

Université de Montréal

**DISTRIBUTION CELLULAIRE ET SUBCELLULAIRE DU  
RÉCEPTEUR 5-HT<sub>2A</sub> DE LA SÉROTONINE DANS LE SYSTÈME  
NERVEUX CENTRAL DU RAT**

par

**VIRGINIA CORNEA-HÉBERT**

Départements de physiologie et de pathologie et biologie cellulaire et  
Centre de recherche en sciences neurologiques

Faculté de médecine

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

octobre 2004

© VIRGINIA CORNEA-HÉBERT, 2004



W

4

U58

2005

v.084

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse de doctorat intitulée :

**Distribution cellulaire et subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> de  
la sérotonine dans le système nerveux central du rat**

présