait de Peninsula Lab. Inc (San Carlos, CA, U.S.A.) alors que le [β-Ala<sup>8</sup>]NKA(4-10) et le senktide (Suc-Asp-Phe-MePhe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) provenaient de Bachem Bioscience

Inc. (King of Prussia, PA, U.S.A.). Le [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP a été solubilisé dans le liquide cérébrospinal artificiel alors que les deux autres agonistes ont été solubilisés dans le diméthyle sulfoxyde (Fisher Scientific, Montréal, Québec, Canada). La solution a été complétée avec du liquide cérébrospinal artificiel où la solution finale contenait 10% ou moins de diméthyle sulfoxyde. Les solutions concentrées des trois agents ont été divisées en aliquots de 100 µl et conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

### 5.2.6 Statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± l'écart-type de (n) rats. Les effets temporels sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque ont été comparés avec une ANOVA à deux voies suivie d'un test de Bonferroni. Les réponses comportementales ont été comparées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Le seuil de signification a été établi à  $P < 0,05$ .

## 5.3 Résultats

### 5.3.1 Effets cardiovasculaires de l'agoniste du récepteur NK<sub>1</sub>

L'administration de l'agoniste des récepteurs NK<sub>1</sub> ([Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP) dans l'ATV provoque des augmentations significatives ( $P < 0.05$ ) de la fréquence cardiaque (25,50,100 et 1000 pmol, ANOVA : 0-60 min) et de la pression artérielle moyenne (50,100 et 1000 pmol, ANOVA : 0-60 min), comparativement aux valeurs obtenues suite à l'injection du véhicule ( $n=8$ ) (Figure 2). Les augmentations maximales de fréquences cardiaques sont de  $65 \pm 27$  bpm (25 pmol, 5 min,  $n=8$ ),  $87 \pm 33$  bpm (50 pmol, 20 min,  $n=7$ ),  $75 \pm 27$  bpm (100 pmol, 15 min,  $n=6$ ) et  $81 \pm 34$  bpm (1000 pmol, 10 min,  $n=6$ ). Les augmentations maximales de pression artérielle moyenne (PAM) sont de  $5 \pm 3$  mmHg (25 pmol, 5 min,  $n=8$ ,  $P > 0.05$ ),  $9 \pm 4$  mmHg (50 pmol, 20 min,  $n=7$ ),  $17 \pm 7$  mmHg (100 pmol, 20 min,  $n=6$ ) et  $10 \pm 3$  mmHg (1000 pmol, 20 min,  $n=6$ ).

À titre de comparaison, les changements de PAM et de FC suite à l'injection (50 pmol) du [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP dans l'ATV et la substance noire (SN) (données provenant du chapitre II) sont présentés à la Figure 3. Les amplitudes maximales des tachycardies provoquées par cet agoniste injecté dans l'ATV, comparativement à une même injection dans la SN, sont significativement différentes. De plus, les différences de PAM entre l'administration de l'agoniste dans l'ATV et la SN sont significativement différentes ( $P < 0.05$ , ANOVA, deux voies).

### 5.3.2 Effets cardiovasculaires de l'agoniste du récepteur NK<sub>2</sub>

L'administration de l'agoniste des récepteurs NK<sub>2</sub> ( $[\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}(4\text{-}10)$ ) dans l'ATV provoque des augmentations significatives ( $P < 0.05$ ) de la fréquence cardiaque (25, 50 et 100 pmol, ANOVA : 0-60 min) et de la pression artérielle moyenne (25 pmol, ANOVA : 0-60 min), comparativement aux valeurs obtenues suite à l'injection du véhicule ( $n=8$ ) (Figure 4). Les augmentations maximales de fréquences cardiaques sont de  $84 \pm 43$  bpm (25 pmol, 30 min,  $n=5$ ),  $68 \pm 26$  bpm (50 pmol, 45 min,  $n=4$ ) et  $67 \pm 18$  bpm (100 pmol, 15 min,  $n=6$ ). Les augmentations maximales de pression artérielle moyenne (PAM) sont de  $10 \pm 4$  mmHg (25 pmol, 25 min),  $2 \pm 3$  mmHg (50 pmol, 45 min,  $P > 0.05$ ) et  $1 \pm 3$  mmHg (100 pmol, 30 min,  $P > 0.05$ ).

À titre de comparaison, les changements de PAM et de FC suite à l'injection (50 pmol) du  $[\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}(4\text{-}10)$  dans l'ATV et la substance noire (SN) (données provenant du chapitre II) sont présentés à la Figure 5. Les augmentations de fréquence cardiaque et de pression artérielle moyenne provoquées par cet agoniste injecté dans l'ATV et dans la SN ne sont pas significativement différentes à cette dose.

### 5.3.3 Effets cardiovasculaires de l'agoniste du récepteur NK<sub>3</sub>

L'administration de l'agoniste des récepteurs NK<sub>3</sub> senktide dans l'ATV provoque des augmentations significatives ( $P < 0.05$ ) de la fréquence cardiaque (25 et 50 pmol, ANOVA : 0-60 min) et de la pression artérielle moyenne (50 pmol, ANOVA : 0-60 min), comparativement aux valeurs obtenues suite à l'injection du véhicule ( $n=8$ ) (Figure 6, A,B). Les augmentations maximales de fréquences cardiaques sont de  $43 \pm 27$  bpm (25 pmol, 10 min,  $n=6$ ) et  $53 \pm 25$  bpm (50 pmol, 30 min,  $n=6$ ). Les augmentations maximales de pression artérielle moyenne (PAM) sont de  $6 \pm 2$  mmHg (25 pmol, 10 min  $P > 0.05$ ) et  $9 \pm 3$  mmHg (50 pmol, 20 min).

Les changements de PAM et de FC suite à l'injection (25-50 pmol,  $n=18,19$ ) du senktide dans la substance noire (SN) (données provenant du chapitre II) sont présentés à la Figure 6 (C,D). Les amplitudes maximales des tachycardies provoquées par cet agoniste injecté dans l'ATV ( $P < 0.05$ , 0-45 min, Figure 6A), comparativement à une même injection dans la SN ( $P < 0.05$ , 0-15 min, Figure 6C), sont différentes à 25 et 50 pmol. De plus, les augmentations de pression artérielle observées suite à l'injection du senktide à 50 pmol dans l'ATV (Figure 6B) sont significativement différentes des changements de PAM du même agoniste injecté dans la SN (Figure 6D) (ANOVA deux voies).

#### 5.3.4 Effets comportementaux des agonistes

L'agoniste des récepteurs NK<sub>2</sub> ( $[\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}(4\text{-}10)$ ) ne provoque aucun changement sur l'activité comportementale. Cependant, les agonistes des récepteurs NK<sub>1</sub> ( $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}]\text{SP}$ , 50 pmol, n=7) et NK<sub>3</sub> (senktide, 50 pmol, n=6) ont augmenté l'activité comportementale de façon significative. À titre d'exemple, le  $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}]\text{SP}$  (50 pmol dans l'ATV) a augmenté significativement les épisodes de tous les comportements mesurés comparativement au véhicule. Le senktide (50 pmol dans l'ATV) a augmenté significativement les épisodes de reniflement, d'exploration, de toilettage du museau, de secousses corporelles et de grattage de la tête (Figure 7). Ces effets se sont produits de façon concomitante aux effets cardiovasculaires et ont présenté une cinétique similaire. Tous ces épisodes comportementaux n'ont pas été altérés de façon significative suite à l'injection du  $[\text{Sar}^9, \text{Met}(\text{O}_2)^{11}]\text{SP}$  et du senktide à la dose de 50 pmol dans la substance noire du rat (données provenant du chapitre II) (Figure 7).

### 5.3.5 Discussion

Bien que quelques travaux antérieurs aient démontré que les tachykinines de l'ATV peuvent moduler les fonctions cardiovasculaires (Cornish & van den Buuse, 1994, 1995; van den Buuse, 1998), cette étude montre pour la première fois des effets cardiovasculaires importants suite à des microinjections de faibles doses (pmol) des trois agonistes des tachykinines dans l'ATV chez le rat éveillé et non immobilisé. En effet, ces publications antérieures montrent que l'administration dans l'ATV du DiMe-C7, un analogue de la substance P, provoque des effets cardiovasculaires à la dose de 10 nmol (Cornish & van den Buuse, 1994, 1995; van den Buuse, 1998). De plus, le volume d'injection de l'agoniste dans l'ATV était de 1  $\mu$ l, comparativement à 0.2  $\mu$ l dans cette présente étude. Nous croyons que l'utilisation d'un petit volume d'injection diminue les risques d'une diffusion des agents pharmacologiques à l'extérieur de la région convoitée.

Les effets cardiovasculaires des agonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> étaient accompagnés d'une augmentation de l'activité comportementale. Ces résultats sont en accord avec le rôle reconnu de l'ATV dans l'activité locomotrice et dans la réaction cardiovasculaire et comportementale de défense suite à un stress (Elliott *et al.*, 1991; Kirouac & Ciriello, 1997; van den Buuse & Catanzariti, 2000; Kawahara *et al.*, 2002). Ainsi, l'administration des agonistes sélectifs aux récepteurs NK<sub>1</sub> (Ava[L-Pro9,N-Me-Leu10]SP(7-11) ou GR

73632) et NK<sub>3</sub> (senktide) des tachykinines dans l'ATV du rat augmente l'activité locomotrice de façon significative (Elliott *et al.*, 1991).

À l'instar des études effectuées au niveau de la substance noire, l'administration dans l'ATV de l'agoniste du récepteur NK<sub>1</sub> provoque des effets cardiovasculaires dont l'amplitude est supérieure à celle observée suite à l'injection de l'agoniste du récepteur NK<sub>3</sub>. Cette observation pourrait s'expliquer par une localisation cellulaire différente des deux récepteurs dans l'ATV. En effet, l'administration du senktide (agoniste sélectif aux récepteurs NK<sub>3</sub>) dans l'ATV augmente l'activité électrique des cellules dopaminergiques locales alors que l'agoniste du récepteur NK<sub>1</sub> (substance P-O-methyl ester) demeure inactif sur ces mêmes cellules (Seabrook *et al.*, 1995). De plus, l'administration du senktide dans l'ATV fait augmenter les niveaux de dopamine dans le noyau accumbens du striatum (Marco *et al.*, 1998). Il est ainsi suggéré que, contrairement aux récepteurs NK<sub>3</sub>, les récepteurs NK<sub>1</sub> sont situés sur les neurones non-dopaminergiques de l'ATV.

D'autre part, l'addition d'un antagoniste des récepteurs NK<sub>1</sub> (GR 205171) dans l'ATV augmente l'activité des cellules dopaminergiques dans cette région (Lejeune *et al.*, 2002). Par conséquent, il est suggéré que ces récepteurs sont situés sur des neurones inhibitrices, possiblement de type cholinergique ou gabaergique. Par microdialyse, il a été déterminé que les concentrations de dopamine augmentent dans le cortex préfrontal mais non dans le striatum suite à l'injection du GR205171 dans l'ATV. Par conséquent, il est suggéré que les récepteurs NK<sub>1</sub> de l'ATV inhibent les neurones dopaminergiques qui effectuent une projection dans le cortex préfrontal sans affecter les neurones

dopaminergiques qui se terminent dans le noyau accumbens du striatum (Lejeune *et al.*, 2002). Or, cette même voie dopaminergique mésocorticale est impliquée dans la régulation centrale des fonctions cardiovasculaires (Verberne *et al.*, 1987; Maskati & Zbrozyna, 1989; Kawahara *et al.*, 2002). Plusieurs études anatomiques ont montré l'existence d'une projection directe du cortex préfrontal au noyau du tractus solitaire, un noyau fortement impliqué dans le maintien des fonctions cardiovasculaires et des baroréflexes (Van der Kooy *et al.*, 1982; Terreberry & Neafsey, 1983; Van der Kooy *et al.*, 1984). Une stimulation électrique et chimique du cortex préfrontal provoque une hypotension de courte durée chez le rat éveillé et anesthésié (Hardy & Holmes, 1988; Sun, 1992; Bacon & Smith, 1993; Kirouac & Ciriello, 1997; Owens *et al.*, 1999) et diminue la réaction cardiovasculaire de défense à un stress provoqué par une stimulation électrique de l'hypothalamus ou de l'amygdale chez le rat anesthésié (Maskati & Zbrozyna, 1989). Une lésion chimique du cortex préfrontal n'affecte pas les valeurs de base de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque mais diminue significativement la sensibilité des baroréflexes (Verberne *et al.*, 1987). Ainsi, le noyau du tractus solitaire ne serait pas stimulé de façon tonique par le cortex préfrontal mais seulement lors de situations précises tel un stress physiologique.

En résumé, il est possible que les augmentations de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle moyenne observées suite à l'administration de l'agoniste NK<sub>1</sub> soit le résultat d'une inhibition transitoire de la voie dopaminergique mésocorticale alors que les effets de l'agoniste NK<sub>3</sub> seraient le résultat d'une activation directe de la voie

dopaminergique mésolimbique. En effet, cette dernière projection se termine dans l'amygdale, un noyau également impliqué dans la réaction cardiovasculaire de défense suite à un stress physiologique (van den Buuse & Catanzariti, 2000). D'autres travaux sont nécessaires pour confirmer ces hypothèses. De son côté, la localisation des récepteurs NK<sub>2</sub> demeure inconnue au niveau de l'ATV.

Ces séries d'expériences ont été effectuées à titre de contrôle pour la diffusion des agonistes de la substance noire à l'ATV. Les réponses maximales cardiovasculaires et comportementales obtenues sont significativement différentes de celles observées suite à l'injection des mêmes agonistes (NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub>) dans la substance noire. Ainsi, les agonistes des récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> provoquent des augmentations importantes de PAM à faible dose (25-100 pmol) dans l'ATV alors que ces agonistes n'altèrent pas la pression artérielle lorsqu'ils sont injectés aux mêmes doses dans la substance noire. Aussi, les tachycardies ont une amplitude supérieure à celles observées lors d'injection dans la substance noire. La dynamique temporelle des effets cardiovasculaires des agonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> est également différente: dans la substance noire, les effets sur le rythme cardiaque sont observés très rapidement (0.5-2 min) alors que dans l'ATV, l'effet se manifeste plus tard (9-10 min). De plus, au niveau de l'ATV, une augmentation de l'activité comportementale est observée à des doses beaucoup plus faibles (50 pmol, Figure 7) que dans la substance noire (1 nmol, Figure 5, chapitre II). Toutefois, on ne peut exclure la possibilité que ces effets comportementaux aient contribué à amplifier les effets cardiovasculaires des agonistes injectés dans l'ATV. De plus, ces travaux ne permettent pas d'exclure

complètement la possibilité que les effets des agonistes injectés dans la substance noire soient attribuables à une diffusion partielle des agents dans l'ATV ou vice versa de l'ATV à la substance noire. En effet, l'utilisation d'aiguilles à injection en métal, nécessaire sur ce modèle expérimental chez le rat éveillé, possède le désavantage d'utiliser un volume d'injection plus élevé (0.1  $\mu$ l au minimum) que celui relié à l'usage des micropipettes de verre chez l'animal anesthésié. Néanmoins, l'étude des coupes histologiques en *post-mortem* et l'injection des agonistes sur d'autres cibles à proximité des noyaux visés constituent un bon contrôle pour la distribution des agents dans le cerveau du rat.

### **Conclusion**

Ces résultats montrent que l'injection dans l'aire tegmentale ventrale de faibles doses des trois agonistes sélectifs aux récepteurs NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> des tachykinines provoque des augmentations de la fréquence cardiaque, de la pression artérielle moyenne et de l'activité comportementale chez le rat normotendu. Cette étude supporte un rôle pour les tachykinines dans la régulation centrale des fonctions cardiovasculaires et de l'activité comportementale au niveau de l'ATV.

### 5.3.6 Références

**Bacon, S.J. & Smith, A.D.** *A monosynaptic pathway from an identified vasomotor centre in the medial prefrontal cortex to an autonomic area in the thoracic spinal cord.* Neuroscience, **54**, 719-728, 1993.

**Cellier, E., Barbot, L., Regoli, D. & Couture, R.** *Cardiovascular and behavioural effects of intracerebroventricularly administered tachykinin NK3 receptor antagonists in the conscious rat.* Br J Pharmacol, **122**, 643-54, 1997.

**Cellier, E., Barbot, L., Iyengar, S. & Couture, R.** *Characterization of central and peripheral effects of septide with the use of five tachykinin NK1 receptor antagonists in the rat.* Br J Pharmacol, **127**, 717-28, 1999.

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

**Cornish, J.L. & van den Buuse, M.** *Pressor responses to electrical and chemical stimulation of the rat brain A10 dopaminergic system.* Neurosci Lett, **176**, 142-6, 1994.

**Cornish, J.L. & van den Buuse, M.** *Stimulation of the rat mesolimbic dopaminergic system produces a pressor response which is mediated by dopamine D-1 and D-2 receptor activation and the release of vasopressin.* Brain Res, **701**, 28-38, 1995.

**Dam, T.V., Escher, E. & Quirion, R.** Visualization of neurokinin-3 receptor sites in rat brain using the highly selective ligand [3H]senktide. Brain Res, **506**, 175-9, 1990.

**Elliott, P.J., Mason, G.S., Stephens-Smith, M. & Hagan, R.M.** *Behavioural and biochemical responses following activation of midbrain dopamine pathways by receptor selective neurokinin agonists.* Neuropeptides, **19(2)**, 119-126, 1991.

**Hardy, S.G. & Holmes, D.E.** *Prefrontal stimulus-produced hypotension in rat.* Exp. Brain Res., **73**, 249-255, 1988.

**Kawahara, Y., Kawahara, H. & Westerink, B.H.C.** *Hypotension-induced dopamine release in prefrontal cortex is mediated by local glutamatergic projections at the level of nerve terminals.* J. Neurochem., **81**, 285-291, 2002.

**Kirouac, G.J. & Ciriello, J.** *Cardiovascular depressor responses to stimulation of substantia nigra and ventral tegmental area.* Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol., 42), **273**, H2549-H2557, 1997.

**Lejeune, F., Gobert, A. & Millan, M.J.** *The selective neurokinin (NK)1 antagonist, GR 205171, stereospecifically enhances mesocortical dopaminergic transmission in the rat: a combined dialysis and electrophysiological study.* Brain Res., **935**, 134-139, 2002.

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

**Linthorst, A.C., van Giersbergen, P.L., Gras, M., Versteeg, D.H. & de Jong, W.** *The nigrostriatal dopamine system: role in the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats.* Brain Res, **639**, 261-8, 1994.

**Marco, N., Thirion, A., Mons, G., Bougault, I., Le Fur, G., Soubrie, P. & Steinberg, R.** *Activation of dopaminergic and cholinergic neurotransmission by tachykinin NK3 receptor stimulation: an in vivo microdialysis approach in guinea pig.* Neuropeptides, **32**, 481-8, 1998.

**Maskati, H.A.A. & Zbrozyna, A.W.** *Stimulation in prefrontal cortex area inhibits cardiovascular and motor components of the defence reaction in rats.* J. Auton. Nerv. Syst., **28**, 117-126, 1989.

**Owens, N.C., Sartor, D.M. & Ververne, A.J.** *Medial prefrontal cortex depressor response: role of the solitary tract nucleus in the rat.* Neuroscience, **89**, 1331-1346, 1999.

**Paxinos, G. & Watson, C.** *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Toronto, Canada: Academic Press, 1986.

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

**Seabrook, G.R., Bowery, B.J. & Hill, R.G.** *Pharmacology of tachykinin receptors on neurones in the ventral tegmental area of rat brain slices.* Eur. J. Pharmacol., **273**, 113-119, 1995.

**Shughrue, P.J., Lane, M.V. & Merchenthaler, I.** *In situ hybridization analysis of the distribution of neurokinin-3 mRNA in the rat central nervous system.* J Comp Neurol, **372**, 395-414, 1996.

**Stoessl, A.J. & Hill, D.R.** Autoradiographic visualization of NK-3 tachykinin binding sites in the rat brain, utilizing [3H]senktide. *Brain Res*, **534**, 1-7, 1990.

**Sun, M.K.** *Medullospinal vasomotor neurones mediate hypotension from stimulation of prefrontal cortex.* *J. Auton. Nerv. Syst.*, **38**, 209-217, 1992.

**Terreberry, R.R. & Neafsey, E.J.** *Rat medial prefrontal cortex; a visceral motor region with a direct projection to the solitary nucleus.* *Brain Res.*, **278**, 245-249, 1983.

**Van den Buuse, M., Linthorst, A.C., Versteeg, D.H. & de Jong, W.** *Role of brain dopamine systems in the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat.* *Clin Exp Hypertens A*, **13**, 653-9, 1991.

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

**Van den Buuse, M. & Catanzariti, R.** *Stimulation of the ventral tegmental area* *Pharmacol.*, **129**, 29-36, 2000.

**Van der Kooy, D., McGinty, J.F., Koda, L.Y., Gerfen, C.R. & Bloom, F.E.**

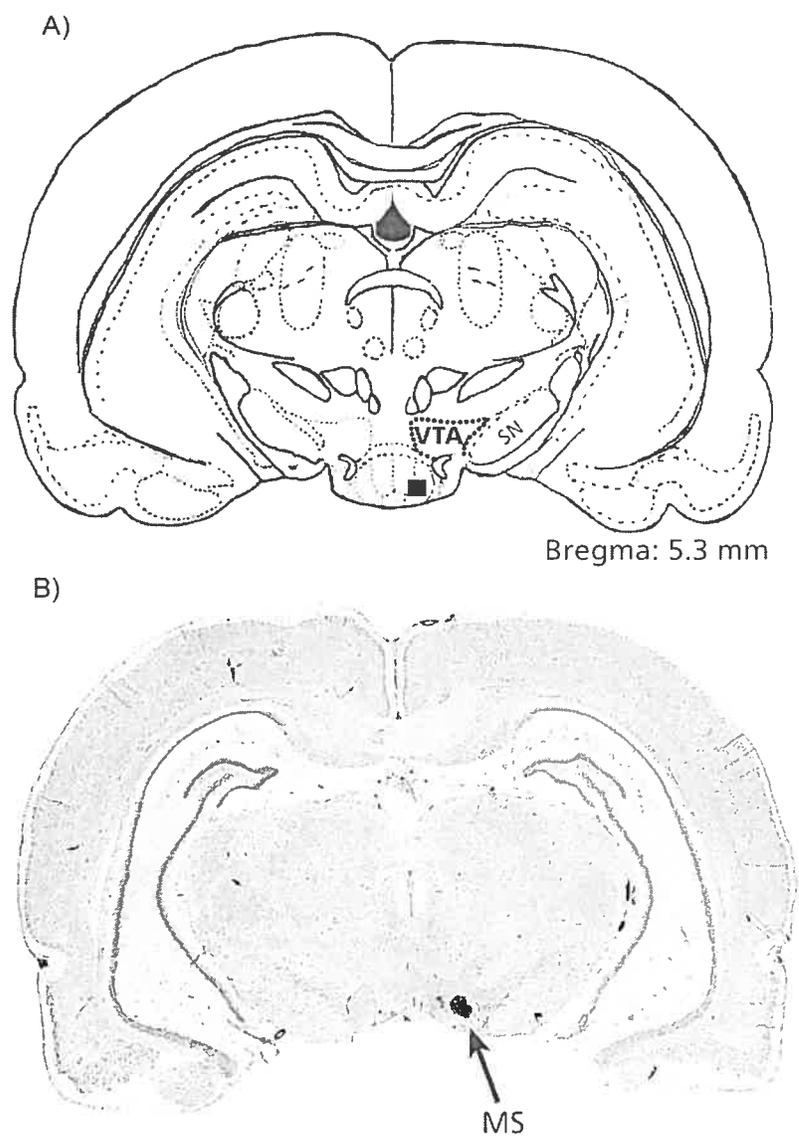
*Visceral cortex: a direct connection from prefrontal cortex to the solitary nucleus in rat.* Neurosci.Lett., **33**, 123-127, 1982.

**Van der Kooy, D., Koda, L.Y., McGinty, J.F., Gerfen, C.R. & Bloom, F.E.**

*The organization of projections from the cortex, amygdala and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat.* J. Comp. Neurol., **224**, 1-24, 1984.

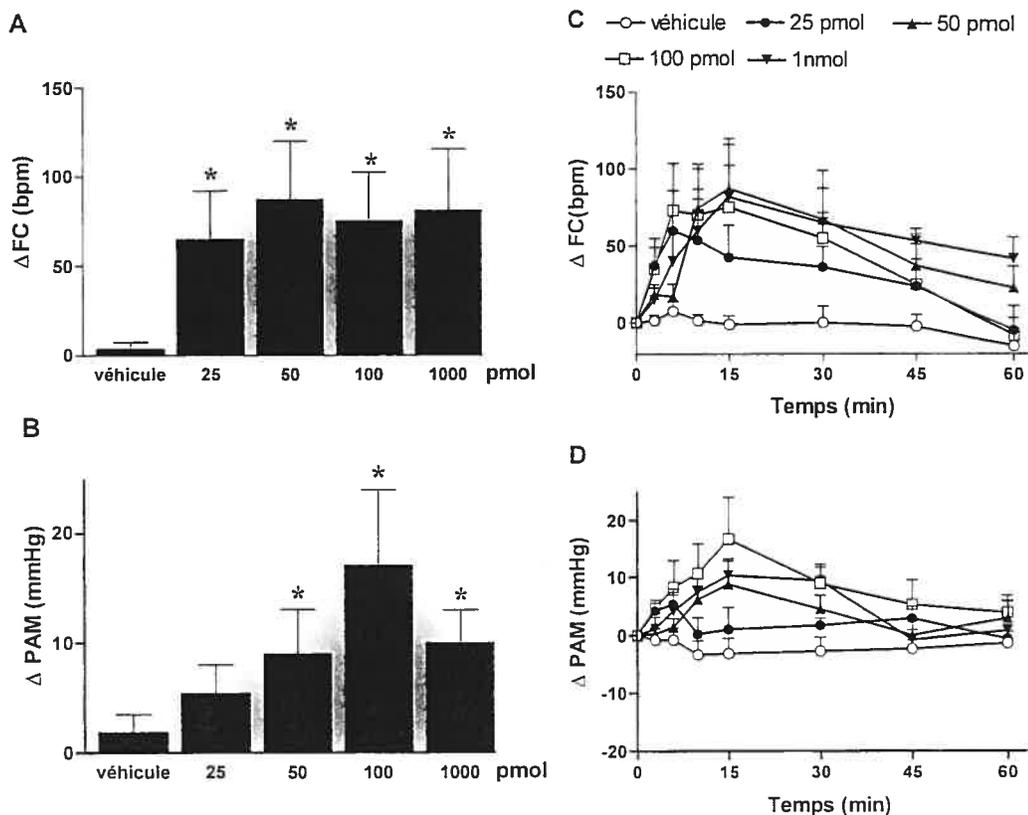
**Verberne, A.J.M., Lewis, S.J., Worland, P.J., Beart, P.M., Jarrott, B.,**

**Christie, M.J. & Louis, W.J.** *Medial prefrontal cortical lesions modulate baroreflex sensitivity in the rat.* Brain Res., **426**, 243-249, 1987.

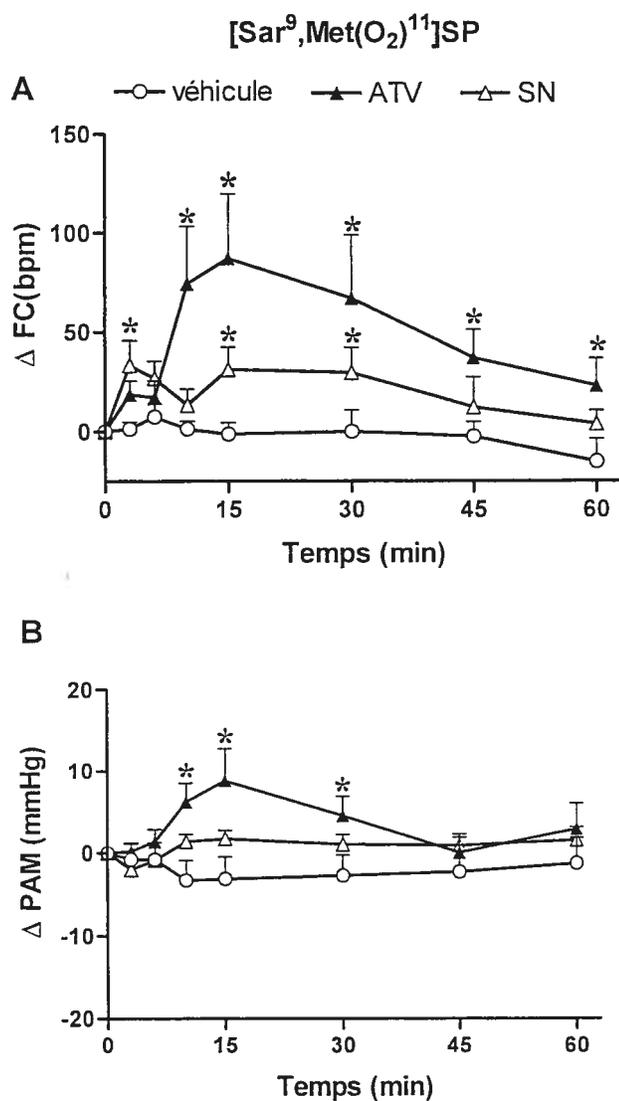


**Figure 1** Représentation schématique d'un site de microinjection: A), situé à l'extérieur de l'ATV et exclu de l'analyse finale des résultats (représenté par un carré noir) et B), acceptable au niveau de l'ATV. MS: microinjection site.

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

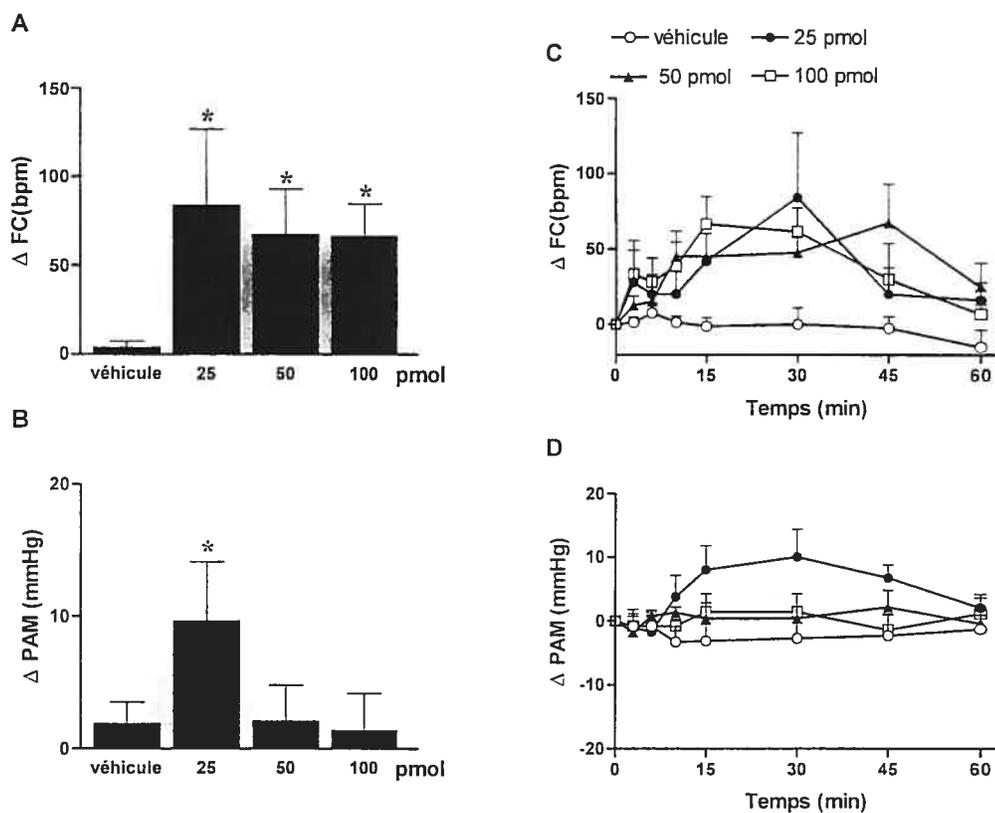


**Figure 2** Changements maximaux (A,B) et temporels (C,D) de fréquence cardiaque (FC) (A,C) et de pression artérielle moyenne (PAM) (B,D) suite à l'injection de [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP à 25 (n=8), 50 (n=7), 100 (n=6) et 1000 (n=6) pmol dans l'aire tegmentale ventrale du rat éveillé. Chaque point représente la moyenne ± l'écart-type de (n) rats. Les comparaisons statistiques ont été faites à l'aide d'un ANOVA à deux voies suivi d'un test de Bonferroni (en comparaison au véhicule, \*P<0.05 représenté en A et B seulement). Les valeurs basales sont : PAM : 102 ± 4 mmHg et FC : 357 ± 22 bpm chez les rats qui ont reçu les agents dans l'ATV.

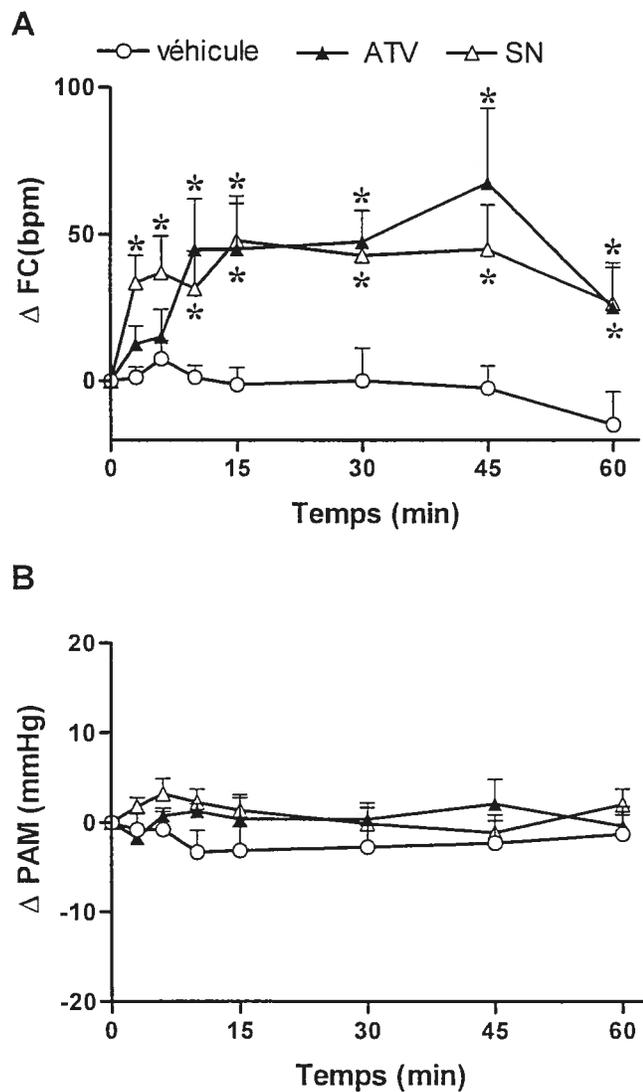


**Figure 3** Changements de fréquence cardiaque (FC) (A) et de pression artérielle moyenne (PAM) (B) suite à l'injection de [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP (50 pmol) dans l'aire tegmentale ventrale (ATV, n=7) ou la substance noire (SN, n=18) du rat éveillé. Chaque point représente la moyenne ± l'écart-type de (n) rats. Les comparaisons statistiques ont été faites à l'aide d'un ANOVA à deux voies suivi d'un test de Bonferroni (en comparaison au véhicule, \*P<0.05).

$[\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}(4\text{-}10)$

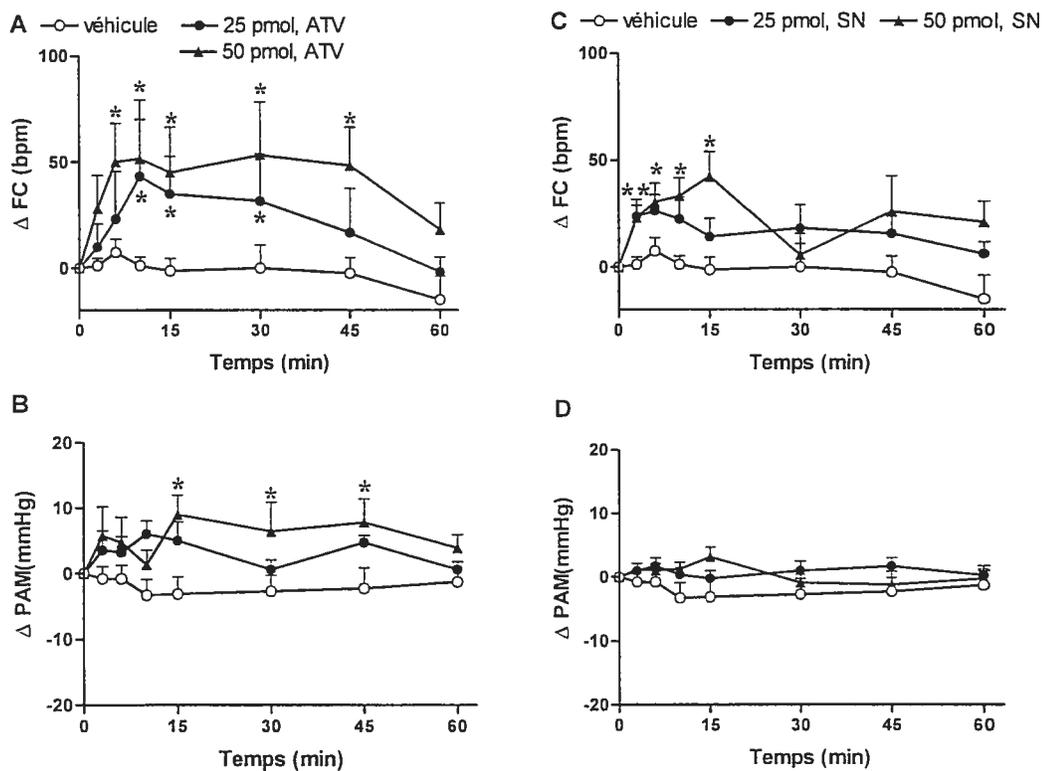


**Figure 4** Changements maximaux (A,B) et temporels (C,D) de fréquence cardiaque (FC) (A,C) et de pression artérielle moyenne (PAM) (B,D) suite à l'injection de  $[\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}(4\text{-}10)$  à 25 (n=5), 50 (n=4) et 100 (n=6) pmol dans l'aire tegmentale ventrale du rat éveillé. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'écart-type de (n) rats. Les comparaisons statistiques ont été faites à l'aide d'un ANOVA à deux voies suivi d'un test de Bonferroni (en comparaison au véhicule, \*P<0.05 représenté en A et B seulement). Les valeurs basales sont : PAM :  $98 \pm 5$  mmHg et FC :  $355 \pm 21$  bpm chez les rats qui ont reçu les agents dans l'ATV.

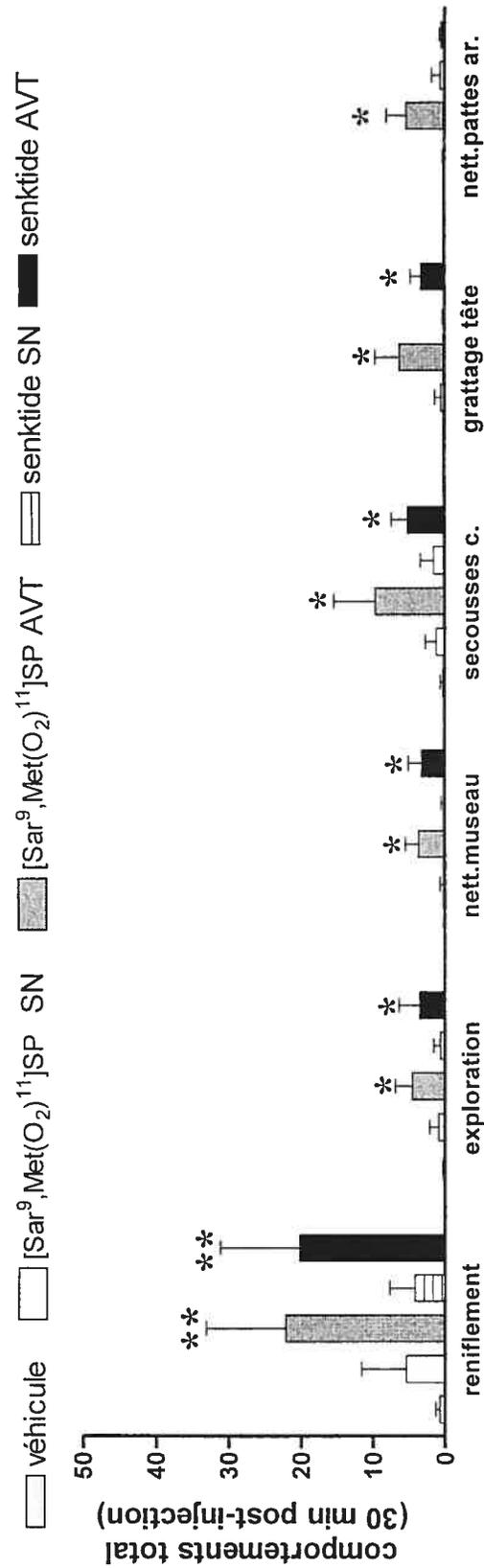


**Figure 5** Changements de fréquence cardiaque (FC) (A) et de pression artérielle moyenne (PAM) (B) suite à l'injection de  $[\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}(4\text{-}10)$  (50 pmol) dans l'aire tegmentale ventrale (ATV) ou la substance noire (SN) du rat éveillé. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'écart-type de (*n*) rats. Les comparaisons statistiques ont été faites à l'aide d'un ANOVA à deux voies suivi d'un test de Bonferroni (en comparaison au véhicule, \* $P < 0.05$ ).

## Senktide



**Figure 6** Changements de fréquence cardiaque (FC) (A,C) et de pression artérielle moyenne (PAM) (B,D) suite à l'injection de senktide (25-50 pmol, n=6) dans l'aire tegmentale ventrale (ATV) (A,B) ou la substance noire (SN) (n=18-19) (C,D) du rat éveillé. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  l'écart-type de (n) rats. Les comparaisons statistiques ont été faites à l'aide d'un ANOVA à deux voies suivi d'un test de Bonferroni (en comparaison au véhicule, \*P<0.05). Les valeurs basales sont : PAM :  $98 \pm 3$  mmHg et FC :  $355 \pm 29$  bpm chez les rats qui ont reçu les agents dans l'ATV.



**Figure 7** Histogrammes montrant les effets comportementaux mesurés suite à l'injection du véhicule (n=8), du [Sar<sup>9</sup>,Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]JSP (50 pmol) dans la substance noire (SN, n=18) ou l'aire ventrale tegmentaire (AVT, n=7) et du senktide (50 pmol) dans la SN (n=18) ou l'AVT (n=6). Les valeurs représentent la moyenne ± l'écart-type de (n) rats. \*P<0.05 et \*\*P<0.01 lorsque comparé aux valeurs du véhicule par un test de Kruskal-Wallis. Nett. Museau, nettoyage du museau ; secousses c., secousses corporelles ; nett. Pattes ar., nettoyage des pattes arrièrees.

## **CHAPITRE VI**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE**

## 6.0 Justification de l'approche expérimentale

Le rat a été choisi pour réaliser les présentes études pour plusieurs raisons : 1) La très grande majorité des études neuronatomiques et pharmacologiques concernant les tachykinines du système nerveux central ont utilisé le rat comme modèle (Unger *et al.*, 1980,1988; van den Buuse *et al.*, 1991; Culman & Unger, 1995; Culman *et al.*, 1997). Il s'agit donc d'un modèle de référence; 2) Comparativement au cobaye ou à la souris, cet animal est très résistant à la chirurgie et aux agents anesthésiques; 3) Il existe plusieurs modèles de rats hypertendus : SHR, DOCA-sel, par obstruction d'une artère rénale. Il est donc possible de poursuivre ces expériences dans d'autres modèles d'hypertension artérielle ce qui représente un avantage en recherche fondamentale; 4) Les travaux de cette thèse représentent la suite d'études antérieures dans notre laboratoire, où divers agonistes et antagonistes des tachykinines ont été injectés i.c.v. chez le rat Wistar (Prat *et al.*, 1994; Picard *et al.*, 1994, 1995; Cellier *et al.*, 1997, 1999).

Toutes les expériences de cette thèse ont été effectuées chez le rat éveillé et non immobilisé. Cette approche, contrairement à l'utilisation d'agents anesthésiques, permet d'observer une réponse physiologique ou pharmacologique sans interférence avec les baroréflexes. De plus, elle permet de mesurer l'activité comportementale, ce qui apporte des informations supplémentaires cruciales, surtout lors d'injections dans des noyaux (comme la substance noire) ayant un rôle important dans la régulation des fonctions motrices. La méthode expérimentale utilisant des canules guides permet la microinjection bilatérale sans aucune manipulation de l'animal qui demeure libre dans sa cage. Ceci évite

ainsi de provoquer un stress chez l'animal qui pourrait altérer les réponses cardiovasculaires mesurées.

Les travaux des chapitres II et III montrent des effets cardiovasculaires et comportementaux suite à des microinjection bilatérales de peptides dans la substance noire. Cette technique possède l'avantage, par opposition à l'injection i.c.v., d'attribuer des effets physiologiques spécifiques à une région ou à un noyau. En effet, l'administration d'agents dans les ventricules cérébraux latéraux provoque l'activation de plusieurs régions ayant potentiellement des effets opposés. Ceci complique l'interprétation des résultats. De plus, l'observation des coupes histologiques permet de confirmer le site d'injection.

Également à titre de contrôle pour la diffusion des agonistes, des microinjections ont été effectuées dans l'aire tegmentale ventrale (ATV) (chapitre V), une région adjacente à la substance noire. Tel que décrit dans ce chapitre, les réponses cardiovasculaires et comportementales obtenues sont significativement différentes de celles observées suite à l'injection des mêmes agonistes (NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub>) dans la substance noire. Cependant, ces travaux ne permettent pas d'exclure complètement la possibilité que les effets des agonistes injectés dans la substance noire soient attribuables à une diffusion partielle des agents dans l'ATV ou vice versa de l'ATV à la substance noire. Néanmoins, l'étude des coupes histologiques en *post-mortem* et l'injection des agonistes sur d'autres cibles à proximité des noyaux visés constituent un bon contrôle pour la distribution des agents dans le cerveau du rat.

En résumé, ce modèle expérimental permet de réduire un bon nombre d'artéfacts et contribue à une meilleure évaluation du rôle des tachykinines de la substance noire dans la régulation des fonctions cardiovasculaires et dans le maintien de l'hypertension artérielle.

### **6.1 Modulation de l'activité cardiaque par les tachykinines dans la substance noire chez le rat normotendu**

L'étude présentée au chapitre II montre, pour la première fois, que des agonistes sélectifs pour les trois récepteurs des tachykinines, injectés dans la substance noire du rat, provoquent des tachycardies sans changements de pression artérielle et de l'activité comportementale. Ces travaux suggèrent une nouvelle voie de régulation autonome de la fréquence cardiaque au niveau du mésencéphale. Puisque ces tachycardies ont été bloquées par un pré-traitement avec leurs antagonistes respectifs, on peut conclure que les trois récepteurs des tachykinines sont impliqués dans ce mécanisme de modulation cardiaque. Cette étude apporte une preuve pharmacologique de la présence controversée du récepteur NK<sub>2</sub> dans la substance noire, appuyant ainsi certaines études anatomiques (Bannon *et al.*, 1995b; Whitty *et al.*, 1995; Zerari, 1996). Contrairement aux agonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub>, les effets de l'agoniste NK<sub>2</sub> ne sont pas dose-dépendant; les tachycardies sont d'une intensité maximale à la plus faible dose testée (25 pmol). On pourrait expliquer ce phénomène par la faible densité de récepteurs NK<sub>2</sub> dans la substance noire, les récepteurs seraient alors saturés à faible dose.

Les tachycardies provoquées par l'agoniste NK<sub>1</sub> ont été bloquées par un traitement combiné avec l'aténolol et l'atropine, alors que celles provoquées par les agonistes NK<sub>2</sub> et NK<sub>3</sub> ont été bloquées complètement par l'aténolol. Ainsi, les systèmes sympatho-surrénalien et parasympathique contribuent aux effets cardiovasculaires de l'agoniste des récepteurs NK<sub>1</sub> injecté dans la substance noire. Ceci pourrait expliquer pourquoi seul cet agoniste peut faire varier la pression artérielle lorsqu'il est injecté à forte dose (nmol), c'est à dire en altérant les activités sympathique et vagale. Les mécanismes expliquant cette interaction entre la substance noire et le système nerveux autonome demeurent spéculatifs et très mal connus. Toutefois, la voie dopaminergique nigrostriée a été associée au fonctionnement des baroréflexes puisqu'une dénervation de cette projection entraîne une instabilité des baroréflexes chez le rat (Alexander *et al.*, 1986). De plus, il existe une projection de type adrénérgique de la médulla rostro-ventrolatérale à la substance noire (Nagatsu *et al.*, 1998). Quelques auteurs ont suggéré que les voies dopaminergiques du mésencéphale seraient intégrées à une longue boucle de rétroaction contrôlant l'activité des baroréflexes et de la pression artérielle (Lin & Yang, 1994; Kirouac & Ciriello, 1997). Cependant, les détails de ces mécanismes n'ont pas encore été élucidés.

Aussi, ces résultats suggèrent que les récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> peuvent activer différentes voies neuronales. Au niveau anatomique, on sait que les récepteurs NK<sub>3</sub> sont situés préférentiellement sur les corps cellulaires dopaminergiques de la zone compacte alors que les récepteurs NK<sub>1</sub> sont plutôt situés sur les corps cellulaires GABAergiques de la zone réticulée de la substance noire (Stoessl & Hill, 1990; Sivam & Krause, 1992;

Stoessl, 1994; Bannon & Whitty, 1995b; Whitty *et al.*, 1995; Shughrue *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998). En relation avec ces données, nos travaux ont montré que l'activation de ces deux récepteurs provoque différentes réponses cardiovasculaires. Ces variations pourraient s'expliquer comme suit: les effets de l'agoniste NK<sub>1</sub> sont produits par l'activation d'une voie neuronale de type GABAergique, possiblement via la boucle nigro-thalamo-corticale alors que les effets de l'agoniste NK<sub>3</sub> seraient le résultat de l'activation directe de la voie dopaminergique nigrostriée. D'autres études sont cependant nécessaires pour confirmer cette hypothèse (voir 6.4 Perspectives).

## **6.2 Rôle potentiel du récepteur NK<sub>3</sub> de la substance noire dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR**

Les résultats du chapitre III montrent une altération marquée des effets cardiovasculaires observés suite à l'injection des agonistes des récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> des tachykinines chez le SHR comparativement aux rats Wistar (chapitre II) et WKY. En effet, seules des tachycardies ont été observées suite à l'injection de ces deux agonistes, à la dose de 25 pmol, chez le rat Wistar et WKY. Chez le SHR, la même dose de l'agoniste NK<sub>1</sub> a provoqué à la fois une augmentation de pression artérielle et une tachycardie. Ainsi, les effets cardiovasculaires de l'agoniste NK<sub>1</sub> sont amplifiés chez le SHR puisqu'une dose de 1 nmol fut nécessaire pour altérer significativement la pression artérielle chez le rat Wistar. L'effet cardiovasculaire est aussi amplifié suite à l'injection i.c.v. de substance P chez le SHR (Unger *et al.*, 1980). À l'instar des rats Wistar, ces effets pourraient impliquer à la fois l'activation du système sympatho-surrénalien et l'inhibition du système

nerveux parasympathique, expliquant pourquoi l'agoniste des récepteurs NK<sub>1</sub> s'avère le seul à modifier la pression artérielle de base lorsqu'il est injecté dans la substance noire du rat normotendu (aux fortes doses, nmol) et hypertendu (aux faibles doses, pmol).

Dans le chapitre II de cette thèse, il a été déterminé que les agonistes injectés dans la substance noire ne sont pas assujettis à une désensibilisation chez le rat normotendu. Ainsi, les effets cardiovasculaires des agonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> ont été jugés dose-dépendants. Cependant, une tachyphylaxie a été observée chez le SHR suite à l'injection des mêmes agents dans la substance noire. Lors d'études préliminaires, nous avons observé que les antagonistes sélectifs utilisés pouvaient bloquer les effets cardiovasculaires des agonistes de façon non-sélective et non-réversible chez le SHR. Par exemple, l'antagoniste des récepteurs NK<sub>1</sub> (RP 67580) a bloqué les effets cardiovasculaires des agonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>3</sub> pendant plus de 24h. Aussi, les effets cardiovasculaires des agonistes à la dose de 25 pmol ont une amplitude supérieure à ceux de la dose de 100 pmol, injectée 24h plus tard. Lorsque le R-820 (antagoniste des récepteurs NK<sub>3</sub>) a été administré dans la substance noire des SHR pendant trois jours consécutifs, la diminution de pression artérielle n'a pas été reproduite 24h et 48h plus tard. Ce phénomène ne peut pas être expliqué par nos connaissances actuelles. Par conséquent, pour les séries d'expériences subséquentes, nous avons injecté qu'une dose d'un seul antagoniste par rat (SHR) afin d'éviter toute forme de tachyphylaxie qui risque de sous-estimer les effets anti-hypertenseurs.

D'autre part, l'agoniste NK<sub>3</sub> n'a pas modifié significativement la pression artérielle et la fréquence cardiaque chez le SHR. Cette absence d'effet cardiovasculaire en particulier l'augmentation du rythme cardiaque tel qu'observé chez le rat Wistar nous a fort intrigué. Dans le but d'en expliquer la cause, nous avons mesuré la densité et l'affinité des récepteurs NK<sub>3</sub> chez le SHR en autoradiographie avec le ligand [<sup>125</sup>I]-HPP-senktide. Les résultats n'ont montré aucune différence significative dans l'affinité et la densité des récepteurs NK<sub>3</sub> entre les SHR et WKY, et ce pour quatre régions centrales : la substance noire, l'aire tegmentale ventrale, l'hippocampe et l'amygdale. Il est donc suggéré que l'absence d'effet cardiovasculaire suite à l'injection intra-nigrale du senktide chez le SHR n'est pas due à un changement d'affinité du récepteur pour son agoniste ou à une diminution de sa densité dans la substance noire.

L'observation des effets cardiovasculaires suite à l'injection des antagonistes peut nous fournir des informations additionnelles sur ce phénomène. Les antagonistes des trois récepteurs ne provoquent aucun effet cardiovasculaire chez le rat normotendu Wistar et WKY. Il est ainsi suggéré que les tachykinines endogènes ne sont pas libérées de façon tonique chez ces animaux. Ceci s'intègre très bien avec le concept généralement accepté que les tachykinines sont des neuromodulateurs libérés dans des conditions de stress (Culman & Unger, 1995). Or, l'injection intra-nigrale de l'antagoniste des récepteurs NK<sub>3</sub>, le R-820, réduit significativement la pression artérielle chez le SHR bien que les antagonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> soient sans effets. On peut ainsi suggérer que chez le SHR, les tachykinines endogènes de la substance noire sont toniquement libérées pour maintenir

une pression artérielle élevée. L'occupation des récepteurs NK<sub>3</sub> par le ligand endogène activerait ce récepteur de façon optimale et pourrait expliquer pourquoi le senktide n'a provoqué aucun effet cardiovasculaire.

Cet effet anti-hypertenseur du R-820 est en accord avec les rares études sur le rôle potentiel de la substance noire dans la régulation des fonctions cardiovasculaires et le maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR. En effet, une atténuation de l'hypertension artérielle a été rapportée chez de jeunes SHR suite à une destruction de la voie dopaminergique nigrostriée par injection locale de 6-hydroxydopamine (van den Buuse *et al.*, 1991; Linthorst *et al.*, 1994). De plus, une dysfonction de cette voie provoque non seulement la maladie de Parkinson mais également, pour certains patients, une hypotension orthostatique et post-prandiale (Barbeau *et al.*, 1969; Micieli *et al.*, 1987). Or, tel que mentionné dans l'Introduction (chapitre I), cette voie nigrostriée est modulée par les tachykinines et directement par les récepteurs NK<sub>3</sub> situés dans la zone compacte de la substance noire (Stoessl & Hill, 1990; Nalivaiko *et al.*, 1997; Marco *et al.*, 1998). Il est très intéressant de noter que nous avons obtenu, avec le R-820, le même effet anti-hypertenseur que celui rapporté suite à la lésion nigrostriée. On peut donc émettre l'hypothèse que les récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines activent de façon tonique la voie dopaminergique nigrostriée chez le SHR pour maintenir une pression artérielle élevée. Ces résultats représentent une avenue intéressante dans l'étude des mécanismes supraspinaux responsables de l'hypertension artérielle.

### 6.3 Effet anti-hypertenseur des antagonistes sélectifs des récepteurs NK<sub>3</sub> chez le SHR

Suite aux résultats obtenus avec le R-820 injecté dans la substance noire, nous avons voulu savoir si cet effet anti-hypertenseur est unique à ce noyau. Le R-820 a donc été injecté, à la même dose, dans les ventricules latéraux chez le SHR. Ce protocole, qui n'était à l'origine qu'un contrôle, nous a causé un grand émoi. En effet, 24 heures suivant l'injection i.c.v. du R-820, les SHR étaient devenus normotendus. Plus tard, nous avons testé un nouvel antagoniste sélectif des récepteurs NK<sub>3</sub> : le SB 222200. Ce dernier, de nature non peptidique, n'est pas relié de par sa structure au R-820, un semi-peptide (analogue formé d'acides aminés naturels et non naturels). L'effet anti-hypertenseur s'est reproduit avec le SB 222200, injecté i.c.v. à la même dose que le R-820 chez le SHR, mais avec une dynamique temporelle différente: l'hypertension est complètement corrigée 8h après l'injection du SB 222200 puis l'animal redevient graduellement hypertendu 24 et 48 heures post-injection. Cette différence est vraisemblablement due à une meilleure diffusion de l'antagoniste non peptidique qui est plus lipophile que le R-820. Les deux molécules (R-820, SB 222200) n'ont pas altéré de façon significative la pression artérielle des SHR après leur injection i.v. à la même dose. Il est donc suggéré que cet effet anti-hypertenseur est d'origine centrale. D'autre part, il semblerait que l'effet anti-hypertenseur du SB 222200 soit relié à un cycle circadien puisque la cinétique de l'effet change en relation avec l'heure d'administration de l'antagoniste. En effet, le pic de l'effet anti-hypertenseur est obtenu respectivement à 3h et 8h post-injection lorsque le SB 222200 est injecté à 7h AM et 1h PM. Cette observation favorise l'hypothèse d'un

mécanisme anti-hypertenseur d'origine hormonal plutôt que neuronal puisque l'effet est de très longue durée (plusieurs heures), permettant ainsi une synthèse et libération systémique d'hormone(s), lesquelles sont reconnues pour présenter une cinétique circadienne.

Pour exclure l'implication des récepteurs NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub>, les antagonistes des récepteurs NK<sub>1</sub> (RP 67580) et NK<sub>2</sub> (SR 48968) ont été injectés par voie i.c.v., à la même dose, à des rats SHR. Toutefois, ces traitements n'ont pas altéré la pression artérielle chez le SHR.

Par la suite, différents traitements ont été administrés pour vérifier l'implication des systèmes rénal, vasopressinergique et sympatho-surrénalien dans l'effet anti-hypertenseur du SB 222200. La première hypothèse a été formulée à partir des évidences suivantes: 1) les récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines et la neurokinine B sont présents dans les noyaux paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus (Minamino *et al.*, 1984; Bergstrom *et al.*, 1987; Saffroy *et al.*, 1988; Nagashima *et al.*, 1989b; Stoessl & Hill, 1990; Dam *et al.*, 1990; Eguchi *et al.*, 1996). Ces deux noyaux sont responsables, entre autres, de la synthèse de la vasopressine (Vander, 1995); 2) l'activation (par injection i.c.v. ou intra-hypothalamique d'agonistes sélectifs) du récepteur NK<sub>3</sub> provoque une augmentation des taux plasmatiques de vasopressine, une augmentation de pression artérielle, un effet anti-diurétique et anti-natriurétique. Ces effets sont bloqués par un traitement avec les antagonistes V<sub>1</sub> (augmentation de la pression artérielle) et V<sub>2</sub> (anti-diurétique, anti-natriurétique) de la vasopressine (Nagashima *et al.*, 1989b; Takano *et al.*, 1990,1991; Nakayama *et al.*, 1992; Eguchi *et al.*, 1996; Yuan & Couture, 1997).

Notre hypothèse chez le SHR supposait que les tachykinines endogènes activent de façon tonique les récepteurs NK<sub>3</sub> hypothalamiques qui, à leur tour, stimulent la sécrétion tonique de la vasopressine. Ce mécanisme contribuerait au maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR puisque la vasopressine est reconnue comme une substance hautement vasoconstrictrice et anti-diurétique. Un blocage des récepteurs NK<sub>3</sub> aurait dans ce cas comme conséquence de diminuer la synthèse et la libération plasmatique de vasopressine, provoquant un effet vasodilatateur et diurétique conduisant à une diminution significative de la pression artérielle. Afin de vérifier cette hypothèse, un groupe de SHR bi-néphrectomisés ont reçu le SB 222200 dans les ventricules latéraux cérébraux. De plus, chez un autre groupe de SHR, nous avons recueilli des échantillons de sang pour permettre la mesure des taux plasmatiques de vasopressine au pic de la réponse anti-hypertensive du SB 222200 et trois jours après son injection, lorsque la pression artérielle est revenue à son niveau basal. Chez le SHR bi-néphrectomisé, l'effet anti-hypertenseur a été reproduit suite à une injection tôt le matin (7h AM) et tôt en après-midi (1h PM). Le système rénal n'est donc pas impliqué dans cet effet. De plus, les taux plasmatiques de vasopressine n'ont pas été altérés significativement par l'injection i.c.v. du SB 222200. L'hypothèse d'un mécanisme impliquant la vasopressine est donc peu probable.

Notre deuxième hypothèse reposait sur l'implication du système sympatho-surrénalien. Tel que mentionné dans l'Introduction générale, l'hypertension artérielle est fortement associée à une hyperactivité du système nerveux sympathique chez l'humain ainsi que dans plusieurs modèles d'hypertension expérimentale (Julius, 1988; Laflamme &

de Champlain, 1998; de Champlain, 1998; Grassi *et al.*, 1998). Au chapitre II de cet ouvrage, nous avons vu que les tachycardies observées suite à l'injection intra-nigrale du senktide sont bloquées par un traitement i.v. avec l'aténolol, un antagoniste  $\beta_1$ -adrénergique. Il a donc été suggéré que les effets cardiovasculaires provoqués par l'activation de ce récepteur dans la substance noire sont dus à une augmentation de l'activité du système nerveux sympatho-surrénalien. Le même mécanisme a été proposé par d'autres chercheurs suite à l'injection i.c.v. du senktide chez le cobaye (Roccon *et al.*, 1996). Le long décours temporel du SB 222200 favorise un mécanisme surrénalien plutôt que neuronal. Nous avons donc anticipé une diminution des taux plasmatiques d'épinéphrine en présence de l'antagoniste SB 222200. Toutefois, les taux plasmatiques des trois catécholamines (épinéphrine, norépinéphrine et dopamine) n'ont pas été altérés de façon significative par l'injection du SB 222200. Cependant, ces résultats n'excluent pas hors de tout doute la participation des fibres sympathiques dans le mécanisme anti-hypertenseur. En effet, la mesure des taux plasmatiques de norépinéphrine ne fournit pas le meilleur indice de l'activité sympathique puisque ses taux sanguins ne représentent que 1-2% des taux réels libérés par les terminaisons nerveuses à cause du mécanisme de recapture. Aussi, les diminutions de libération de norépinéphrine sont probablement plus difficiles à détecter que les augmentations. Ainsi, le meilleur moyen d'évaluer la participation du système nerveux sympathique dans cette réponse consisterait sans doute à mesurer directement par méthode électrophysiologique l'activité des nerfs sympathiques. Cette approche peut toutefois s'avérer difficile chez le rat non anesthésié.

## 6.4 Perspectives

Le prochain défi de ce projet de recherche consistera à préciser le mécanisme d'action périphérique de l'effet anti-hypertenseur du SB 222200 et du R-820. Suite à de nombreuses discussions, séminaires et lectures, une nouvelle hypothèse a été formulée; elle implique l'activité de l'ocytocine. Cette hormone, synthétisée par les noyaux paraventriculaire de l'hypothalamus, est libérée de façon abondante durant l'allaitement et la parturition (Petersson *et al.*, 1997). Ce phénomène est accompagné d'une diminution de pression artérielle chez la rate normotendue (Sprague-Dawley) et spontanément hypertendue (SHR) (Azar, 1991). Chez le SHR mâle, une injection sous-cutanée (s.c.) et i.c.v. d'ocytocine provoque une diminution de la pression artérielle (Petersson *et al.*, 1996, 1997). L'observation la plus intéressante concerne la dynamique temporelle de cet effet qui est semblable à celle observée avec le R-820. Ainsi, le pic de la réponse anti-hypertensive est obtenu 24 heures suite à l'injection s.c. de l'ocytocine et la pression artérielle retourne à ses niveaux de base 3 jours post-injection (Petersson *et al.*, 1997). De plus, à l'instar du R-820 et du SB 222200, l'ocytocine n'a pas altéré la fréquence cardiaque de façon significative (Petersson *et al.*, 1997). Tel que mentionné précédemment, les récepteurs NK<sub>3</sub> et la neurokinine B ont été identifiés dans les noyaux paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus (Minamino *et al.*, 1984; Bergstrom *et al.*, 1987; Saffroy *et al.*, 1988; Nagashima *et al.*, 1989b; Stoessl & Hill, 1990; Dam *et al.*, 1990; Merchenthaler *et al.*, 1992). De plus, les taux plasmatiques d'ocytocine augmentent suite à l'injection i.c.v. de substance P chez le rat normotendu (Unger *et al.*, 1988).

Plusieurs études effectuées sur des tissus hypothalamiques ont montré une diminution significative des niveaux d'ocytocine chez le SHR comparativement au témoin WKY (Morris *et al.*, 1981, 1983). Plus précisément, cette diminution a été observée dans les noyaux paraventriculaire et supraoptique (Morris *et al.*, 1985; Bennett *et al.*, 1989) et coïncide avec la diminution de l'ARNm pour l'ocytocine (van Tol *et al.*, 1988). Les auteurs suggèrent qu'une diminution de la synthèse de l'ocytocine pourrait représenter un facteur important dans le développement de l'hypertension puisque les taux d'ocytocine diminuent avec le développement de l'anomalie. Ainsi, on observe une diminution de 35% d'ocytocine chez le SHR de 4 semaines et de 40% chez le SHR de 10 semaines (van Tol *et al.*, 1988).

Bref, il demeure possible que les tachykinines endogènes contrôlent la synthèse et la libération d'ocytocine via le récepteur NK<sub>3</sub> chez le SHR. De plus, il est connu que l'ocytocine augmente la libération cardiaque du peptide natriurétique des oreillettes (ANP), un agent vasodilatateur et hypotenseur (Favaretto *et al.*, 1997; Gutkowska *et al.*, 1997, 2000; Petersson, 2002). Cependant, il reste beaucoup de travail à compléter pour confirmer cette hypothèse. Par exemple, il serait très intéressant de mesurer les niveaux plasmatiques d'ocytocine et de l'ANP et de bloquer leurs récepteurs avec des inhibiteurs sélectifs chez le SHR ayant reçu le SB 222200.

D'autre part, un autre défi majeur pour la suite de ce projet consiste à découvrir le mécanisme local impliqué dans l'effet anti-hypertenseur du R-820 et du SB 222200. L'avenue la plus intéressante concerne l'implication des voies cholinergiques centrales. La relation fonctionnelle entre ces deux transmetteurs, où les tachykinines centrales libèrent l'acétylcholine, a été décrite dans l'Introduction. Il est aussi mentionné que les voies cholinergiques centrales seraient responsables de l'effet anti-hypertenseur de la clonidine. Bien que non mesurées, nous avons observé d'autres manifestations anti-cholinergiques suite à l'injection i.c.v. du SB 222200 chez le SHR. Ces animaux, normalement nerveux et agités, sont devenus très calmes suite à l'injection de l'antagoniste NK<sub>3</sub>. De plus, un stimulus extérieur, tel un bruit soudain, ne parvenait pas à les sortir de leur sédation. Ces effets n'étaient pas reliés à un état pathologique et étaient réversibles. Nous avons également remarqué une absence de défécation chez les SHR durant le traitement avec le SB 222200. Ces effets sont étrangement similaires aux effets secondaires répertoriés suite à un traitement à la clonidine (sédation, dépression, constipation). Il serait donc très intéressant, à mon avis, de tester l'effet anti-hypertenseur du SB 222200 chez des SHR ayant reçu un pré-traitement i.c.v. avec des agonistes cholinergiques.

Une autre avenue concerne les voies dopaminergiques centrales qui sont également modulées par les tachykinines. L'étude de cette thèse s'est dirigée vers l'évaluation des tachykinines de la substance noire dans la régulation centrale des fonctions cardiovasculaires. Bien que l'effet anti-hypertenseur observé suite à l'injection intranigrale du R-820 chez le SHR n'est que partiel, je crois qu'il serait important de continuer le projet pour confirmer l'implication de la voie nigrostriée dans ce phénomène. À mon avis, il s'agit d'un mécanisme d'action original et prometteur. En premier lieu, il serait important d'établir une courbe dose-réponse des effets cardiovasculaires et comportementaux obtenus après l'injection d'agonistes sélectifs aux récepteurs D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> de la dopamine dans le striatum des rats normotendus. Par la suite, l'administration préalable des antagonistes permettrait de déterminer la dose d'antagonistes sélectifs pour bloquer les récepteurs D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> de la dopamine le striatum. Éventuellement, l'hypothèse de travail serait d'évaluer l'influence des récepteurs D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> de la dopamine du striatum dans l'effet anti-hypertenseur d'antagonistes NK<sub>3</sub> injectés dans la substance noire chez le SHR. Ainsi, des antagonistes sélectifs aux récepteurs dopaminergiques pourraient être injectés dans le striatum, seuls puis en co-injection intra-nigrale avec des antagonistes des récepteurs NK<sub>3</sub> des tachykinines chez le SHR.

L'étude de liaison en autoradiographie pourrait également être étendue à d'autres régions cérébrales que le mésencéphale. On pourrait, par exemple, retrouver une densité de récepteurs NK<sub>3</sub> différente dans l'hypothalamus des SHR comparativement aux WKY. À cet effet, il existe d'autres voies dopaminergiques d'importance qui pourraient avoir un rôle dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le SHR. Il serait donc important de terminer le projet du chapitre V sur l'aire tegmentale ventrale qui représente l'origine d'une autre voie dopaminergique majeure, chez le Wistar et le SHR. On a rapporté une diminution des taux de dopamine dans l'axe hypothalamo-hypophysaire chez le SHR comparativement à son témoin WKY (Morris *et al.*, 1981). Ces voies dopaminergiques (A11-A15) forment de nombreux liens intra-hypothalamiques (éminence médiane, portions dorsales-postérieures et dorsales-antérieures de l'hypothalamus) et elles projettent jusqu'à la moelle épinière (A11) (Cooper, 1996). Il serait donc intéressant de tester le SB 222200 sur des noyaux hypothalamiques, puis d'évaluer la participation des voies dopaminergiques avec des antagonistes D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub>.

Enfin, les études exposées dans le cadre de cette thèse ont été effectuées avec le rat SHR. Ce modèle d'hypertension est d'origine génétique. Il serait intéressant de vérifier l'effet anti-hypertenseur du SB 222200, injecté dans le ventricule cérébral latéral, sur d'autres modèles d'hypertension artérielle, incluant le rat DOCA-sel et le modèle d'hypertension par obstruction de l'artère rénale. Ces modèles d'hypertension dont le

mécanisme est en périphérie permettraient de valider davantage le rôle du récepteur NK<sub>3</sub> comme cible thérapeutique dans le traitement de l'hypertension artérielle.

### **6.5 Contribution à l'avancement de la recherche sur le rôle pathophysiologique des tachykinines**

Cette étude met en évidence de nouveaux mécanismes centraux dans la modulation autonome du rythme cardiaque et dans le maintien d'une pression artérielle élevée chez le SHR. Elle permettra sans doute de relancer les études sur le rôle physiologique incertain de la neurokinine B et de son récepteur NK<sub>3</sub>, lequel peut représenter une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'hypertension artérielle. Ces données peuvent avoir un impact clinique important dans les conditions de pré-éclampsie chez la femme où l'on a rapporté des taux plasmatiques élevés de neurokinine B (Page *et al.*, 2000).

## RÉFÉRENCES

## Bibliographie

Abdel-Latif, A.A., Howe, P.H. & Akhtar, R.A. *Polyphosphoinositides, phosphoproteins, and receptor function in rabbit iris smooth muscles*. Prog Brain Res, **69**, 51-63, 1986.

Advenier, C., Rouissi, N., Nguyen, Q.T., Emonds-Alt, X., Breliere, J.C., Neliat, G., Naline, E. & Regoli, D. (1992). *Neurokinin A (NK2) receptor revisited with SR 48968, a potent non-peptide antagonist*. Biochem Biophys Res Commun, **184**, 1418-24, 1992.

Alexander, N., Hirata, Y. & Nagatsu, T. *Reduced tyrosine hydroxylase activity in nigrostriatal system of sinoaortic-denervated rats*. Brain Res, **299**, 380-2, 1984.

Alexander, N., Ross-Cisneros, F., Kogosove, E., Decuir, M., Haun, C.K. & Nagatsu, T. *Nigrostriatal and cardiovascular systems interaction*. In *Brain and blood pressure control*. ed Nakamura, K. pp. pp.61-66. Amsterdam: Excerpta Medica, 1986.

Alexander, N., Nakahara, D., Ozaki, N., Kaneda, N., Sasaoka, T., Iwata, N. & Nagatsu, T. *Striatal dopamine release and metabolism in sinoaortic-denervated rats by in vivo microdialysis*. Am J Physiol, **254**, R396-9, 1988.

Alonso, R., Fournier, M., Carayon, P., Petitpretre, G., Le Fur, G. & Soubrie, P. *Evidence for modulation of dopamine-neuronal function by tachykinin NK3 receptor stimulation in gerbil mesencephalic cell cultures*. Eur J Neurosci, **8**, 801-8, 1996.

**Amin, A.H., Crawford, B.B. & Gaddum, J.H.** *The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog.* J. Physiol., **126**, 596-618, 1954.

**Anden, N.E. & Stock, G.** *Inhibitory effect of gammahydroxybutyric acid and gammaaminobutyric acid on the dopamine cells in the substantia nigra.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, **279**, 89-92, 1973.

**Anderson, J.J., Randall, S. & Chase, T.N.** *The neurokinin1 receptor antagonist CP-99,994 reduces catalepsy produced by the dopamine D2 receptor antagonist raclopride: correlation with extracellular acetylcholine levels in striatum.* J Pharmacol Exp Ther, **274**, 928-36, 1995.

**Angyan, L.** *Role of the substantia nigra in the behavioural-cardiovascular integration in the cat.* Acta Physiol Hung, **74**, 175-87, 1989.

**Arai, H. & Emson, P.C.** *Regional distribution of neuropeptide K and other tachykinins (neurokinin A, neurokinin B and substance P) in rat central nervous system.* Brain Res, **399**, 240-9, 1986.

**Arenas, E., Alberch, J., Perez-Navarro, E., Solsona, C. & Marsal, J.** *Neurokinin receptors differentially mediate endogenous acetylcholine release evoked by tachykinins in the neostriatum.* J Neurosci, **11**, 2332-8, 1991.

**Ariumi, H., Saito, R., Nago, S., Hyakusoku, M., Takano, Y. & Kamiya, H.** *The role of tachykinin NK-1 receptors in the area postrema of ferrets in emesis.* Neurosci Lett, **286**, 123-126, 2000.

**Aronin, N., Difiglia, M. & Leeman, S.E.** *Substance P.* In Brain Peptides. ed D.T. Krieger, M.J.B.J.B.M. pp. 1032 pp. New York: Wiley, 1983.

**Azar, S.H.S.-P., S.** *Continuous blood pressure monitoring by radio-telemetry during pregnancy and lactation in spontaneously hypertensive and normotensive rats.* In *Clinical and Experimental Hypertension*. ed S.P.A., M.E. pp. 119-122. Italy, 1991.

**Bandler, R. & Shipley, M.T.** *Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression?* *Trends Neurosci*, **17**, 379-89, 1994.

**Bannon, M.J. & Roth, R.H.** *Pharmacology of mesocortical dopamine neurons.* *Pharmacol Rev*, **35**, 53-68, 1983.

**Bannon, M.J., Deutch, A.Y., Tam, S.Y., Zamir, N., Eskay, R.L., Lee, J.M., Maggio, J.E. & Roth, R.H.** *Mild footshock stress dissociates substance P from substance K and dynorphin from Met- and Leu-enkephalin.* *Brain Res*, **381**, 393-6, 1986.

**Bannon, M.J., Elliott, P.J. & Bunney, E.B.** *Striatal tachykinin biosynthesis: regulation of mRNA and peptide levels by dopamine agonists and antagonists.* *Brain Res*, **427**, 31-7, 1987.

**Bannon, M.J., Haverstick, D.M., Shibata, K. & Poosch, M.S.** *Preprotachykinin gene expression in the forebrain: regulation by dopamine.* *Ann N Y Acad Sci*, **632**, 31-7, 1991.

**Bannon, M.J., Poosch, M.S., Haverstick, D.M., Mandal, A., Xue, I.C., Shibata, K. & Dragovic, L.J.** *Preprotachykinin gene expression in the human basal ganglia: characterization of mRNAs and pre-mRNAs produced by alternate RNA splicing.* *Brain Res Mol Brain Res*, **12**, 225-31, 1992.

- Bannon, M.J. & Whitty, C.J.** *Neurokinin receptor gene expression in substantia nigra: localization, regulation, and potential physiological significance.* Can J Physiol Pharmacol, **73**, 866-70, 1995a.
- Bannon, M.J., Brownschidle, L.A., Tian, Y., Whitty, C.J., Poesch, M.S., D'sa, C. & Moody, C.A.** *Neurokinin-3 receptors modulate dopamine cell function and alter the effects of 6-hydroxydopamine.* Brain Res, **695**, 19-24, 1995b.
- Barbeau, A., Gillo-Joffroy, L., Boucher, R., Nowaczynski, W. & Genest, J.** *Renin-aldosterone system in Parkinson's disease.* Science, **165**, 291-2, 1969.
- Bartho, L. & Holzer, P.** *Search for a physiological role of substance P in gastrointestinal motility.* Neuroscience, **16**, 1-32, 1985.
- Baruch, P., Artaud, F., Godeheu, G., Barbeito, L., Glowinski, J. & Cheramy, A.** *Substance P and neurokinin A regulate by different mechanisms dopamine release from dendrites and nerve terminals of the nigrostriatal dopaminergic neurons.* Neuroscience, **25**, 889-98, 1988.
- Batten, T.F., Lo, V.K., Maqbool, A. & McWilliam, P.N.** *Distribution of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the medulla oblongata of the cat, in relation to choline acetyltransferase-immunoreactive motoneurons and substance P-immunoreactive fibres.* J Chem Neuroanat, **2**, 163-76, 1989.
- Baude, A., Lanoir, J., Vernier, P. & Puizillout, J.J.** *Substance P-immunoreactivity in the dorsal medial region of the medulla in the cat: effects of nodosectomy.* J Chem Neuroanat, **2**, 67-81, 1989.

**Bauman, N. M., Wang, D., Luschei, E. S. & Talman, W. T.** *Effect of substance P injection into the nucleus tractus solitarius of rats on cricothyroid and thyroarytenoid motor activity and cardiovascular and respiratory systems.* Ann Otol Rhinol Laryngol, **111**, 875-883, 2002.

**Beal, M.F. & Mazurek, M.F.** *Substance P-like immunoreactivity is reduced in Alzheimer's disease cerebral cortex.* Neurology, **37**, 1205-9, 1987.

**Beaujouan, J.C., Torrens, Y., Herbet, A., Daguët, M.C., Glowinski, J. & Prochiantz, A.** *Specific binding of an immunoreactive and biologically active <sup>125</sup>I-labeled substance P derivative to mouse mesencephalic cells in primary culture.* Mol. Pharmacol., **22**, 48-55, 1982.

**Beaujouan, J.C., Torrens, Y., Viger, A. & Glowinski, J.** *A new type of tachykinin binding site in the rat brain characterized by specific binding of a labeled eledoisin derivative.* Mol Pharmacol, **26**, 248-54, 1984.

**Benarroch, E.E.** *The central autonomic network: functional organization, dysfunction, and perspective.* Mayo Clin Proc, **68**, 988-1001, 1993.

**Bennett, B.A., Clodfelter, J., Sundberg, D.K. & Morris, M.** *Cultured hypothalamic explants from spontaneously hypertensive rats have decreased vasopressin and oxytocin content and release.* Am J Hypertens, **2**, 46-51, 1989.

**Bensaid, M., Faucheux, B.A., Hirsch, E., Agid, Y., Soubrie, P. & Oury-Donat, F.** *Expression of tachykinin NK2 receptor mRNA in human brain.* Neurosci Lett, **303**, 25-8, 2001.

- Bergstrom, L., Sakurada, T. & Terenius, L.** *Substance P levels in various regions of the rat central nervous system after acute and chronic morphine treatment.* Life Sci, **35**, 2375-82, 1984.
- Bergstrom, L., Torrens, Y., Saffroy, M., Beaujouan, J.C., Lavielle, S., Chassaing, G., Morgat, J.L., Glowinski, J. & Marquet, A.** *[3H]neurokinin B and 125I-Bolton Hunter eledoisin label identical tachykinin binding sites in the rat brain.* J Neurochem, **48**, 125-33, 1987.
- Berridge, M.J. & Irvine, R.F.** *Inositol phosphates and cell signalling.* Nature, **341**, 197-205, 1989.
- Bjorklund, A. & Lindvall, O.** *Dopamine containing-systems in the CNS.* In Handbook of Chemical Neuroanatomy. ed Hokfelt, A.B.T. pp. p.55. Amsterdam: Elsevier, 1984.
- Blanchet, F., Gauchy, C., Perez, S., Soubrie, P., Glowinski, J. & Kemel, M.L.** *Distinct modifications by neurokinin1 (SR140333) and neurokinin2 (SR48968) tachykinin receptor antagonists of the N-methyl-D-aspartate-evoked release of acetylcholine in striosomes and matrix of the rat striatum.* Neuroscience, **85**, 1025-36, 1998.
- Boutra, C., Bunce, K., Dale, T., Gardner, C., Jordan, C., Twissell, D. & Ward, P.** *Anti-emetic profile of a non-peptide neurokinin NK1 receptor antagonist, CP-99,994, in ferrets.* Eur J Pharmacol, **249**, R3-4, 1993.
- Bouras, C., Vallet, P.G., Hof, P.R., Charnay, Y., Golaz, J. & Constantinidis, J.** *Substance P immunoreactivity in Alzheimer disease: a study in cases presenting*

*symmetric or asymmetric cortical atrophy*. Alzheimer Dis Assoc Disord, **4**, 24-34, 1990.

**Brent, P.J., Johnston, P.A. & Chahl, L.A.** *Plasma catecholamine concentrations during morphine withdrawal in conscious guinea-pigs*. Clin Exp Pharmacol Physiol, **14**, 623-31, 1987.

**Brezenoff, H.E. & Caputi, A.P.** *Intracerebroventricular injection of hemicholinium-3 lowers blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats but not in normotensive rats*. Life Sci, **26**, 1037-45, 1980.

**Brownstein, M.J., Mroz, E.A., Kizer, J.S., Palkovits, M. & Leeman, S.E.** *Regional distribution of substance P in the brain of the rat*. Brain Res, **116**, 299-305, 1976.

**Brownstein, M.J., Mroz, E.A., Tappaz, M.L. & Leeman, S.E.** *On the origin of substance P and glutamic acid decarboxylase (GAD) in the substantia nigra*. Brain Res, **135**, 315-23, 1977.

**Buccafusco, J.J. & Brezenoff, H.E.** *Pharmacological study of a cholinergic mechanism within the rat posterior hypothalamic nucleus which mediates a hypertensive response*. Brain Res, **165**, 295-310, 1979.

**Buccafusco, J.J., Finberg, J.P. & Spector, S.** *Mechanism of the antihypertensive action of clonidine on the pressor response to physostigmine*. J Pharmacol Exp Ther, **212**, 58-63, 1980a.

**Buccafusco, J.J. & Spector, S.** *Role of central cholinergic neurons in experimental hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol, **2**, 347-55, 1980b.

- Buccafusco, J.J. & Shuster, L.C.** *Effect of intrathecal pretreatment with the neurokinin receptor antagonist CP-99994 on the expression of naloxone-precipitated morphine withdrawal symptoms.* Brain Res Bull, **43**, 321-6, 1997.
- Buck, S.H., Helke, C.J., Burcher, E., Shults, C.W. & O'Donohue, T.L.** *Pharmacologic characterization and autoradiographic distribution of binding sites for iodinated tachykinins in the rat central nervous system.* Peptides, **7**, 1109-20, 1986.
- Buell, G., Schulz, M.F., Arkininstall, S.J., Maury, K., Missotten, M., Adami, N., Talabot, F. & Kawashima, E.** *Molecular characterisation, expression and localisation of human neurokinin-3 receptor.* FEBS Lett, **299**, 90-5, 1992.
- Butcher, J.W., De Felipe, C., Smith, A.J., Hunt, S.P. & Paton, J.F.** *Comparison of cardiorespiratory reflexes in NK1 receptor knockout, heterozygous and wild-type mice in vivo.* J Auton Nerv Syst, **69**, 89-95, 1988.
- Caeser, M., Seabrook, G.R. & Kemp, J.A.** *Block of voltage-dependent sodium currents by the substance P receptor antagonist (+/-)-CP-96,345 in neurones cultured from rat cortex.* Br J Pharmacol, **109**, 918-24, 1993.
- Calaresu, F.R. & Mogenson, G.J.** *Cardiovascular responses to electrical stimulation of the septum in the rat.* Am J Physiol, **223**, 777-82, 1972.
- Cantalamesa, F., De Caro, G., Massi, M. & Perfumi, M.** *Possible influence of tachykinins on body fluid homeostasis in the rat.* J Physiol (Paris), **79**, 524-30, 1984.
- Capobianco, D.J., Cheshire, W.P. & Campbell, J.K.** *An overview of the diagnosis and pharmacological treatment of migraine.* Mayo Clin. Proc., **71**, 1055-1066, 1996.

- Carpenter, D.O., Briggs, D.B. & Strominger, N.** *Peptide-induced emesis in dogs.* Behav Brain Res, **11**, 277-81, 1984.
- Carter, D.A. & Lightman, S.L.** *Substance P microinjections into the nucleus tractus solitarius elicit a pressor response in capsaicin-treated rats.* Neurosci Lett, **43**, 253-7, 1983.
- Cascieri, M.A., Huang, R.-R.C., Fong, T.M., Cheung, A.H., Sadowski, S., Ber, E. & Strader, C.D.** *Determination of the amino acid residues in substance P conferring selectivity and specificity for the rat neurokinin receptors.* Mol. Pharmacol., **41**, 1096-1099, 1992.
- Cellier, E., Barbot, L., Regoli, D. & Couture, R.** *Cardiovascular and behavioural effects of intracerebroventricularly administered tachykinin NK3 receptor antagonists in the conscious rat.* Br J Pharmacol, **122**, 643-54, 1997.
- Cellier, E. & Couture, R.** *Mechanism of cardiovascular and behavioural responses to central NK-3 receptor activation in conscious rat.* In Tachykinins in Health and Disease. pp. P.40, Abstract book. Cairns, Great Barrier Reef, Australia, 1997.
- Cellier, E., Barbot, L., Iyengar, S. & Couture, R.** *Characterization of central and peripheral effects of septide with the use of five tachykinin NK1 receptor antagonists in the rat.* Br J Pharmacol, **127**, 717-28, 1999.
- Chahl, L.A. & Thornton, C.A.** *Locomotor activity and contracture of isolated ileum precipitated by naloxone following treatment of guinea-pigs with a single dose of morphine.* J Pharm Pharmacol, **39**, 52-4, 1987.

**Chan, J.Y., Barnes, C.D. & Chan, S.H.** *Tonic enhancement of the sensitivity of baroreceptor reflex response by endogenous substance P in the rat.* *Regul Pept*, **29**, 199-213, 1990.

**Chang, H.T.** *Substance P-dopamine relationship in the rat substantia nigra: a light and electron microscopy study of double immunocytochemically labeled materials.* *Brain Res*, **448**, 391-6, 1988.

**Chang, M.M., Leeman, S.E. & Niall, H.D.** *Amino-acid sequence of substance P.* *Nat New Biol*, **232**, 86-7, 1971.

**Chan-Palay, V.** *Combined immunocytochemistry and autoradiography after in vivo injections of monoclonal antibody to substance P and 3H-serotonin: Coexistence of two putative transmitters in single raphe cells and fiber plexuses.* *Anat Embryol (Berl)*, **156**, 241-54, 1979.

**Charlton, C.G. & Helke, C.J.** *Substance P-containing medullary projections to the intermediolateral cell column: identification with retrogradely transported rhodamine-labeled latex microspheres and immunohistochemistry.* *Brain Res*, **418**, 245-54, 1987.

**Chassaing, G., Lavielle, S., Brunissen, A., Carruette, A., Garret, C., Petitet, F., Saffroy, M., Beaujouan, J.C., Torrens, Y. & Glowinski, J.** *[Pro9]SP and [pGlu6, Pro9]SP(6-11) interact with two different receptors in the guinea-pig ileum as demonstrated with new SP antagonists.* *Neuropeptides*, **23**, 73-9, 1992.

**Chen, J., Gao, J., Xue, H., Liu, Y. & Xu, C.** *The role of substance P of the central nervous system in the pathogenesis of spontaneously hypertensive rats.* *Proc Chin Acad Med Sci Peking Union Med Coll*, **5**, 153-156, 1990.

- Chen, J., Gao, J.P., Xu, C.T., Zhu, G.Q. & Liu, Y.** *The role of substance P in regulation of blood pressure and hypertension.* Ann N Y Acad Sci, **632**, 413-4, 1991.
- Chen, L.W., Guan, Z.L. & Ding, Y.Q.** *Mesencephalic dopaminergic neurons expressing neuromedin K receptor (NK3): a double immunocytochemical study in the rat.* Brain Res, **780**, 150-4, 1998.
- Chowdrey, H.S., Jessop, D.S. & Lightman, S.L.** *Substance P stimulates arginine vasopressin and inhibits adrenocorticotropin release in vivo in the rat.* Neuroendocrinology, **52**, 90-3, 1990.
- Christensson-Nylander, I., Herrera-Marschitz, M., Staines, W., Hokfelt, T., Terenius, L., Ungerstedt, U., Cuello, C., Oertel, W.H. & Goldstein, M.** *Striato-nigral dynorphin and substance P pathways in the rat. I. Biochemical and immunohistochemical studies.* Exp Brain Res, **64**, 169-92, 1986.
- Clarke, G., Kirby, P.J.C. & Thompson, A.** *Effects on vasopressinergic and oxytocinergic neurons of intraventricular substance P.* J. Physiol. (London), **307**, 59P-60P, 1980.
- Clevens, R.A. & Beal, M.F.** *Substance P-like immunoreactivity in brains with pathological features of Parkinson's and Alzheimer's diseases.* Brain Res, **486**, 387-90, 1989.
- Cooper, J.R., Bloom, F.E. & Roth, R.H.** *The biochemical basis of neuropharmacology.* New York: Oxford University Press, 1996.
- Cornish, J.L. & van den Buuse, M.** *Pressor responses to electrical and chemical stimulation of the rat brain A10 dopaminergic system.* Neurosci Lett, **176**, 142-6, 1994.

**Cornish, J.L. & van den Buuse, M.** *Stimulation of the rat mesolimbic dopaminergic system produces a pressor response which is mediated by dopamine D-1 and D-2 receptor activation and the release of vasopressin.* Brain Res, **701**, 28-38, 1995.

**Couture, R., Picard, P., Poulat, P. & Prat, A.** (1995). *Characterization of the tachykinin receptors involved in spinal and supraspinal cardiovascular regulation.* Can J Physiol Pharmacol, **73**, 892-902, 1995.

**Couture, R., Toma, N. & Barbot, L.** *SR142801 behaves as a tachykinin NK-3 receptor agonist on a spinal nociceptive reflex in the rat.* Life Sci, **66**, 51-65, 2000.

**Crill, N.E. & Reiss, D.J.** *Distribution of carotid sinus and depressor nerve in cat brainstem.* Am. J.Physiol., **214**, 269-276, 1968.

**Cruz, C.J. & Beckstead, R.M.** *Nigrostriatal dopamine neurons are required to maintain basal levels of substance P in the rat substantia nigra.* Neuroscience, **30**, 331-8, 1989.

**Cuello, A.C. & Kanazawa, I.** *The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system.* J Comp Neurol, **178**, 129-56, 1978.

**Culman, J., Tschöpe, C., Jost, N., Itoi, K. & Unger, T.** *Substance P and neurokinin A induced desensitization to cardiovascular and behavioral effects: evidence for the involvement of different tachykinin receptors.* Brain Res, **625**, 75-83, 1993a.

**Culman, J., Tschöpe, C., Picard, P., Prat, A., Regoli, D., Couture, R. & Unger, T.** *In vivo characterization of tachykinin receptors responsible for the central*

*cardiovascular effects of substance P and neurokinin A.* Regul Pept, **46**, 364-6, 1993b.

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

**Culman, J., Klee, S., Ohlendorf, C. & Unger, T.** *Effect of tachykinin receptor inhibition in the brain on cardiovascular and behavioral responses to stress.* J Pharmacol Exp Ther, **280**, 238-46, 1997.

**Dam, T.V., Escher, E. & Quirion, R.** *Evidence for the existence of three classes of neurokinin receptors in brain. Differential ontogeny of neurokinin-1, neurokinin-2 and neurokinin-3 binding sites in rat cerebral cortex.* Brain Res, **453**, 372-6, 1988.

**Dam, T.V., Escher, E. & Quirion, R.** *Visualization of neurokinin-3 receptor sites in rat brain using the highly selective ligand [<sup>3</sup>H]senktide.* Brain Res, **506**, 175-9, 1990.

**Dam, T.V., Takeda, Y., Krause, J.E. & Quirion, R.** *Comparative autoradiographic distribution of [<sup>125</sup>I]-neuropeptide gamma and [<sup>125</sup>I]-neurokinin A binding sites in guinea pig brain.* Ann N Y Acad Sci, **632**, 377-81, 1991.

**Davis, M., Rainnie, D. & Cassell, M.** *Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety.* Trends Neurosci, **17**, 208-14, 1994.

**de Champlain, J.** *Participation du système nerveux autonome dans l'hypertension artérielle.* Médecine/Sciences, **14**, 10-22, 1998.

**de Lanerolle, C.N., Brines, M., Williamson, A., Kim, H.J. & Spenser, D.D.** *Neurotransmitters and their receptors in human temporal lobe epilepsy.* In The

dentate gyrus and its role in seizures. ed C.E. Ribak, C.M.G.I.M. pp. p. 235-250.

Amsterdam: Elsevier, 1992.

**DeQuattro, V., Sullivan, P., Minagawa, R., Kopin, I., Bornheimer, J., Foti, A. & Barndt, R.** *Central and peripheral noradrenergic tone in primary hypertension.* Fed Proc, **43**, 47-51, 1984.

**Diemunsch, P. & Grelot, L.** *Potential of substance P antagonists as antiemetics.* Drugs, **60**, 533-546, 2000.

**Domart, A. & Bourneuf, J.** *Nouveau Larousse Médical.* Paris, France: Librairie Larousse, 1989.

**Douglas, F.L., Palkovits, M. & Brownstein, M.J.** *Regional distribution of substance P-like immunoreactivity in the lower brainstem of the rat.* Brain Res, **245**, 376-8, 1982.

**Drapeau, G., D'Orleans-Juste, P., Dion, S., Rhaleb, N.E., Rouissi, N.E. & Regoli, D.** *Selective agonists for substance P and neurokinin receptors.* Neuropeptides, **10**, 43-54, 1987.

**Drapeau, G., Rouissi, N., Nantel, F., Rhaleb, N.E., Tousignant, C. & Regoli, D.** *Antagonists for the neurokinin NK-3 receptor evaluated in selective receptor systems.* Regul Pept, **31**, 125-35, 1990.

**Edvinsson, L. & Uddman, R.** *Adrenergic, cholinergic and peptidergic nerve fibres in dura mater--involvement in headache?* Cephalalgia, **1**, 175-9, 1981.

**Edvinsson, L., Rosendal-Helgesen, S. & Uddman, R.** *Substance P: localization, concentration and release in cerebral arteries, choroid plexus and dura mater.* Cell Tissue Res, **234**, 1-7, 1983.

- Eguchi, T., Takano, Y., Hatae, T., Saito, R., Nakayama, Y., Shigeyoshi, Y., Okamura, H., Krause, J.E. & Kamiya, H.** *Antidiuretic action of tachykinin NK-3 receptor in the rat paraventricular nucleus.* Brain Res, **743**, 49-55, 1996.
- Eide, I., Kolloch, R., De Quattro, V., Miano, L., Dugger, R. & Van der Meulen, J.** *Raised cerebrospinal fluid norepinephrine in some patients with primary hypertension.* Hypertension, **1**, 255-60, 1979.
- Elliott, P.J. & Iversen, S.D.** *Behavioural effects of tachykinins and related peptides.* Brain Res, **381**, 68-76, 1986.
- Elliott, P.J., Mason, G.S., Stephens-Smith, M. & Hagan, R.M.** *Behavioural and biochemical responses following activation of midbrain dopamine pathways by receptor selective neurokinin agonists.* Neuropeptides, **19**, 119-26, 1991.
- Elliott, J. & Seward, E.M.** *Neurokinin receptor antagonists.* Exp. Opin. Ther. Patents, **7**, 43-54, 1997.
- Emonds-Alt, X., Bichon, D., Ducoux, J.P., Heaulme, M., Miloux, B., Poncelet, M., Proietto, V., Van Broeck, D., Vilain, P., Neliat, G.** *SR 142801, the first potent non-peptide antagonist of the tachykinin NK3 receptor.* Life Sci, **56**, PL27-32, 1995.
- Erspamer, V. & Anastasi, A.** *Polypeptides active on plain muscle in the amphibian skin.* In Hypotensive peptides. ed Erdos, E.G., Back, N., Sicuteri, F. & Wilde, A.F. pp. 63-75. New York, NY, USA: Springer-Verlag, 1966.
- Faulhaber, H.D., Oehme, P., Baumann, R., Enderlein, J., Rathsack, R., Rostock, G. & Naumann, E.** *Substance P in human essential hypertension.* J Cardiovasc Pharmacol, **10 Suppl 12**, S172-6, 1987.

- Favaretto, A.L., Ballejo, G.O., Albuquerque-Araujo, W.I., Gutkowska, J., Antunes-Rodrigues, J. & McCann, S.M.** *Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action.* *Peptides*, **18**, 1377-81, 1997.
- Feldman, P.D.** *Neurokinin1 receptor mediation of the vasodepressor effects of substance P in the nucleus of the tractus solitarius.* *J Pharmacol Exp Ther*, **273**, 617-23, 1995.
- Filippatos, G.S. & Kardaras, F.** *Chemokines and other novel inflammatory markers in hypertension: what can their plasma levels tell us?* *Int J Cardiol*, **83**, 21-3, 2002.
- Folkow, B. & Rubinstein, E.H.** (1966). *Cardiovascular effects of acute and chronic stimulations of the hypothalamic defence area in the rat.* *Acta Physiol Scand.*, **68**, 48-57, 1966.
- Forchetti, C.M., Marco, E.J. & Meek, J.L.** *Serotonin and gamma-aminobutyric acid turnover after injection into the median raphe of substance P and D-ala-met-enkephalin amide.* *J Neurochem*, **38**, 1336-41, 1982.
- Futami, T., Hatanaka, Y., Matsushita, K. & Furuya, S.** *Expression of substance P receptor in the substantia nigra.* *Brain Res Mol Brain Res*, **54**, 183-98, 1998.
- Fuxe, K., Botme, P., Jonsson, G., Agnati, L.F. Goldstein, M., Hokfelt, T., Schwarcz, R. & Engel, J.** *On the cardiovascular role of noradrenaline, adrenaline and peptide containing neuron systems in the brain.* In *Nervous system and hypertension.* ed Schmitt, P.M.H. pp. 1-16. New York: Wiley-Flammarion, 1979.
- Fuxe, K., Agnati, L.F., Rosell, S., Harfstrand, A., Folkers, K., Lundberg, J.M., Andersson, K. & Hokfelt, T.** *Vasopressor effects of substance P and C-terminal*

*sequences after intracisternal injection to alpha-chloralose-anaesthetized rats:*

*blockade by a substance P antagonist.* Eur J Pharmacol, 77, 171-6, 1982.

**Galeno, T.M., Van Hoesen, G.W., Maixner, W., Johnson, A.K. & Brody, M.J.**

*Contribution of the amygdala to the development of spontaneous hypertension.* Brain Res, 246, 1-6, 1982.

**Galeno, T.M., Van Hoesen, G.W. & Brody, M.J.** *Central amygdaloid nucleus lesion attenuates exaggerated hemodynamic responses to noise stress in the spontaneously hypertensive rat.* Brain Res, 291, 249-59, 1984.

**Garret, C., Carruette, A., Fardin, V., Moussaoui, S., Peyronel, J.F., Blanchard, J.C. & Laduron, P.M.** *Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist.* Proc Natl Acad Sci U S A, 88, 10208-12, 1991.

**Gauchy, C., Desban, M., Glowinski, J. & Kemel, M.L.** *Distinct regulations by septide and the neurokinin-1 tachykinin receptor agonist [pro9]substance P of the N-methyl-D-aspartate-evoked release of dopamine in striosome- and matrix-enriched areas of the rat striatum.* Neuroscience, 73, 929-39, 1996.

**Gavioli, E. C., Canteras, N. S. & De Lima, T. C.** *The role of lateral septal NK1 receptors in mediating anxiogenic effects induced by intracerebroventricular injection of substance P.* Behav Brain Res., 134, 411-415, 2002.

**Gerfen, C.R. & Scott Young III, W.** *Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study.* Brain Res, 460, 161-7, 1988.

- Gerfen, C.R.** *The neostriatal mosaic: Multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia.* *Annu. Rev. Neurosci.*, **15**, 285-320, 1992.
- Gerfen, C.R. & Wilson, C.J.** *The basal ganglia.* In *Handbook of Chemical Neuroanatomy.* ed L.W. Swanson, A.B.T.H. pp. 371-451. New York: Elsevier Science, 1996.
- Gesztes, Z., Scuderi, P. E., White, P. F., Wright, W., Wender, R. H., D'Angelo, R., Black, L. S., Dalby, P. L. & MacLean, D.** *Substance P (Neurokinin-1) antagonist prevents postoperative vomiting after abdominal hysterectomy procedures.* *Anesthesiology*, **93**, 931-937, 2000.
- Gillis, R.A., Helke, C.J., Hamilton, B.L., Norman, W.P. & Jacobowitz, D.M.** *Evidence that substance P is a neurotransmitter of baro- and chemoreceptor afferents in nucleus tractus solitarius.* *Brain Res*, **181**, 476-81, 1980.
- Girouard, H., Chulak, C., LeJossec, M., Lamontagne, D. & de Champlain, J.** *Chronic antioxidant treatment improves sympathetic functions and beta-adrenergic pathway in the spontaneously hypertensive rats.* *J. Hypertension*, **21**, 179-188, 2003.
- Glowinski, J., Kemel, M.L., Desban, M., Gauchy, C., Lavielle, S., Chassaing, G., Beaujouan, J.C. & Tremblay, L.** *Distinct presynaptic control of dopamine release in striosomal- and matrix-enriched areas of the rat striatum by selective agonists of NK1, NK2 and NK3 tachykinin receptors.* *Regul Pept*, **46**, 124-8, 1993.
- Goldstein, D.J., Wang, O., Saper, J.R., Stoltz, R., Silberstein, S.D. & Mathew, N.T.** *Ineffectiveness of neurokinin-1 antagonist in acute migraine: a crossover study.* *Cephalalgia*, **17**, 785-90, 1997.

**Goodman, R.R., Snyder, S.H., Kuhar, M.J. & Scott Young III, W.**

*Differentiation of delta and mu opiate receptor localizations by light microscopic autoradiography.* Proc Natl Acad Sci U S A, 77, 6239-43, 1980.

**Grace, A.A. & Bunney, B.S.** *Paradoxical GABA excitation of nigral dopaminergic cells: indirect mediation through reticulata inhibitory neurons.* Eur J Pharmacol, 59, 211-8, 1979.

**Granata, A.R. & Woodruff, G.N.** *A central hypertensive action of substance P in rats.* IRCS Medical Sciences, 8, 205, 1980.

**Grassi, G., Cattaneo, B.M., Seravalle, G., Lanfranchi, A. & Mancina, G.** *Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension.* Hypertension, 31, 68-72, 1998.

**Guard, S., Watson, S.P., Maggio, J.E., Too, H.P. & Watling, K.J.** *Pharmacological analysis of [3H]-senktide binding to NK3 tachykinin receptors in guinea-pig ileum longitudinal muscle-myenteric plexus and cerebral cortex membranes.* Br J Pharmacol, 99, 767-73, 1990.

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

**Guard, S., Boyle, S.J., Tang, K.W., Watling, K.J., McKnight, A.T. & Woodruff, G.N.** *The interaction of the NK1 receptor antagonist CP-96,345 with L-type calcium channels and its functional consequences.* Br J Pharmacol, 110, 385-91, 1993.

**Gueudet, C., Santucci, V., Soubrie, P. & Le Fur, G.** *Blockade of neurokinin3 receptors antagonizes drug-induced population response and depolarization block of midbrain dopamine neurons in guinea pigs.* Synapse, 33, 71-9, 1999.

**Gutkowska, J., Jankowski, M., Lambert, C., Mukaddam-Daher, S., Zingg, H.H. & McCann, S.M.** *Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart.* Proc Natl Acad Sci U S A, **94**, 11704-9, 1997.

**Gutkowska, J., Jankowski, M., Mukaddam-Daher, S. & McCann, S.M.** *Oxytocin is a cardiovascular hormone.* Braz J Med Biol Res, **33**, 625-33, 2000.

**Guzman, R.G., Kendrick, K.M. & Emson, P.C.** *Effect of substance P on acetylcholine and dopamine release in the rat striatum: a microdialysis study.* Brain Res, **622**, 147-54, 1993.

**Gygi, S.P., Gibb, J.W., Johnson, M. & Hanson, G.R.** *Blockade of tachykinin NK1 receptors by CP-96345 enhances dopamine release and the striatal dopamine effects of methamphetamine in rats.* Eur J Pharmacol, **250**, 177-80, 1993.

**Haeusler, G.** *Clonidine-induced inhibition of sympathetic nerve activity: no indication for a central presynaptic or an indirect sympathomimetic mode of action.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, **286**, 97-111, 1974.

**Haeusler, G. & Osterwalder, R.** *Evidence suggesting a transmitter or neuromodulatory role for substance P at the first synapse of the baroreceptor reflex.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, **314**, 111-21, 1980.

**Hagan, R.M., Beresford, I.J., Stables, J., Dupere, J., Stubbs, C.M., Elliott, P.J., Sheldrick, R.L., Chollet, A., Kawashima, E., McElroy, A.B.** *Characterisation, CNS distribution and function of NK2 receptors studied using potent NK2 receptor antagonists.* Regul Pept, **46**, 9-19, 1993.

**Hall, M.E., Miley, F.B. & Stewart, J.M.** *Cardiovascular effects of substance P peptides in the nucleus of the solitary tract.* Brain Res, **497**, 280-90, 1989.

**Hanley, M.R., Lee, C.M., Michell, R.H. & Jones, L.M.** *Similar effects of substance P and related peptides on salivation and on phosphatidylinositol turnover in rat salivary glands.* Mol Pharmacol, **18**, 78-83, 1980a.

**Hanley, M.R., Sandberg, B.E., Lee, C.M., Iversen, L.L., Brundish, D.E. & Wade, R.** *Specific binding of 3H-substance P to rat brain membranes.* Nature, **286**, 810-2, 1980b.

**Hanson, G. R., Alphas, L., Wolf, W., Levine, R. & Lovenberg, W.** *Haloperidol-induced reduction of nigral substance P-like immunoreactivity: a probe for the interactions between dopamine and substance P neuronal systems.* J. Pharmacol. Exp. Ther, **218**, 568-574, 1981.

**Harrison, S. & Geppetti, P.** *Substance P.* Int J Biochem Cell Biol., **33**, 555-576, 2001.

**Hay, D. W., Giardina, G. A., Griswold, D. E., Underwood, D. C., Kotzer, C. J., Bush, B., Potts, W., Sandhu, P., Lundberg, D., Foley, J. J., Schmidt, D. B., Martin, L. D., Kilian, D., Legos, J. J., Barone, F. C., Luttmann, M. A., Grugni, M., Raveglia, L. F. & Sarau, H. M.** *Nonpeptide tachykinin receptor antagonists. III. SB 235375, a low central nervous system-penetrant, potent and selective neurokinin-3 receptor antagonist, inhibits citric acid-induced cough and airways hyper-reactivity in guinea pigs.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **300**, 314-323, 2002.

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

**Helke, C.J., Neil, J.J., Massari, V.J. & Loewy, A.D.** *Substance P neurons project from the ventral medulla to the intermediolateral cell column and ventral horn in the rat.* Brain Res, **243**, 147-52, 1982.

**Helke, C.J., Shults, C.W., Chase, T.N. & O'Donohue, T.L.** *Autoradiographic localization of substance P receptors in rat medulla: effect of vagotomy and nodose ganglionectomy.* Neuroscience, **12**, 215-23, 1984.

**Helke, C.J., Krause, J.E., Mantyh, P.W., Couture, R. & Bannon, M.J.** *Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms.* Faseb J, **4**, 1606-15, 1990.

**Helke, C.J., Sasek, C.A., Niederer, A.J. & Krause, J.E.** *Tachykinins in autonomic control systems. The company they keep.* Ann N Y Acad Sci, **632**, 154-69, 1991.

**Herkenham, M.** *Mismatches between neurotransmitter and receptor localizations in brain: observations and implications.* Neuroscience, **23**, 1-38, 1987.

**Herrera-Marschitz, M., Christensson-Nylander, I., Sharp, T., Staines, W., Reid, M., Hokfelt, T., Terenius, L. & Ungerstedt, U.** *Striato-nigral dynorphin and substance P pathways in the rat. II. Functional analysis.* Exp Brain Res, **64**, 193-207, 1986.

**Hershey, A.D. & Krause, J.E.** *Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor.* Science, **247**, 958-62, 1990.

**Hershey, A.D., Polenzani, L., Woodward, R.M., Miledi, R. & Krause, J.E.** *Molecular and genetic characterization, functional expression, and mRNA expression patterns of a rat substance P receptor.* Ann N Y Acad Sci, **632**, 63-78, 1991.

- Hesketh, P. J.** *Potential role of the NK1 receptor antagonists in chemotherapy-induced nausea and vomiting.* Support Care Cancer, **9**, 350-354, 2001.
- Hilton, S.M.** *The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control.* J Exp Biol, **100**, 159-74, 1982.
- Hilton, S.M. & Redfern, W.S.** *A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat.* J Physiol, **378**, 213-28, 1986.
- Hokfelt, T., Elde, R., Fuxe, K., Johansson, O., Ljungdahl, A., Goldstein, M., Luft, R., Efendic, S., Nilsson, G., Terenius, L., Ganten, D., Jeffcoate, S.L., Rehfeld, J., Said, S., Perez de la Mora, M., Possani, L., Tapia, R., Teran, L. & Palacios, R.** *Aminergic and peptidergic pathways in the nervous system with special reference to the hypothalamus.* In The hypothalamus. ed S. Reichlin, R.J.B.J.B.M. pp. 69-135. New York: Raven Press, 1978.
- Hokfelt, T., Reid, M., Herrera-Marschitz, M., Ungerstedt, U., Terenius, L., Hakanson, R., Feng, D.M. & Folkers, K.** *Tachykinins and related peptides in the substantia nigra and neostriatum.* Ann N Y Acad Sci, **632**, 192-7, 1991.
- Holzer, P. & Holzer-Petsche, U.** *Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function.* Pharmacol Ther., **73**, 173-217, 1997.
- Hong, J.S., Yang, H.T. & Costa, E.** *Substance P content of substantia nigra after chronic treatment with antischizophrenic drugs.* Neuropharmacology, **17**, 83-5, 1978.
- Hornykiewicz, O.** *Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic implications (including the clinical use of L-DOPA).* Br Med Bull, **29**, 172-8, 1973.

**Humpel, C. & Saria, A.** *Effects of GABA and L-glutamic acid on the potassium-evoked in vitro release of substance P- and neurokinin A-like immunoreactivities are different in the rat striatum and substantia nigra.* *Neurosci Lett*, **105**, 159-63, 1989.

**Humpel, C., Saria, A. & Regoli, D.** *Injection of tachykinins and selective neurokinin receptor ligands into the substantia nigra reticulata increases striatal dopamine and 5-hydroxytryptamine metabolism.* *Eur J Pharmacol*, **195**, 107-14, 1991.

**Humpel, C. & Saria, A.** *Intranigral injection of selective neurokinin-1 and neurokinin-3 but not neurokinin-2 receptor agonists biphasically modulate striatal dopamine metabolism but not striatal preprotachykinin-A mRNA in the rat.* *Neurosci Lett*, **157**, 223-6, 1993.

**Hurd, Y.L., Keller, E., Sotonyi, P. & Sedvall, G.** *Preprotachykinin-A mRNA expression in the human and monkey brain: An in situ hybridization study.* *J Comp Neurol*, **411**, 56-72, 1999.

**Itoi, K., Jost, N., Badoer, E., Tschöpe, C., Culman, J. & Unger, T.** *Localization of the substance P-induced cardiovascular responses in the rat hypothalamus.* *Brain Res*, **558**, 123-6, 1991.

**Itoi, K., Tschöpe, C., Jost, N., Culman, J., Lebrun, C., Stauss, B. & Unger, T.** *Identification of the central tachykinin receptor subclass involved in substance P-induced cardiovascular and behavioral responses in conscious rats.* *Eur J Pharmacol*, **219**, 435-44, 1992.

**Itoi, K., Jost, N., Culman, J., Tschöpe, C. & Unger, T.** *Further localization of cardiovascular and behavioral actions of substance P in the rat brain.* Brain Res, **668**, 100-6, 1994a.

**Itoi, K., Jost, N., Tschöpe, C., Culman, J., Badoer, E. & Unger, T.** *Inhibition by morphine of the cardiovascular and behavioral responses evoked by centrally administered substance P in conscious rats.* Neuropharmacology, **33**, 181-7, 1994b.

**James, T.A. & Starr, M.S.** *Behavioural and biochemical effects of substance P injected into the substantia nigra of the rat.* J Pharm Pharmacol, **29**, 181-2, 1977.

**Jessel, T.M.** *Inhibition of substance P release from the isolated rat substantia nigra by GABA.* Br J Pharmacol, **59**, p.496, 1977.

**Jessel, T.M.** *Substance P release from the rat substantia nigra.* Brain Res., **151**, 469-498, 1978.

**Jessel, T.M.** *Substance P in the nervous system.* In Handbook of Psychopharmacology. pp. 1-105, 1983.

**Jordan, C.C. & Oehme, P.** *Substance P: Metabolism and biological actions.* London: Taylor & Francis, 1985.

**Julius, S.** *The blood pressure seeking properties of the central nervous system.* J Hypertens, **6**, 177-85, 1988.

**Kalant, H. & Roschlau, W.H.E.** *Principles of medical pharmacology.* Burlington, Ont, 1989.

- Kalia, M., Fuxe, K., Hokfelt, T., Johansson, O., Lang, R., Ganten, D., Cuello, C. & Terenius, L.** *Distribution of neuropeptide immunoreactive nerve terminals within the subnuclei of the nucleus of the tractus solitarius of the rat.* J Comp Neurol, **222**, 409-44, 1984.
- Kanazawa, I., Emson, P.C. & Cuello, A.C.** *Evidence for the existence of substance P-containing fibres in striato-nigral and pallido-nigral pathways in rat brain.* Brain Res, **119**, 447-53, 1977.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessel, T.M.** *Principles of neural science.* Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange, 1991.
- Kangawa, K., Minamino, N., Fukuda, A. & Matsuo, H.** *Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord.* Biochem Biophys Res Commun, **114**, 533-40, 1983.
- Katzung, B.G.** *Basic and clinical pharmacology.* 6e Édition, Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange, 1995.
- Kelley, A.E. & Iversen, S.D.** *Substance P infusion into substantia nigra of the rat: behavioural analysis and involvement of striatal dopamine.* Eur J Pharmacol, **60**, 171-9, 1979a.
- Kelley, A.E., Stinus, L. & Iversen, S.D.** *Behavioural activation induced in the rat by substance P infusion into ventral tegmental area: implication of dopaminergic A10 neurones.* Neurosci Lett, **11**, 335-9, 1979b.
- Khan, S., Brooks, N., Whelpton, R. & Michael-Titus, A.T.** *Substance P-(1-7) and substance P-(5-11) locally modulate dopamine release in rat striatum.* Eur J Pharmacol, **282**, 229-33, 1995.

- Khan, S., Grogan, E., Whelpton, R. & Michael-Titus, A.T.** *N- and C-terminal substance P fragments modulate striatal dopamine outflow through a cholinergic link mediated by muscarinic receptors.* *Neuroscience*, **73**, 919-27, 1996a.
- Khan, S., Whelpton, R. & Michael-Titus, A.T.** *Evidence for modulatory effects of substance P fragments (1-4) and (8-11) on endogenous dopamine outflow in rat striatal slices.* *Neurosci Lett*, **205**, 33-6, 1996b.
- Kimura, S., Okada, M., Sugita, Y., Kanazawa, I. & Munekata, E.** *Novel neuropeptides, neurokinin alpha and neurokinin Beta, isolated from porcine spinal cord.* *Proc. Jap. Acad.*, **59**, 101, 1983.
- Kirouac, G.J. & Ganguly, P.K.** *Up-regulation of dopamine receptors in the brain of the spontaneously hypertensive rat: an autoradiographic analysis.* *Neuroscience*, **52**, 135-41, 1993.
- Kirouac, G.J. & Ciriello, J.** *Cardiovascular depressor responses to stimulation of substantia nigra and ventral tegmental area.* *Am J Physiol*, **273**, H2549-57, 1997.
- Klugman, K.P., Lembeck, F., Markowitz, S., Mitchell, G. & Rosendorff, C.** *Substance P increases hypothalamic blood flow via an indirect adrenergic-cholinergic interaction.* *Br J Pharmacol*, **71**, 623-9, 1980.
- Knox, A.P., Strominger, N.L., Battles, A.H. & Carpenter, D.O.** *Behavioral studies of emetic sensitivity in the ferret.* *Brain Res Bull*, **31**, 477-84, 1993.
- Kohlmann, O., Jr., Cesaretti, M.L., Ginoza, M., Tavares, A., Zanella, M.T., Ribeiro, A.B., Ramos, O.L., Leeman, S.E., Gavras, I. & Gavras, H.** *Role of substance P in blood pressure regulation in salt-dependent experimental hypertension.* *Hypertension*, **29**, 506-9, 1997.

**Kopera, H.L., W.** *Zur frage der zentralen Ubertragung afferenter impulse. IV.*

*Die verteilung der Substanz P im zentralnervensystem.* Arch. Exp. Path. Pharmak., **219**, 214-222, 1953.

**Korner, P.I.** *Baroreceptor resetting and other determinants of baroreflex properties in hypertension.* Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl, **15**, 45-64, 1989.

**Kotani, H., Hoshimaru, M., Nawa, H. & Nakanishi, S.** (1986). *Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor.* Proc Natl Acad Sci U S A, **83**, 7074-8, 1986.

**Kramer, M.S.** *Update on Substance P (NK-1 receptor) antagonists in clinical trials for depression.* Neuropeptides, **34**, 255, 2000.

**Krause, J.E., MacDonald, M.R. & Takeda, Y.** *The polyprotein nature of substance P precursors.* Bioessays, **10**, 62-9, 1989.

**Kris, M.G., Radford, J. & Pizzo, B.** *Dose-ranging antiemetic trial of the NK-1 receptor antagonist CP 122721: a new approach for acute and delayed emesis following cisplatin.* Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., **15**, A1780, 1996.

**Ku, Y.H., Tan, L., Li, L.S. & Ding, X.** *Role of corticotropin-releasing factor and substance P in pressor responses of nuclei controlling emotion and stress.* Peptides, **19**, 677-82, 1998.

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

**Laflamme, A.K. & de Champlain, J.** *Interactions des systèmes sympathique et rénine-angiotensine.* Thérapie, **53**, 245-252, 1998.

**Langlois, X., Wintolders, C., te Riele, P., Leysen, J.E. & Jurzak, M.**

*Detailed distribution of Neurokinin 3 receptors in the rat, guinea pig and gerbil brain: a comparative autoradiographic study.* Neuropharmacology, **40**, 242-53, 2001.

**Larsen, P.J., Jessop, D.S., Chowdrey, H.S., Mikkelsen, J.D. & Lightman, S.L.**

(1992). *Osmotic regulation of substance P and neurokinin A peptide content and substance P binding sites in distinct hypothalamic nuclei of the rat.* Peptides, **13**, 705-12, 1992.

**Laufer, R., Gilon, C., Chorev, M. & Selinger, Z.** [*pGlu6,Pro9*]SP6-11, a selective

*agonist for the substance P P-receptor subtype.* J Med Chem, **29**, 1284-8, 1986.

**Laufer, R., Gilon, C., Chorev, M. & Selinger, Z.** (1988). *Desensitization with a*

*selective agonist discriminates between multiple tachykinin receptors.* J Pharmacol

Exp Ther, **245**, 639-43, 1988.

**Lecci, A., Giuliani, S., Tramontana, M., Carini, F. & Maggi, C. A.** *Peripheral*

*actions of tachykinins.* Neuropeptides, **34**, 303-313, 2000.

**Lee, C.M., Iversen, L.L., Hanley, M.R. & Sandberg, B.E.** (1982). *The possible*

*existence of multiple receptors for substance P.* Naunyn Schmiedebergs Arch

Pharmacol, **318**, 281-7, 1982.

**Lee, J.M., McLean, S., Maggio, J.E., Zamir, N., Roth, R.H., Eskay, R.L. &**

**Bannon, M.J.** (1986). *The localization and characterization of substance P and*

*substance K in striatonigral neurons.* Brain Res, **371**, 152-4, 1986.

**Lembeck, F. & Zetler, G.** *Substance P: a polypeptide of possible physiological significance, especially within the nervous system.* Int. Rev. Neurobiol., **4**, 159-215, 1962.

**Lembeck, F. & Starke, K.** *Substance P content and effect on capillary permeability of extract of various parts of human brain.* Nature, **199**, 1295-1296, 1963.

**Lembeck, F. & Fischer, G.** [*Crossed tachyphylaxis of peptides*]. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol, **258**, 452-6, 1967.

**Len, W.B., Tsou, M.Y., Chan, S.H. & Chan, J.Y.** *Substance P suppresses the activity of alpha 2-adrenoceptors of the nucleus reticularis gigantocellularis involved in cardiovascular regulation in the rat.* Brain Res, **638**, 227-34, 1994.

**Leroy, V., Mauser, P., Gao, Z. & Peet, N. P.** *Neurokinin receptor antagonists.* Expert Opin Investig Drugs, **9**, 735-746, 2000.

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

**Lessard, A. & Bachelard, H.** *Tonic inhibitory control exerted by opioid peptides in the paraventricular nuclei of the hypothalamus on regional hemodynamic activity in rats.* Br J Pharmacol, **136**, 753-63, 2002.

**Lessard, A., Campos, M.M., Neugebauer, W. & Couture, R.** *Implication of nigral tachykinin NK-3 receptors in the maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats: a pharmacologic and autoradiographic study.* Br J Pharmacol, **138**, 554-563, 2003.

**Levine, E.S., Litto, W.J. & Jacobs, B.L.** *Activity of cat locus coeruleus noradrenergic neurons during the defense reaction.* Brain Res, **531**, 189-95, 1990.

- Lin, M.T., Tsay, B.L. & Chen, F.F.** *Activation of dopaminergic receptors within the caudate-putamen complex facilitates reflex bradycardia in the rat.* Jpn J Physiol, **32**, 431-42, 1982.
- Lin, M.T. & Yang, J.J.** *Stimulation of the nigrostriatal dopamine system produces hypertension and tachycardia in rats.* Am J Physiol, **266**, H2489-96, 1994.
- Lindfors, N., Brodin, E., Theodorsson-Norheim, E. & Ungerstedt, U.** *Calcium-dependent potassium-stimulated release of neurokinin A and neurokinin B from rat brain regions in vitro.* Neuropeptides, **6**, 453-61, 1985.
- Lindfors, N., Brodin, E. & Ungerstedt, U.** *Neurokinin A and substance P in striato-nigral neurons in rat brain.* Neuropeptides, **8**, 127-32, 1986a.
- Lindfors, N., Yamamoto, Y., Pantaleo, T., Lagercrantz, H., Brodin, E. & Ungerstedt, U.** *In vivo release of substance P in the nucleus tractus solitarii increases during hypoxia.* Neurosci Lett, **69**, 94-7, 1986b.
- Lindfors, N., Brodin, E. & Ungerstedt, U.** *Subchronic haloperidol treatment decreases the in vivo release of tachykinins in rat substantia nigra.* Eur J Pharmacol, **161**, 95-8, 1989.
- Linthorst, A.C., van Giersbergen, P.L., Gras, M., Versteeg, D.H. & de Jong, W.** *The nigrostriatal dopamine system: role in the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats.* Brain Res, **639**, 261-8, 1994.
- Lipski, J., McAllen, R.M. & Spyer, K.M.** *The sinus nerve and baroreceptor input to the medulla of the cat.* J. Physiol. (London), **251**, 61-78, 1975.
- Liu, H., Mazarati, A. M., Katsumori, H., Sankar, R. & Wasterlain, C. G.** *Substance P is expressed in hippocampal principal neurons during status epilepticus*

*and plays a critical role in the maintenance of status epilepticus.* Proc Natl Acad Sci U S A, **96**, 5286-5291, 1999.

**Liu, H., Sankar, R., Shin, D.H., Mazarati, A.M. & Wasterlain, C.G.** *Patterns of status epilepticus-induced substance P expression during development.* Neuroscience, **101**, 297-304, 2000.

**Ljungdahl, A., Hokfelt, T. & Nilsson, G.** *Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat--I. Cell bodies and nerve terminals.* Neuroscience, **3**, 861-943, 1978a.

**Ljungdahl, A., Hokfelt, T., Nilsson, G. & Goldstein, M.** *Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat--II. Light microscopic localization in relation to catecholamine-containing neurons.* Neuroscience, **3**, 945-76, 1978b.

**Longmore, J., Hill, R.G. & Hargreaves, R.J.** *Neurokinin-receptor antagonists: pharmacological tools and therapeutic drugs.* Can J Physiol Pharmacol, **75**, 612-21, 1997.

**Lovick, T.A. & Hunt, S.P.** *Substance P-immunoreactive and serotonin-containing neurones in the ventral brainstem of the cat.* Neurosci Lett, **36**, 223-8, 1983.

**Lucas, L.R., Hurley, D.L., Krause, J.E. & Harlan, R.E.** *Localization of the tachykinin neurokinin B precursor peptide in rat brain by immunocytochemistry and in situ hybridization.* Neuroscience, **51**, 317-45, 1992.

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

- Maggi, C.A., Patacchini, R., Rovero, P. & Giachetti, A.** *Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists.* *J Auton Pharmacol*, **13**, 23-93, 1993.
- Maggi, C.A.** *The mammalian tachykinin receptors.* *Gen Pharmacol*, **26**, 911-44, 1995.
- Maggi, C.A.** *Tachykinins as peripheral modulators of primary afferent nerves and visceral sensitivity.* *Pharmacol Res.*, **36**, 153-169, 1997.
- Maggio, J.E.** *Tachykinins.* *Annu Rev Neurosci*, **11**, 13-28, 1988.
- Maier, T., Dai, W.J., Csikos, T., Jirikowski, G.F., Unger, T. & Culman, J.** *Oxytocin pathways mediate the cardiovascular and behavioral responses to substance P in the rat brain.* *Hypertension*, **31**, 480-6, 1998.
- Maldonado, R., Girdlestone, D. & Roques, B.P.** *RP 67580, a selective antagonist of neurokinin-1 receptors, modifies some of the naloxone-precipitated morphine withdrawal signs in rats.* *Neurosci Lett*, **156**, 135-40, 1993.
- Maley, B. & Elde, R.** *Immunohistochemical localization of putative neurotransmitters within the feline nucleus tractus solitarii.* *Neuroscience*, **7**, 2469-90, 1982.
- Malthe-Sphirensen, D., Cheney, D.L. & Costa, E.** *Modulation of acetylcholine metabolism in the hippocampal cholinergic pathway by intraseptally injected substance P.* *J Pharmacol Exp Ther*, **206**, 21-8, 1978.
- Mansour, A., Fox, C.A., Akil, H. & Watson, S.J.** *Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications.* *Trends Neurosci*, **18**, 22-9, 1995.

- Mantyh, P.W., Hunt, S.P. & Maggio, J.E.** *Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [3H]SP as the radioligand.* Brain Res, **307**, 147-65, 1984.
- Mantyh, P.W., Gates, T., Mantyh, C.R. & Maggio, J.E.** *Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues.* J Neurosci, **9**, 258-79, 1989.
- Marco, N., Thirion, A., Mons, G., Bougault, I., Le Fur, G., Soubrie, P. & Steinberg, R.** *Activation of dopaminergic and cholinergic neurotransmission by tachykinin NK3 receptor stimulation: an in vivo microdialysis approach in guinea pig.* Neuropeptides, **32**, 481-8, 1998.
- Marksteiner, J., Sperk, G. & Krause, J.E.** *Distribution of neurons expressing neurokinin B in the rat brain: immunohistochemistry and in situ hybridization.* J Comp Neurol, **317**, 341-56, 1992.
- Marshall, D.C. & Buccafusco, J.J.** *Spontaneous morphine withdrawal from the rat spinal cord.* Experientia, **41**, 1151-2, 1985a.
- Marshall, D.C. & Buccafusco, J.J.** *Supraspinal and spinal mediation of naloxone-induced morphine withdrawal in rats.* Brain Res, **329**, 131-42, 1985b.
- Martini, F., Reynaud, J.C. & Puizillout, J.J.** *Effects of substance P on cardiovascular regulation in the rabbit.* J Auton Nerv Syst, **51**, 143-52, 1995.
- Massi, M., Saija, A., Polidori, C., Perfumi, M., Gentili, L., Costa, G. & de Caro, G.** *The hypothalamic paraventricular nucleus is a site of action for the central effect of tachykinins on plasma vasopressin.* Brain Res Bull, **26**, 149-54, 1991.

- Masu, Y., Nakayama, K., Tamaki, H., Harada, Y., Kuno, M. & Nakanishi, S. *cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system.* Nature, **329**, 836-8, 1987.
- Mauborgne, A., Javoy-Agid, F., Legrand, J.C., Agid, Y. & Cesselin, F. *Decrease of substance P-like immunoreactivity in the substantia nigra and pallidum of parkinsonian brains.* Brain Res, **268**, 167-70, 1983.
- Mauborgne, A., Bourgoin, S., Benoliel, J.J., Hirsch, M., Berthier, J.L., Hamon, M. & Cesselin, F. *Enkephalinase is involved in the degradation of endogenous substance P released from slices of rat substantia nigra.* J Pharmacol Exp Ther, **243**, 674-80, 1987.
- May, A. & Goadsby, P. J. *Pharmacological opportunities and pitfalls in the therapy of migraine.* Curr Opin Neurol, **14**, 341-345, 2001.
- McKnight, A.T., Maguire, J.J., Williams, B.J., Foster, A.C., Tridgett, R. & Iversen, L.L. *Pharmacological specificity of synthetic peptides as antagonists at tachykinin receptors.* Reg. Pept., **22**, 127, 1988.
- McLean, S., Ganong, A.H., Seeger, T.F., Bryce, D.K., Pratt, K.G., Reynolds, L.S., Siok, C.J., Lowe, J.A., 3rd & Heym, J. *Activity and distribution of binding sites in brain of a nonpeptide substance P (NK1) receptor antagonist.* Science, **251**, 437-9, 1991.
- Merchenthaler, I., Maderdrut, J.L., O'Harte, F. & Conlon, J.M. *Localization of neurokinin B in the central nervous system of the rat.* Peptides, **13**, 815-29, 1992.

- Micevych, P.E., Yaksh, T.L. & Go, V.L.** *Studies on the opiate receptor-mediated inhibition of K<sup>+</sup>-stimulated cholecystinin and substance P release from cat hypothalamus in vitro.* Brain Res, **290**, 87-94, 1984.
- Miceli, G., Martignoni, E., Cavallini, A., Sandrini, G. & Nappi, G.** *Postprandial and orthostatic hypotension in Parkinson's disease.* Neurology, **37**, 386-93, 1987.
- Mileusnic, D., Lee, J.M., Magnuson, D.J., Hejna, M.J., Krause, J.E., Lorens, J.B. & Lorens, S.A.** *Neurokinin-3 receptor distribution in rat and human brain: an immunohistochemical study.* Neuroscience, **89**, 1269-90, 1999.
- Milner, T.A., Pickel, V.M., Abate, C., Joh, T.H. & Reis, D.J.** *Ultrastructural characterization of substance P-like immunoreactive neurons in the rostral ventrolateral medulla in relation to neurons containing catecholamine-synthesizing enzymes.* J Comp Neurol, **270**, 427-45, 402-5, 1988.
- Minamino, N., Masuda, H., Kangawa, K. & Matsuo, H.** *Regional distribution of neuromedin K and neuromedin L in rat brain and spinal cord.* Biochem Biophys Res Commun, **124**, 731-8, 1984.
- Mitchell, R. & Fleetwood-Walker, S.** *Substance P, but not TRH, modulates the 5-HT autoreceptor in ventral lumbar spinal cord.* Eur J Pharmacol, **76**, 119-20, 1981.
- Mori, M., Tsushima, H. & Matsuda, T.** *Substance P injected into the hypothalamic supraoptic nucleus causes antidiuresis through the release of arginine-vasopressin in water-loaded and ethanol-anesthetized rats.* Jpn J Pharmacol, **62**, 49-56, 1993.
- Morilak, D.A., Morris, M. & Chalmers, J.** *Release of substance P in the nucleus tractus solitarius measured by in vivo microdialysis: response to stimulation of the aortic depressor nerves in rabbit.* Neurosci Lett, **94**, 131-7, 1988.

**Morris, M., Wren, J.A. & Sundberg, D.K.** *Central neural peptides and catecholamines in spontaneous and DOCA/salt hypertension.* Peptides, **2**, 207-11, 1981.

**Morris, M., Keller, M. & Sundberg, D.K.** *Changes in paraventricular vasopressin and oxytocin during the development of spontaneous hypertension.* Hypertension, **5**, 476-81, 1983.

**Morris, M., Ross, J. & Sundberg, D.K.** *Catecholamine biosynthesis and vasopressin and oxytocin secretion in the spontaneously hypertensive rat: an in vitro study of localized brain regions.* Peptides, **6**, 949-55, 1985.

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

**Nagashima, A., Takano, Y., Tateishi, K., Matsuoka, Y., Hamaoka, T. & Kamiya, H.** *Cardiovascular roles of tachykinin peptides in the nucleus tractus solitarius of rats.* Brain Res, **487**, 392-6, 1989a.

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

**Nagatsu, I., Ikemoto, K., Takeuchi, T., Arai, R., Karasawa, N., Fujii, T. & Nagatsu, T.** *Phenylethanolamine-N-methyltransferase - immunoreactive nerve terminals afferent to the mouse substantia nigra.* Neurosci Lett, **245**, 41-4, 1998.

- Nakamura, K. & Hayashi, T.** *Alterations of brainstem and peripheral met-enkephalin and substance P levels in spontaneously hypertensive rats.* Clin. Exp. Theory Pract., **A6**, 1833-1836, 1984.
- Nakanishi, S.** *Mammalian tachykinin receptors.* Annu Rev Neurosci, **14**, 123-36, 1991.
- Nakayama, Y., Takano, Y., Saito, R. & Kamiya, H.** *Central pressor actions of tachykinin NK-3 receptor in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus.* Brain Res, **595**, 339-42, 1992.
- Nalivaiko, E., Michaud, J.C., Soubrie, P., Le Fur, G. & Feltz, P.** *Tachykinin neurokinin-1 and neurokinin-3 receptor-mediated responses in guinea-pig substantia nigra: an in vitro electrophysiological study.* Neuroscience, **78**, 745-57, 1997.
- Nawa, H., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S. & Nakanishi, S.** *Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor.* Nature, **306**, 32-6, 1983.
- Nawa, H., Kotani, H. & Nakanishi, S.** *Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing.* Nature, **312**, 729-34, 1984.
- Nicoll, R.A., Schenker, C. & Leeman, S.E.** *Substance P as a transmitter candidate.* Annu Rev Neurosci, **3**, 227-68, 1980.
- Nishizuka, Y.** *The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion.* Nature, **308**, 693-8, 1984.

- Oblin, A., Danse, M.J. & Zivkovic, B.** *Degradation of substance P by membrane peptidases in the rat substantia nigra: effect of selective inhibitors.* Neurosci Lett, **84**, 91-6, 1988.
- Otsuka, M. & Yoshioka, K.** *Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins.* Physiol Rev, **73**, 229-308, 1993.
- Overton, P., Elliott, P.J., Hagan, R.M. & Clark, D.** *Neurokinin agonists differentially affect A9 and A10 dopamine cells in the rat.* Eur J Pharmacol, **213**, 165-6, 1992.
- Page, N.M., Woods, R.J., Gardiner, S.M., Lomthaisong, K., Gladwell, R.T., Butlin, D.J., Manyonda, I.T. & Lowry, P.J.** *Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia.* Nature, **405**, 797-800, 2000.
- Page, R.B.** *The anatomy of the hypothalamo-hypophysial.* In *The physiology of reproduction.* ed N.J.D., E.K. pp. 1527-1619. New York: Raven press, 1994.
- Palkovits, M. & Zaborszky, L.** *Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arc.* In *Hypertension and brain mechanisms, Progress in Brain Research.* ed W. De Jong, A.P.P.P.S. pp. 9-34, 1977.
- Palma, C., Goso, C. & Manzini, S.** *Different susceptibility to neurokinin 1 receptor antagonists of substance P and septide-induced interleukin-6 release from U373 MG human astrocytoma cell line.* Neurosci Lett, **171**, 221-4, 1994.
- Panneton, W.M. & Loewy, A.D.** *Projections of the carotid sinus nerve to the nucleus of the solitary tract in the cat.* Brain Res, **191**, 239-44, 1980.

**Parissis, J.T., Korovesis, S., Giazitzoglou, E., Kalivas, P. & Katritsis, D.**

*Plasma profiles of peripheral monocyte-related inflammatory markers in patients with arterial hypertension. Correlations with plasma endothelin-1.* Int J Cardiol, **83**, 13-21, 2002.

**Paxinos, G. & Watson, C.** *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Toronto, Canada: Academic Press, 1986.

**Pelletier, G., Steinbusch, H.W. & Verhofstad, A.A.** *Immunoreactive substance P and serotonin present in the same dense-core vesicles.* Nature, **293**, 71-2, 1981.

**Perfumi, M., Sajia, A., Costa, G., Massi, M. & Polidori, C.** *Vasopressin release induced by intracranial injection of eledoisin is mediated by central angiotensin II.* Pharmacol Res Commun, **20**, 811-26, 1988.

**Perhach, J.L., Jr., Ferguson, H.C. & McKinney, G.R.** (1975). *Evaluation of antihypertensive agents in the stress-induced hypertensive rat.* Life Sci, **16**, 1731-6, 1975.

**Pernow, B.** *Studies on substance P. Purification, occurrence and biological actions.* Acta Physiol Scand, **suppl. 29**, 105, 1953.

**Pernow, B.** *Substance P.* Pharmacol Rev, **35**, 85-141, 1983.

**Peters, A., Palay, S.L. & Webster, H.D.** *The fine structure of the nervous system.* In: *Neurons and their supporting cells.*, 3e Édition, pp. 494., Oxford University Press, New York, 1991.

**Petersson, M., Alster, P., Lundeberg, T. & Uvnas-Moberg, K.** *Oxytocin causes a long-term decrease of blood pressure in female and male rats.* Physiol Behav, **60**, 1311-5, 1996.

- Petersson, M., Lundeberg, T. & Uvnas-Moberg, K.** *Oxytocin decreases blood pressure in male but not in female spontaneously hypertensive rats.* J Auton Nerv Syst, **66**, 15-8, 1997.
- Petersson, M.** *Cardiovascular effects of oxytocin.* Prog Brain Res, **139**, 281-8, 2002.
- Petit, F., Saffroy, M., Torrens, Y., Lavielle, S., Chassaing, G., Loeuillet, D., Glowinski, J. & Beaujouan, J.C.** *Possible existence of a new tachykinin receptor subtype in the guinea pig ileum.* Peptides, **13**, 383-8, 1992.
- Petty, M. & Reid, J.** *The cardiovascular effects of centrally administered substance P in the anaesthetised rabbit.* Eur J Pharmacol, **82**, 9-14, 1982.
- Phillips, M. I. & Kagiya, S.** *Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator.* Curr Opin Investig Drugs, **3**, 569-577, 2002.
- Phillip, A.** *Regulation of blood pressure by central neurotransmitters and neuropeptides.* Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., **111**, 1-115, 1988.
- Picard, P., Regoli, D. & Couture, R.** *Cardiovascular and behavioural effects of centrally administered tachykinins in the rat: characterization of receptors with selective antagonists.* Br J Pharmacol, **112**, 240-9, 1994.
- Picard, P., Chretien, L. & Couture, R.** *Functional interaction between losartan and central tachykinin NK3 receptors in the conscious rat.* Br. J. Pharmacol., **114**, 1563-1570, 1995.
- Pickel, V.M., Joh, T.H., Reis, D.J., Leeman, S.E. & Miller, R.J.** *Electron microscopic localization of substance P and enkephalin in axon terminals related to dendrites of catecholaminergic neurons.* Brain Res, **160**, 387-400, 1979.

**Plante, G.E.** *Traitement sans bogue de l'hypertension artérielle au nouveau millénaire.* Médecine/Sciences, **16**, 14-17, 2000.

**Polidori, C., Saija, A., Perfumi, M., Costa, G., de Caro, G. & Massi, M.** *Vasopressin release induced by intracranial injection of tachykinins is due to activation of central neurokinin-3 receptors.* Neurosci Lett, **103**, 320-5, 1989.

**Powell, D., Leeman, S., Tregear, G.W., Niall, H.D. & Potts, J.T., Jr.** *Radioimmunoassay for substance P.* Nat New Biol, **241**, 252-4, 1973.

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

**Putney, J.W., Jr.** *Muscarinic, alpha-adrenergic and peptide receptors regulate the same calcium influx sites in the parotid gland.* J Physiol, **268**, 139-49, 1977.

**Quartara, L. & Maggi, C.A.** *The tachykinin NK1 receptor. Part II: Distribution and pathophysiological roles.* Neuropeptides, **32**, 1-49, 1998.

**Quigley, B.J., Jr. & Kowall, N.W.** *Substance P-like immunoreactive neurons are depleted in Alzheimer's disease cerebral cortex.* Neuroscience, **41**, 41-60, 1991.

**Quirion, R., Shults, C.W., Moody, T.W., Pert, C.B., Chase, T.N. & O'Donohue, T.L.** *Autoradiographic distribution of substance P receptors in rat central nervous system.* Nature, **303**, 714-6, 1983.

**Regoli, D., Nantel, F., Tousignant, C., Jukic, D., Rouissi, N., Rhaleb, N.E., Telemaque, S., Drapeau, G. & d'Orleans-Juste, P.** *Neurokinin agonists and antagonists.* Ann N Y Acad Sci, **632**, 170-83, 1991.

- Regoli, D., Boudon, A. & Fauchere, J.L.** *Receptors and antagonists for substance P and related peptides.* Pharmacol Rev, **46**, 551-99, 1994.
- Reid, M.S., Herrera-Marschitz, M., Hokfelt, T., Lindfors, N., Persson, H. & Ungerstedt, U.** *Striatonigral GABA, dynorphin, substance P and neurokinin A modulation of nigrostriatal dopamine release: evidence for direct regulatory mechanisms.* Exp Brain Res, **82**, 293-303, 1990.
- Reiner, A. & Anderson, K.D.** *The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusions based on recent findings.* Brain Res Brain Res Rev, **15**, 251-65, 1990.
- Reubi, J.C., Emson, P.C., Jessell, T.M. & Iversen, L.L.** *Effects of GABA, dopamine, and substance P on the release of newly synthesized 3H-5-hydroxytryptamine from rat substantia nigra in vitro.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, **304**, 271-5, 1978.
- Reynoldson, J.A., Head, G.A. & Korner, P.I.** *Effect of 6-hydroxydopamine on blood pressure and heart rate responses to intracisternal clonidine in conscious rabbits.* Eur J Pharmacol, **55**, 257-62, 1979.
- Ribeiro-da-Silva, A., McLeod, A.L. & Krause, J.E.** *Neurokinin receptors in the CNS.* In Handbook of Chemical Neuroanatomy. ed R. Quirion, B., A. & Hokfelt, T. pp. 195-240. Amsterdam: Elsevier Science, 2000.
- Richfield, E. K., Vonsattel, J. P., MacDonald, M. E., Sun, Z., Deng, Y. P. & Reiner, A.** *Selective loss of striatal preprotachykinin neurons in a phenocopy of Huntington's disease.* Mov Disord, **17**, 327-332, 2002.

- Roccon, A., Marchionni, D., Nisato, D.** *Study of SR 142801, a new potent non-peptide NK-3 receptor antagonist on cardiovascular responses in conscious guinea-pig.* Br J Pharmacol, **118**, 1095-1102, 1996.
- Rosell, S., Olgart, L., Gazelius, B., Panopoulos, P., Folkers, K. & Horig, J.** *Inhibition of antidromic and substance P-induced vasodilatation by a substance P antagonist.* Acta Physiol Scand, **111**, 381-2, 1981.
- Rosen, A., Brodin, K., Eneroth, P. & Brodin, E.** *Short-term restraint stress and s.c. saline injection alter the tissue levels of substance P and cholecystokinin in the peri-aqueductal grey and limbic regions of rat brain.* Acta Physiol Scand, **146**, 341-8, 1992.
- Rossier, J., Battenberg, E., Pittman, Q., Bayon, A., Koda, L., Miller, R., Guillemin, R. & Bloom, F.** *Hypothalamic enkephalin neurones may regulate the neurohypophysis.* Nature, **277**, 653-5, 1979.
- Rupniak, N. M., Carlson, E. C., Harrison, T., Oates, B., Seward, E., Owen, S., de Felipe, C., Hunt, S. & Wheeldon, A.** *Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK(1)) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice.* Neuropharmacology, **39**, 1413-1421, 2000.
- Rupniak, N.M.J.** *New insights into the antidepressant actions of substance P (NK1 receptor) antagonists.* Can J Physiol Pharmacol, **80**, 489-494, 2002.
- Saffroy, M., Beaujouan, J.C., Torrens, Y., Besseyre, J., Bergstrom, L. & Glowinski, J.** *Localization of tachykinin binding sites (NK1, NK2, NK3 ligands) in the rat brain.* Peptides, **9**, 227-41, 1988.

- Saha, S., Batten, T.F. & McWilliam, P.N.** *Glutamate, gamma-aminobutyric acid and tachykinin-immunoreactive synapses in the cat nucleus tractus solitarii.* J Neurocytol, **24**, 55-74, 1995.
- Saigo, A., Takano, Y., Saito, R., Nakayama, Y., Honda, K. & Kamiya, H.** *Role of NK-1 receptor in central cardiovascular regulation in rats: studies on a novel non-peptide antagonist, CP-96,345, of substance P NK-1 receptor.* Regul Pept, **46**, 293-6, 1993.
- Salin, P., Hajji, M.D. & Kerkerian-le Goff, L.** *Bilateral 6-hydroxydopamine-induced lesion of the nigrostriatal dopamine pathway reproduces the effects of unilateral lesion on substance P but not on enkephalin expression in rat basal ganglia.* Eur J Neurosci, **8**, 1746-57, 1996.
- Samson, W.K. & Mogg, R.J.** *Oxytocin as part of stress responses.* Curr. Top. Neuroendocrinol., **10**, 33-60, 1990.
- Sar, M., Stumpf, W.E., Miller, R.J., Chang, K.J. & Cuatrecasas, P.** *Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord.* J Comp Neurol, **182**, 17-37, 1978.
- Sarau, H.M., Griswold, D.E., Bush, B., Potts, W., Sandhu, P., Lundberg, D., Foley, J.J., Schmidt, D.B., Webb, E.F., Martin, L.D., Legos, J.J., Whitmore, R.G., Barone, F.C., Medhurst, A.D., Luttmann, M.A., Giardina, G.A. & Hay, D.W.** *Nonpeptide tachykinin receptor antagonists. II. Pharmacological and pharmacokinetic profile of SB-222200, a central nervous system penetrant, potent and selective NK-3 receptor antagonist.* J Pharmacol Exp Ther, **295**, 373-81, 2000.

- Sasai, Y. & Nakanishi, S. *Molecular characterization of rat substance K receptor and its mRNAs*. *Biochem Biophys Res Commun*, **165**, 695-702, 1989.
- Sasek, C.A., Wessendorf, M.W. & Helke, C.J. *Evidence for co-existence of thyrotropin-releasing hormone, substance P and serotonin in ventral medullary neurons that project to the intermediolateral cell column in the rat*. *Neuroscience*, **35**, 105-19, 1990.
- Sawchenko, P.E. & Swanson, L.W. *Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat*. *J Comp Neurol*, **205**, 260-72, 1982a.
- Sawchenko, P.E. & Swanson, L.W. *The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat*. *Brain Res*, **257**, 275-325, 1982b.
- Schiffmann, S.N. & Vanderhaeghen, J.-J. *Implications de l'adénosine dans les noyaux de la base: interactions avec le système dopaminergique*. *Médecine/Sciences*, **11**, 169-176, 1995.
- Schmidt, A.W., McLean, S. & Heym, J. *The substance P receptor antagonist CP-96,345 interacts with Ca<sup>2+</sup> channels*. *Eur J Pharmacol*, **219**, 491-2, 1992.
- Schneider, B., Ganten, D., Lang, R. E. & Unger, T. *The central pressor actions of substance P are inhibited by GABA*. *Eur. J. Pharmacol.*, **131**, 31-37, 1986.
- Schoborg, R.V., Hoover, D.B., Tompkins, J.D. & Hancock, J.C. *Increased ganglionic responses to substance P in hypertensive rats due to upregulation of NK(1) receptors*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **279**, R1685-94, 2000.

- Scott Young III, W., Bonner, T.I. & Brann, M.R.** *Mesencephalic dopamine neurons regulate the expression of neuropeptide mRNAs in the rat forebrain.* Proc Natl Acad Sci U S A, **83**, 9827-31, 1986.
- Seabrook, G.R., Bowery, B.J. & Hill, R.G.** *Pharmacology of tachykinin receptors on neurones in the ventral tegmental area of rat brain slices.* Eur J Pharmacol, **273**, 113-9, 1995.
- Shigematsu, K., Niwa, M. & Saavedra, J.M.** *Increased density of substance P binding sites in specific brainstem nuclei of spontaneously hypertensive rats.* Brain Res, **370**, 383-7, 1986.
- Shigemoto, R., Yokota, Y., Tsuchida, K. & Nakanishi, S.** *Cloning and expression of a rat neuromedin K receptor cDNA.* J Biol Chem, **265**, 623-8, 1990.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V. & Merchenthaler, I.** *In situ hybridization analysis of the distribution of neurokinin-3 mRNA in the rat central nervous system.* J Comp Neurol, **372**, 395-414, 1996.
- Shults, C.W., Quirion, R., Chronwall, B., Chase, T.N. & O'Donohue, T.L.** *A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system.* Peptides, **5**, 1097-128, 1984.
- Siegel, R.A., Duker, E.M., Pahnke, U. & Wuttke, W.** *Stress-induced changes in cholecystokinin and substance P concentrations in discrete regions of the rat hypothalamus.* Neuroendocrinology, **46**, 75-81, 1987.
- Sivam, S.P., Breese, G.R., Krause, J.E., Napier, T.C., Mueller, R.A. & Hong, J.S.** *Neonatal and adult 6-hydroxydopamine-induced lesions differentially alter tachykinin and enkephalin gene expression.* J Neurochem, **49**, 1623-33, 1987.

- Sivam, S.P. & Krause, J.E.** *Tachykinin systems in the spinal cord and basal ganglia: influence of neonatal capsaicin treatment or dopaminergic intervention on levels of peptides, substance P-encoding mRNAs, and substance P receptor mRNA.* J Neurochem, **59**, 2278-84, 1992.
- Sivam, S.P.** *Dopaminergic regulation of striatonigral tachykinin and dynorphin gene expression: a study with the dopamine uptake inhibitor GBR-12909.* Brain Res Mol Brain Res, **35**, 197-210, 1996.
- Sloviter, R.S.** *Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy.* Science, **235**, 73-6, 1987.
- Sloviter, R.S.** *On the relationship between neuropathology and pathophysiology in the epileptic hippocampus of humans and experimental animals.* Hippocampus, **4**, 250-3, 1994.
- Smith, M.E. & Flynn, F.W.** *Distribution of Fos-like immunoreactivity within the rat brain following intraventricular injection of the selective NK(3) receptor agonist senktide.* J Comp Neurol, **426**, 413-28, 2000.
- Smith, O.A., Astley, C.A., DeVito, J.L., Stein, J.M. & Walsh, K.E.** *Functional analysis of hypothalamic control of the cardiovascular responses accompanying emotional behavior.* Fed Proc, **39**, 2487-94, 1980.
- Snider, R.M., Constantine, J.W., Lowe, J.A., 3rd, Longo, K.P., Lebel, W.S., Woody, H.A., Drozda, S.E., Desai, M.C., Vinick, F.J., Spencer, R.W.** *A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK1) receptor.* Science, **251**, 435-7, 1991a.

- Snider, R.M., Longo, K.P., Drozda, S.E., Lowe, J.A., 3rd & Leeman, S.E. *Effect of CP-96,345, a nonpeptide substance P receptor antagonist, on salivation in rats.* Proc Natl Acad Sci U S A, **88**, 10042-4, 1991b.
- Somogyi, P., Priestley, J.V., Cuello, A.C., Smith, A.D. & Bolam, J.P. *Synaptic connections of substance P-immunoreactive nerve terminals in the substantia nigra of the rat. A correlated light- and electron-microscopic study.* Cell Tissue Res, **223**, 469-86, 1982.
- Spitznagel, H., Baulmann, J., Blume, A., Unger, T. & Culman, J. *C-FOS expression in the rat brain in response to substance P and neurokinin B.* Brain Res, **916**, 11-21, 2001.
- Steinberg, R., Rodier, D., Souilhac, J., Bougault, I., Emonds-Alt, X., Soubrie, P. & Le Fur, G. *Pharmacological characterization of tachykinin receptors controlling acetylcholine release from rat striatum: an in vivo microdialysis study.* J Neurochem, **65**, 2543-8, 1995.
- Stern, P. & Milin, R. *Tranquilizing effect of substance P.* Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **101**, 298-299, 1959.
- Stoessl, A.J., Dourish, C.T. & Iversen, S.D. *The NK-3 tachykinin receptor agonist senktide elicits 5-HT-mediated behaviour following central or peripheral administration in mice and rats.* Br J Pharmacol, **94**, 285-7, 1988.
- Stoessl, A.J. & Hill, D.R. *Autoradiographic visualization of NK-3 tachykinin binding sites in the rat brain, utilizing [3H]senktide.* Brain Res, **534**, 1-7, 1990.
- Stoessl, A.J., Polanski, E. & Frydryszak, H. *Effects of ageing on tachykinin function in the basal ganglia.* Brain Res, **632**, 21-8, 1993.

- Stoessl, A.J.** *Localization of striatal and nigral tachykinin receptors in the rat.* Brain Res, **646**, 13-8, 1994.
- Stoessl, A.J., Brackstone, M., Rajakumar, N. & Gibson, C.J.** *Pharmacological characterization of grooming induced by a selective NK-1 tachykinin receptor agonist.* Brain Res, **700**, 115-20, 1995.
- Stratton, S.C., Beresford, I.J., Harvey, F.J., Turpin, M.P., Hagan, R.M. & Tyers, M.B.** *Anxiolytic activity of tachykinin NK2 receptor antagonists in the mouse light-dark box.* Eur J Pharmacol, **250**, R11-2, 1993.
- Stratton, S. C., Beresford, I.J.M. & Hagan, R.M.** *Autoradiographic localization of tachykinin NK-2 receptors in adult rat brain using [<sup>3</sup>H]SR48968.* Br. J. Pharmacol., **117**, 295P, 1996.
- Sugiya, H., Obie, J.F. & Putney, J.W., Jr.** *Two modes of regulation of the phospholipase C-linked substance-P receptor in rat parotid acinar cells.* Biochem J, **253**, 459-66, 1988.
- Suzuki, N., Hardebo, J.E. & Owman, C.** *Origins and pathways of cerebrovascular nerves storing substance P and calcitonin gene-related peptide in rat.* Neuroscience, **31**, 427-38, 1989.
- Swain, C. J.** *Neurokinin receptor antagonists.* Prog Med Chem, **35**, 57-81, 1998.
- Swanson, L. W. & Sawchenko, P. E.** *Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms.* Neuroendocrinology, **31**, 410-417, 1980.
- Swanson, L.W. & Sawchenko, P.E.** *Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei.* Annu Rev Neurosci, **6**, 269-324, 1983.

- Sykes, R.M., Spyer, K.M. & Izzo, P.N. *Central distribution of substance P, calcitonin gene-related peptide and 5-hydroxytryptamine in vagal sensory afferents in the rat dorsal medulla.* Neuroscience, **59**, 195-210, 1994.
- Takano, Y., Nagashima, A., Hagio, T., Tateishi, K. & Kamiya, H. *Role of central tachykinin peptides in cardiovascular regulation in rats.* Brain Res, **528**, 231-7, 1990.
- Takano, Y., Nagashima, A., Hagio, T., Nakayama, Y. & Kamiya, H. *Tachykinin receptor subtype. Central cardiovascular regulation of tachykinin peptides.* Ann N Y Acad Sci, **632**, 476-8, 1991.
- Takano, Y., Nakayama, Y., Tateishi, K., Saito, R. & Kamiya, H. *Role of NK-1 receptor in central cardiovascular regulation in rats: studies on a novel non-peptide antagonist, CP-96,345, of substance P NK-1 receptor.* Neurosci Lett, **139**, 122-5, 1992.
- Talman, W.T. & Reis, D.J. *Baroreflex actions of substance P microinjected into the nucleus tractus solitarii in rat: a consequence of local distortion.* Brain Res, **220**, 402-7, 1981.
- Tamiya, R., Hanada, M., Kawai, Y., Inagaki, S. & Takagi, H. *Substance P afferents have synaptic contacts with dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the rat.* Neurosci Lett, **110**, 11-5, 1990.
- Tateishi, K., Matsuoka, Y. & Hamaoka, T. *Establishment of highly specific radioimmunoassays for neurokinin A and neurokinin B and determination of tissue distribution of these peptides in rat central nervous system.* Regul Pept, **24**, 245-57, 1989.

- Tattersall, F.D., Rycroft, W., Hargreaves, R.J. & Hill, R.G.** *The tachykinin NK1 receptor antagonist CP-99,994 attenuates cisplatin induced emesis in the ferret.* Eur J Pharmacol, **250**, R5-6, 1993.
- Teixeira, R.M., Santos, A.R., Ribeiro, S.J., Calixto, J.B., Rae, G.A. & De Lima, T.C.** *Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice.* Eur J Pharmacol, **311**, 7-14, 1996.
- Tenovuo, O., Rinne, U.K. & Viljanen, M.K.** *Substance P immunoreactivity in the post-mortem parkinsonian brain.* Brain Res, **303**, 113-6, 1984.
- Tomlinson, K.C., Gardiner, S.M. & Bennett, T.** *Central effects of substance P and somatostatin in conscious, streptozotocin-treated rats.* Am J Physiol, **259**, R405-10, 1990.
- Tooney, P. A., Crawter, V. C. & Chahl, L. A.** *Increased tachykinin NK(1) receptor immunoreactivity in the prefrontal cortex in schizophrenia.* Biol Psychiatry, **49**, 523-527, 2001.
- Torrens, Y., Beaujouan, J.C., Besson, M.J., Michelot, R. & Glowinski, J.** *Inhibitory effects of GABA, L-glutamic acid and nicotine on the potassium-evoked release of substance P in substantia nigra slices of the rat.* Eur J Pharmacol, **71**, 383-92, 1981.
- Torrens, Y., Beaujouan, J. C., Saffroy, M. & Glowinski, J.** *Involvement of septide-sensitive tachykinin receptors in inositol phospholipid hydrolysis in the rat urinary bladder.* Peptides, **16**, 587-594, 1995.

**Traczyk, W.Z. & Kubicki, J.** *The pressor response to substance P and hexapeptide [pGlu6]SP 6--11 injections into the cerebral ventricles in rats.* Neuropharmacology, **19**, 607-11, 1980.

**Tremblay, L., Kemel, M.L., Desban, M., Gauchy, C. & Glowinski, J.** *Distinct presynaptic control of dopamine release in striosomal- and matrix-enriched areas of the rat striatum by selective agonists of NK1, NK2, and NK3 tachykinin receptors.* Proc Natl Acad Sci U S A, **89**, 11214-8, 1992.

**Triepel, J., Weindl, A., Kiemle, I., Mader, J., Volz, H.P., Reinecke, M. & Forssmann, W.G.** *Substance P-immunoreactive neurons in the brainstem of the cat related to cardiovascular centers.* Cell Tissue Res, **241**, 31-41, 1985.

**Trimarchi, G.R., Glisson, W.C., Thomson, W.M., VanLingen, J. & Buccafusco, J.J.** *Cholinergic neurons and the cardiovascular response produced by central injection of substance P in the normotensive rat.* Life Sci, **39**, 1579-88, 1986.

**Trulson, M.E. & Himmel, C.D.** *Effects of insulin and streptozotocin-induced diabetes on brain norepinephrine metabolism in rats.* J Neurochem, **44**, 1873-6, 1985.

**Tschope, C., Picard, P., Culmann, J., Prat, A., Itoi, K., Regoli, D., Unger, T. & Couture, R.** *Use of selective antagonists to dissociate the central cardiovascular and behavioural effects of tachykinins on NK1 and NK2 receptors in the rat.* Br J Pharmacol, **107**, 750-5, 1992.

**Tschope, C., Jost, N., Unger, T. & Culman, J.** *Central cardiovascular and behavioral effects of carboxy- and amino-terminal fragments of substance P in conscious rats.* Brain Res, **690**, 15-24, 1995.

- Tsuchida, K., Shigemoto, R., Yokota, Y. & Nakanishi, S.** *Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors.* Eur J Biochem, **193**, 751-7, 1990.
- Unger, T., Rockhold, R.W., Yukimura, T., Rettig, R. & Ganten, D.** *Blood pressure and heart rate responses to centrally administered substance P are increased in spontaneously hypertensive rats.* Clin Sci (Lond), **59 Suppl 6**, 299s-302s, 1980.
- Unger, T., Rascher, W., Schuster, C., Pavlovitch, R., Schomig, A., Dietz, R. & Ganten, D.** *Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II: role of the sympathetic nervous system and vasopressin.* Eur J Pharmacol, **71**, 33-42, 1981.
- Unger, T., Becker, H., Petty, M., Demmert, G., Schneider, B., Ganten, D. & Lang, R.E.** *Differential effects of central angiotensin II and substance P on sympathetic nerve activity in conscious rats. Implications for cardiovascular adaptation to behavioral responses.* Circ Res, **56**, 563-75, 1985.
- Unger, T., Carolus, S., Demmert, G., Ganten, D., Lang, R.E., Maser-Gluth, C., Steinberg, H. & Veelken, R.** *Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization.* Circ Res, **63**, 812-20, 1988.
- U'Prichard, D.C., Greenberg, D.A. & Snyder, S.H.** *Binding characteristics of a radiolabeled agonist and antagonist at central nervous system alpha noradrenergic receptors.* Mol Pharmacol, **13**, 454-73, 1977.
- van den Buuse, M., Versteeg, D.H. & de Jong, W.** *Brain dopamine depletion by lesions in the substantia nigra attenuates the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat.* Brain Res, **368**, 69-78, 1986.

**van den Buuse, M., Linthorst, A.C., Versteeg, D.H. & de Jong, W.** *Role of brain dopamine systems in the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat.* Clin Exp Hypertens A, **13**, 653-9, 1991.

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

**van Giersbergen, P.L., Palkovits, M. & De Jong, W.** *Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation.* Physiol Rev, **72**, 789-824, 1992.

**van Tol, H.H., van den Buuse, M., de Jong, W. & Burbach, J.P.** *Vasopressin and oxytocin gene expression in the supraoptic and paraventricular nucleus of the spontaneously hypertensive rat (SHR) during development of hypertension.* Brain Res, **464**, 303-11, 1988.

**Vander, A.J., Sherman, J.H. & Luciano, D.S.** *Physiologie humaine.* Montréal: Chenelière/McGraw-Hill, 1995.

**Vassout, A., Veenstra, S., Hauser, K., Ofner, S., Brugger, F., Schilling, W. & Gentsch, C.** *NKP608: a selective NK-1 receptor antagonist with anxiolytic-like effects in the social interaction and social exploration test in rats.* Regul. Pept., **96**, 7-16, 2000.

- Viger, A., Beaujouan, J.C., Torrens, Y. & Glowinski, J.** *Specific binding of a I-substance P derivatives to rat brain synaptosomes.* J. Neurochem., **40**, 1030-1039, 1983.
- Vincent, S., Hokfelt, T., Christensson, I. & Terenius, L.** *Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striato-nigral pathway.* Eur J Pharmacol, **85**, 251-2, 1982.
- von Euler, U.S. & Gaddum, J.H.** *An unidentified depressor substance in certain tissue extracts.* J. Physiol. (London), **72**, 74-87, 1931.
- von Euler, U.S. & Pernow, B.** *Effects of intraventricular administration of substance P.* Nature, **174**, 184, 1954.
- von Euler, U.S. & Pernow, B.** *Neurotropic effects of substance P.* Acta Physiol Scand., **36**, 265, 1956.
- Wade, T. V. & Schneider, J. S.** *Expression of striatal preprotachykinin mRNA in symptomatic and asymptomatic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-exposed monkeys is related to parkinsonian motor signs.* J. Neurosci., **21**, 4901-4907, 2001.
- Wali, F.A.** *The effect of substance P on the mechanical and electrical responses of frog, chick and rat skeletal muscle.* Pharmacol Res Commun, **17**, 137-47, 1985.
- Walsh, D.M., Stratton, S.C., Harvey, F.J., Beresford, I.J. & Hagan, R.M.** *The anxiolytic-like activity of GR159897, a non-peptide NK2 receptor antagonist, in rodent and primate models of anxiety.* Psychopharmacology (Berl), **121**, 186-91, 1995.

- Warden, M.K. & Scott Young III, W.** *Distribution of cells containing mRNAs encoding substance P and neurokinin B in the rat central nervous system.* J Comp Neurol, **272**, 90-113, 1988.
- Watson, J.W., Gonsalves, S.F., Fossa, A.A., McLean, S., Seeger, T., Obach, S. & Andrews, P.L.** *The anti-emetic effects of CP-99,994 in the ferret and the dog: role of the NK1 receptor.* Br J Pharmacol, **115**, 84-94, 1995.
- Weiss, S.J., McKinney, J.S. & Putney, J.W., Jr.** *Receptor-mediated net breakdown of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in parotid acinar cells.* Biochem J, **206**, 555-60, 1982.
- Whitty, C.J., Walker, P.D., Goebel, D.J., Poosch, M.S. & Bannon, M.J.** *Quantitation, cellular localization and regulation of neurokinin receptor gene expression within the rat substantia nigra.* Neuroscience, **64**, 419-25, 1995.
- Williams, B.J., Curtis, N.R., McKnight, A.T., Maguire, J., Foster, A. & Tridgett, R.** *Development of NK-2 selective antagonist.* Reg. Pept., **22**, 189, 1988.
- Wormser, U., Laufer, R., Hart, Y., Chorev, M., Gilon, C. & Selinger, Z.** *Highly selective agonists for substance P receptor subtypes.* Embo J, **5**, 2805-8, 1986.
- Wu, J.S., Ku, Y.H., Li, L.S., Lu, Y.C., Ding, X. & Wang, Y.G.** *Corticotropin releasing factor and substance P mediate the nucleus amygdaloideus centralis-nucleus ventromedialis-nucleus dorsomedialis pressor system.* Brain Res, **842**, 392-8, 1999.
- Yamazoe, M., Shiosaka, S., Shibasaki, T., Ling, N., Tateishi, K., Hashimura, E., Hamaoka, T., Kimmel, J.R., Matsuo, H. & Tohyama, M.** *Distribution of six*

*neuropeptides in the nucleus tractus solitarii of the rat: an immunohistochemical analysis.* Neuroscience, **13**, 1243-66, 1984.

**Yardley, C.P. & Hilton, S.M.** *The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defence reaction are elicited in the rat.* J Auton Nerv Syst, **15**, 227-44, 1986.

**Yeomans, D.C. & Proudfit, H.K.** *Projections of substance P-immunoreactive neurons located in the ventromedial medulla to the A7 noradrenergic nucleus of the rat demonstrated using retrograde tracing combined with immunocytochemistry.* Brain Res, **532**, 329-32, 1990.

**Yip, J. & Chahl, L.A.** *Localization of NK1 and NK3 receptors in guinea-pig brain.* Regul Pept, **98**, 55-62, 2001.

**Yokota, Y., Sasai, Y., Tanaka, K., Fujiwara, T., Tsuchida, K., Shigemoto, R., Kakizuka, A., Ohkubo, H. & Nakanishi, S.** *Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor.* J Biol Chem, **264**, 17649-52, 1989.

**Yu, J., Cadet, J. L. & Angulo, J. A.** (2002). *Neurokinin-1 (NK-1) receptor antagonists abrogate methamphetamine-induced striatal dopaminergic neurotoxicity in the murine brain.* J. Neurochem., **83**, 613-622, 2002.

**Yuan, Y.D. & Couture, R.** *Renal effects of intracerebroventricularly injected tachykinins in the conscious saline-loaded rat: receptor characterization.* Br J Pharmacol, **120**, 785-96, 1997.

**Zerari, F., Dion, S., Karpitskiy, V., Krause, J. & Couture, R.** *Immunocytochemical localization of tachykinin NK-2 receptors (NK-2R) in the rat central nervous system (CNS).* In Peptide Receptors, an International

multidisciplinary Symposium. pp. Abstract book, p.39. Montréal, Québec, Canada, 1996.

Zerari, F., Karpitskiy, V., Krause, J., Descarries, L. & Couture, R. *Astroglial distribution of neurokinin-2 receptor immunoreactivity in the rat spinal cord*. Neuroscience, **84**, 1233-1246, 1998.

Zernig, G., Dietrich, H., Maggi, C.A. & Saria, A. *The substance P (NK1) receptor antagonist (+/-)-CP-96,345 causes sedation and motor impairment in Swiss albino mice in the black-and-white box behavioral paradigm*. Neurosci Lett, **143**, 169-72, 1992.

Zetler, G. & Schlosser, L. *Substanz P im zentralnervensystem des rindes*. Naturwissenschaften, **40**, 559-560, 1953.

Zetler, G.S., L. *Substanz P im Gehirn des Menschen*. Naturwissenschaften, **41**, 46, 1954.

Zetler, G. *Substanz P, ein polypeptid aus darm und gehirn mit depressiven, hyperalgetischen und morphin-antagonistischen wirkungen auf das zentralnervensystem*. Arch. Exp. Path. Pharmak., **228**, 513-538, 1956.

Zhou, Q., Liu, Z., Ray, A., Huang, W., Karlsson, K. & Nyberg, F. *Alteration in the brain content of substance P (1-7) during withdrawal in morphine-dependent rats*. Neuropharmacology, **37**, 1545-1552, 1998.

P.02

RECEIVED FROM: 514 343 2111

21-02-03 16:46

February 21th, 2003

Anna Muir  
 Office Manager  
 BJP Editorial Office  
 16 Angel Gate  
 326 City Road  
 London  
 EC1V 2SG  
 Ph: +44 (0) 207 417 0431  
 Fax: +44 (0) 207 417 0430  
 Email: [gam@bjp.ac.uk](mailto:gam@bjp.ac.uk)

NATURE PUBLISHING GROUP granted permission for reproduction of the attached material with the following conditions:

- a) the source of the materials be acknowledged by a full reference to the original article
- b) permission to reproduce the material is obtained (as far as possible) from the author(s) of the original article(s)

Date 24/2/03

TRACE WILDASH, Rights and Reprints Manager  
 NATURE PUBLISHING GROUP  
 Brunel Road, Houndmills, Basingstoke RG21 6XS UK  
 Tel: +44 (0) 329242 Fax: +44 (0) 1256 810528

Dear Mrs. Muir,

My name is Andrée Lessard, I am a Ph.D. student in Physiology at Université de Montréal (supervisor: Dr. Réjean Couture). One of my papers have been published in the BJP and I would like to include it into my Ph.D. thesis. Thus, I need your authorization by a signature. Here is the paper:

Lessard A., Campos M.M., Neugebauer W. and Couture, R. : Implication of nigral tachykinin NK<sub>3</sub> receptors in the maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats: A pharmacological and autoradiographic study. Br. J. Pharmacol., 138 : 554-563, 2003.

Thank you for your assistance.

Best regards,

  
 Andrée Lessard

Deuxième article (soumis, Br. J. Pharmacol.)

**Lessard A., Campos M.M., Neugebauer W. and Couture, R. :** *Implication of nigral tachykinin NK<sub>3</sub> receptors in the maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats: A pharmacological and autoradiographic study.*  
Soumis au Br. J. Pharmacol., juillet 2002.

Objectif :

Évaluer la contribution des tachykinines endogènes de la substance noire dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le rat spontanément hypertendu.

Techniques :

Mesure des changements de pression artérielle et de fréquence cardiaque suite à l'administration bilatérale, dans les deux noyaux de la substance noire, d'agonistes et d'antagonistes des tachykinines chez le rat spontanément hypertendu (SHR) et son contrôle Wistar-Kyoto (WKY).

Étude neuroanatomique en autoradiographie des récepteurs NK-3 dans quatre noyaux du mésencéphale (substance noire, aire ventrale tegmentaire, amygdale, hippocampe) chez le SHR et WKY. Distribution et quantification des récepteurs sur des coupes du mésencéphale des SHR et WKY.

Contribution de l'auteur Andrée Lessard :

La totalité des expériences, l'analyse des résultats et la rédaction de l'article (sous la supervision du Dr. Réjean Couture) ont été accomplies par Andrée Lessard. L'étude de liaison en autoradiographie a été réalisée par Andrée Lessard avec l'aide de la stagiaire post-doctorale Maria Martha Campos. La synthèse du ligand [<sup>125</sup>I]-HPP-Senkide a été effectuée par le Dr. Witold Neugebauer, professeur affilié au Département de Pharmacologie de l'Université de Sherbrooke.

Andrée Lessard \_\_\_\_\_

Maria Martha Campos 

Witold Neugebauer 

Réjean Couture \_\_\_\_\_

**Troisième article (en révision)**

**Lessard A.,** Laurin M., Yamaguchi N., Bichet D. and Couture R. : *Tachykinin NK-3 receptor antagonists control high blood pressure in hypertensive rats.*  
Hypertension, en révision.

**Objectif:**

Évaluer la contribution des récepteurs NK-3 des tachykinines du système nerveux central dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le rat spontanément hypertendu.

**Techniques :**

Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque suite à l'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) d'antagonistes sélectifs aux récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3 des tachykinines (et d'un énantiomère inactif d'un antagoniste des récepteurs NK-3 des tachykinines) chez le SHR et son contrôle WKY. Cette partie a été complétée par moi, Andrée Lessard et l'étudiante à la Maîtrise Marlène Laurin.

Étude du mécanisme d'action de l'effet anti-hypertenseur suite à l'injection i.c.v. d'un antagoniste NK-3 des tachykinines chez le SHR. Mesure des taux plasmatiques des catécholamines (adrénaïne, noradrénaïne, dopamine) et de l'hormone vasopressine avant et après injection i.c.v. d'un antagoniste NK-3 des tachykinines chez le SHR. Les dosages plasmatiques des catécholamines ont été effectués au laboratoire du Dr. Nabu Yamaguchi de l'Université de Montréal. Les dosages plasmatiques de l'hormone vasopressine ont été effectués au laboratoire du Dr. Daniel Bichet à l'Hôpital Sacré-Cœur de Montréal. Mesure de la pression artérielle suite à l'injection i.c.v. d'un antagoniste NK-3 des tachykinines chez des SHR ayant subi une néphrectomie. Les néphrectomies ont été pratiquées par le Dr. Réjean Couture et l'étudiante à la Maîtrise Marlène Laurin.

**Rédaction :**

L'article a été rédigé par moi, Andrée Lessard sous la supervision de mon directeur de recherche, le Dr. Réjean Couture.

Andrée Lessard \_\_\_\_\_

Marlène Laurin \_\_\_\_\_

Nabuharu Yamaguchi  \_\_\_\_\_

Daniel Bichet \_\_\_\_\_

Réjean Couture \_\_\_\_\_

**Troisième article (en révision)**

**Lessard A.,** Laurin M., Yamaguchi N., Bichet D. and Couture R. : *Tachykinin NK-3 receptor antagonists control high blood pressure in hypertensive rats.*  
Hypertension, en révision.

**Objectif:**

Évaluer la contribution des récepteurs NK-3 des tachykinines du système nerveux central dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le rat spontanément hypertendu.

**Techniques :**

Mesure de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque suite à l'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) d'antagonistes sélectifs aux récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3 des tachykinines (et d'un énantiomère inactif d'un antagoniste des récepteurs NK-3 des tachykinines) chez le SHR et son contrôle WKY. Cette partie a été complétée par moi, Andrée Lessard et l'étudiante à la Maîtrise Marlène Laurin.

Étude du mécanisme d'action de l'effet anti-hypertenseur suite à l'injection i.c.v. d'un antagoniste NK-3 des tachykinines chez le SHR. Mesure des taux plasmatiques des catécholamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine) et de l'hormone vasopressine avant et après injection i.c.v. d'un antagoniste NK-3 des tachykinines chez le SHR. Les dosages plasmatiques des catécholamines ont été effectués au laboratoire du Dr. Nabu Yamaguchi de l'Université de Montréal. Les dosages plasmatiques de l'hormone vasopressine ont été effectués au laboratoire du Dr. Daniel Bichet à l'Hôpital Sacré-Cœur de Montréal. Mesure de la pression artérielle suite à l'injection i.c.v. d'un antagoniste NK-3 des tachykinines chez des SHR ayant subi une néphrectomie. Les néphrectomies ont été pratiquées par le Dr. Réjean Couture et l'étudiante à la Maîtrise Marlène Laurin.

**Rédaction :**

L'article a été rédigé par moi, Andrée Lessard sous la supervision de mon directeur de recherche, le Dr. Réjean Couture.

Andrée Lessard \_\_\_\_\_

Marlène Laurin \_\_\_\_\_

Nabuharu Yamaguchi

Daniel Bichet

Réjean Couture \_\_\_\_\_

## *Curriculum vitae*

### 1. Coordonées Personnelles

Nom                   Andrée Lessard

Sexe                   Féminin

Citoyenneté        Canadienne

Statut social        Célibataire

Date et lieu  
de Naissance        [REDACTED] (Sherbrooke, Québec, Canada)

Langues  
(parlées, écrites)   Français et Anglais

Adresse             Weill Medical College of Cornell University  
Department of Neurology & Neurosciences  
Division of Neurobiology  
Kips Bay Building  
411 E 69<sup>th</sup> street, room KB-410  
New York, NY 10021  
Téléphone : (212) 570-2900  
courriel : [REDACTED]

### 2. Diplômes

1997-2003        **Ph.D. en Physiologie**  
Rôle des tachykinines et de leurs récepteurs dans la régulation centrale des fonctions  
cardiovasculaires chez le rat normotendu et hypertendu.  
Superviseur : Dr. Réjean Couture  
Département de Physiologie  
Faculté de Médecine  
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

1994-1997        **M.Sc. en Physiologie-Endocrinologie**  
Changements hémodynamiques provoqués par l'administration bilatérale dans le noyau  
paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) d'antagonistes opiacés chez le rat conscient  
et non immobilisé.  
Superviseure : Dr. Hélène Bachelard  
Centre de recherche du CHUL  
Faculté de Médecine  
Université LAVAL, Québec, Québec, Canada

- 1993-1994 **D.S.S.C. (Diplôme en Sciences de la Santé Communautaire)**  
 Département de santé communautaire  
 Faculté de Médecine (CHUS)  
 Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada
- 1990-1993 **B.Sc. en Microbiologie**  
 Faculté des sciences  
 Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada
- 1988-1990 **Diplôme en Sciences de la Santé**  
 C.E.G.E.P. de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

### 3. Bourses et distinctions

- 2003-2005 **FRSQ (\$30,000/année)**  
 Bourse post-doctorale, Gouvernement du Québec
- janvier 2002 **Congrès annuel des stagiaires de recherche de l'Université de Montréal,**  
 Meilleure présentation orale, catégorie Neurosciences (\$500)
- décembre 2001 **Prix du GRSNA (Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome)**  
 Meilleure présentation orale (\$100)
- juillet 2001 **Peptides Receptors, from gene to therapy. An international multidisciplinary symposium.**  
 Meilleur poster (\$500)
- 1999-2000 **Fondation des Maladies du Coeur du Canada (\$19,030)**  
 Bourse de recherche au Ph.D. (Research Traineeship)  
 Fondation privée  
 Renouvellement : 2000-2001, 2001-2002, 2002-2003
- 1999-2000 **FRSQ-FCAR-Santé-Doctorat (\$9,500)**  
 Bourse de recherche au Ph.D. , Gouvernement du Québec  
 Renouvellement : été 2000 (\$6,666)
- automne 1998 **Bourse d'Excellence de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal (\$3,800)**  
 Renouvellement : 1999 (\$4,800), 2000 (\$4,800)
- décembre 1998 **Prix du GRSNA (Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome)**  
 Meilleure présentation orale (\$100)

- Janvier 1996 **Bourse de voyage de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle**  
Meilleure présentation orale (\$2,000)
- 1998-2000 Représentante des étudiants gradués en Physiologie aux réunions départementales, au comité en charge du programme d'études graduées en Physiologie ainsi qu'aux réunions de l'association des étudiants gradués de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal.

#### 4. Expérience de travail

- 2003- **Stagiaire Post-doctorale**  
Subcellular localization of tachykinin receptors in the substantia nigra: relationship with hypertension.  
Weill Medical College of Cornell University  
Department of Neurology & Neurosciences  
Division of Neurobiology  
New York, NY , USA  
Superviseure: Dr. Virginia M. Pickel
- été 1997 **Assistante de recherche**  
Département de Physiologie  
Université de Montréal  
Employeur : Dr. Réjean Couture
- été 1994 **Assistante de recherche**  
Unité de recherche sur l'hypertension  
Centre de recherche du CHUL  
Employeure : Dr. Hélène Bachelard
- été 1992 **Aide de laboratoire**  
Département de Biologie  
Faculté des sciences  
Université de Sherbrooke  
Employeur : Dr. Pierre Matton

**Publications révisées par des pairs**

1. Bachelard, H. ; Pitre, M. & **Lessard, A.**: Mechanisms contributing to the regional haemodynamic effects of DAGO bilaterally injected into the hypothalamic paraventricular nuclei in conscious, unrestrained rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 280 (1): 460-470 1997
2. **Lessard, A.**, Salevsky, F.C., Bachelard, H. & Cupples, W.A.: Incommensurate frequencies of major vascular regulatory mechanisms. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 77: 293-299 1999
3. **Lessard, A.** & Couture, R. : Modulation of cardiac activity by tachykinins in the rat substantia nigra. *Br. J. Pharmacol* , 134 (8): 1749-1759 2001.
4. **Lessard, A.** & Bachelard, H.: Tonic inhibitory control exerted by opioid peptides in the hypothalamic paraventricular nucleus on systemic and regional haemodynamics in awake rats. *Br. J. Pharmacol*, 136 (5): 753-763 2002.
5. **Lessard, A.**, Campos, M.M., Neugebauer, W. & Couture, R. : Implication of nigral tachykinin NK<sub>3</sub> receptors in the maintenance of hypertension in spontaneously hypertensive rats : a pharmacologic and autoradiographic study. *Br. J. Pharmacol.*, 138 (4): 554-563 2003.
6. **Lessard, A.**, Laurin, M., Yamaguchi, N. & Couture, R. : Central anti-hypertensive effect of tachykinin NK-3 receptor antagonists in spontaneously hypertensive rat. *Br. J. Pharmacol.*, en révision.

**Communications**

1. **Lessard, A.** & Bachelard, H.: Changements hémodynamiques provoqués par l'administration centrale d'un antagoniste chez le rat. Présentation par poster à la 3<sup>e</sup> Réunion Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, janvier 1995, Québec, Québec, Canada. *Médecine/Sciences* 11 suppl. 1 : 10 (1995).
2. **Lessard, A.** & Bachelard, H.: Characterization of cardiovascular responses to hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) injections of an opioid antagonist in conscious rats. Présentation par poster à la Réunion Annuelle de la Society for Neuroscience, novembre 1995, San Diego, California.
3. **Lessard, A.** & Bachelard, H.: Changements hémodynamiques provoqués par l'administration bilatérale dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) d'antagonistes opiacés chez le rat conscient et non immobilisé. **Présentation orale et par affiche, bourse de voyage pour meilleure présentation orale (\$2000)**, 4<sup>e</sup> Réunion annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, janvier 1996, Montréal, Québec, Canada. *Médecine/Sciences* 12 suppl. 1 : 16 (1996).
4. **Lessard, A.** & Bachelard, H.: Characterization of cardiovascular responses to hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) injections of opioid antagonists in conscious rats. Présentation par poster à la Réunion annuelle de la Society for Neuroscience. novembre 1996, Washington D.C.

5. **Lessard, A. & Bachelard, H.:** Implication de l'innervation opioïdérique du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus dans le contrôle des fonctions cardiovasculaires, chez le rat éveillé et non immobilisé. Présentation orale et par poster à la réunion annuelle du Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome (GRSNA), décembre 1997, Montréal, Québec, Canada.
6. **Lessard, A. & Couture, R.:** Rôle des tachykinines et de leurs récepteurs dans les mécanismes centraux de régulation cardiovasculaire. Présentation orale à la 10<sup>e</sup> réunion annuelle du GRSNA: **Meilleure présentation orale (\$100)**, décembre 1998, Montréal, Québec, Canada.
7. **Lessard, A. & Couture, R.:** Rôle des tachykinines (TK) et de leurs récepteurs dans les mécanismes centraux de régulation cardiovasculaire (CV). Présentation par poster à la 7<sup>e</sup> réunion annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, janvier 1999, Québec, Québec, Canada. *Médecine/Sciences* 15 suppl. 1 : 20 (1999).
8. **Lessard, A. & Couture, R.:** Modulation de la fonction cardiovasculaire par une action des tachykinines dans la substance noire chez le rat. Présentation orale à la 41<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, octobre 1999, Montebello, Québec, Canada. *Médecine/Sciences* 15 suppl. 2 : 15 (1999).
9. **Lessard, A. & Couture, R.:** Rôle des tachykinines de la substance noire dans les mécanismes centraux de régulation cardiovasculaire. Présentation orale à la 11<sup>e</sup> réunion annuelle du GRSNA, décembre 1999, Montréal, Québec, Canada.
- 10-11. **Lessard, A. & Couture, R.:** Implication des tachykinines de la substance noire dans la modulation des fonctions cardiovasculaires chez le rat. Présentation orale au congrès annuel des stagiaires de recherches de l'Université de Montréal, janvier 2000, Montréal, Québec, Canada et présentation par poster à la 8<sup>e</sup> réunion annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, janvier 2000, Montréal, Québec, Canada. *Médecine/Sciences* 16 suppl. 1 : 26 (2000).
12. **Lessard, A. & Couture, R.:** Cardiovascular implication of tachykinins in the substantia nigra of normotensive and hypertensive rats. Présentation par poster au congrès international Tachykinins, octobre 2000, La Grande Motte, France.
13. **Lessard, A. & Couture, R.:** Cardiovascular control by tachykinins in the rat substantia nigra. Présentation par poster au congrès annuel de la Society for Neuroscience, novembre 2000, New Orleans, La.
14. **Lessard, A. & Couture, R.:** La substance noire comme centre de régulation cardiovasculaire par les tachykinines. Présentation orale à la réunion annuelle du GRSNA, décembre 2000, Montréal, Québec, Canada.
15. **Lessard, A. & Couture, R.:** Rôle potentiel du récepteur NK-3 des tachykinines dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le rat spontanément hypertendu (SHR). Présentation par poster à la 9<sup>e</sup> réunion annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, janvier 2001, Québec, Québec, Canada. *Médecine/Sciences* 17 suppl. 1 : 19 (2001).

16. **Lessard, A. & Couture, R.** : Modulation of sympathetic and vagal cardiac nerve activity by tachykinins in the rat substantia nigra. Présentation par poster au congrès Peptide Receptors, An International Multidisciplinary Symposium, **Prix pour meilleur poster (\$500)**, juillet 2001, Montréal, Québec, Canada.

17. **Lessard, A. & Couture, R.** : Central tachykinin NK-3 receptor as a novel target for anti-hypertensive drugs. Présentation par poster au congrès Peptide Receptors, An International Multidisciplinary Symposium, juillet 2001, Montréal, Québec, Canada.

18. **Lessard, A. & Couture, R.** : L'inhibition centrale des récepteurs NK-3 des tachykinines corrige l'hypertension du rat spontanément hypertendu. Présentation par poster à la 43<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, septembre 2001, Québec, Québec, Canada. *Médecine/Sciences* 17 suppl. 2 : 35 (2001).

19. **Lessard, A. & Couture, R.** : Anti-hypertensive effect induced by intracerebral injection of tachykinin NK-3 receptor antagonists in hypertensive rats. Présentation par poster à la 31<sup>e</sup> réunion annuelle de la Society for Neuroscience, novembre 2001, San Diego, CA, USA.

20. **Lessard, A. & Couture, R.** : Effet anti-hypertenseur suite à l'injection centrale d'antagonistes du récepteur NK-3 des tachykinines chez le rat spontanément hypertendu. Présentation orale à la réunion annuelle du GRSNA, **prix pour meilleure présentation orale (\$100)**, novembre 2001, Montréal, Québec, Canada.

21-22 **Lessard, A. & Couture, R.** : L'injection intracérébrale d'antagonistes du récepteur NK-3 des tachykinines corrige l'hypertension artérielle chez le rat spontanément hypertendu. Présentation par poster à la 10<sup>e</sup> réunion annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, janvier 2002, Montréal, Québec, Canada. *Médecine/Sciences* 18 suppl. 1 : 21 (2002).  
Présentation orale au congrès annuel des stagiaires de recherche de l'Université de Montréal, **prix pour meilleure présentation orale**, janvier 2002, Montréal, Québec, Canada.

23. Deschamps, K., **Lessard, A. & Couture, R.**: Réponses cardiovasculaires induites par les tachykinines dans l'aire tegmentale ventrale chez le rat. Présentation orale à la 44<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, septembre 2002, Saint-Sauveur, Québec, Canada. *Médecine/Sciences* 18 suppl. 2 : 10 (2002).

24. Laurin, M., **Lessard, A. & Couture, R.**: Implication des récepteurs centraux des tachykinines dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le rat. Présentation par poster à la 44<sup>e</sup> réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, **poster retenu pour le prix Hans Selye**, septembre 2002, Saint-Sauveur, Québec, Canada. *Médecine/Sciences* 18 suppl. 2 : 15 (2002).

25. **Lessard, A. & Couture, R.** : Putative role for the nigral tachykinin NK-3 receptor in the maintenance of hypertension in hypertensive rats. Présentation par poster à la 32<sup>e</sup> réunion annuelle de la Society for Neuroscience, novembre 2002, Orlando, Floride.

26. Laurin, M., **Lessard, A. & Couture, R.** : Effet anti-hypertenseur d'un antagoniste NK-3 des tachykinines chez le rat spontanément hypertendu. Présentation par poster à la 11<sup>e</sup> réunion annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, **Prix pour meilleur poster (\$2,000)**, janvier 2003, Québec, Québec, Canada.

27. Deschamps, K., **Lessard, A.** & Couture, R. : L'aire tegmentale ventrale comme centre de régulation cardiovasculaire par les tachykinines chez le rat. Présentation par poster à la 11<sup>e</sup> réunion annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, janvier 2003, Québec, Québec, Canada.

28. **Lessard, A.** & Pickel, V.M.: Cytoplasmic distribution of NK-1 receptors in non-dopaminergic neurons in the rat substantia nigra. Présentation par poster à la 33<sup>e</sup> reunion annuelle de la Society for Neuroscience, novembre 2003, New Orleans, Louisiana, USA.

### Expertise :

- Procédures chirurgicales chez le rat: implantation de canules guides au-dessus de divers noyaux du cerveau (noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, substance noire, aire tegmentale ventrale); implantation de cathéters dans l'artère fémorale et la veine jugulaire; implantation de sondes pulsatiles Doppler autour de l'artère rénale, mésentérique et la portion inférieure de l'aorte.

- Études pharmacologiques chez le rat éveillé, non immobilisé : microinjections de divers agonistes et antagonistes dans divers noyaux du cerveau, injections i.c.v. et i.v.

- Technique de liaison en autoradiographie

- Études immunocytochimiques : double liaison (particules d'or et peroxydase)

- Microscopie électronique

### Affiliations professionnelles

Society for Neuroscience USA

Club de Recherches Cliniques du Québec

Société Québécoise d'Hypertension Artérielle

Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome (GRSNA) de l'Université de Montréal

### Références :

Dr. Réjean Couture

Téléphone: (514) 343-7060

Fax: (514) 343-2111

courriel: [REDACTED]

Dr. Hélène Bachelard

Téléphone: (418) 656-4141 ext. 8253

Fax : (418) 654-2759

courriel: [REDACTED]

Dr. Virginia M. Pickel

Téléphone: (212)-570-2900

Fax: (212) 988-3672

courriel: [REDACTED]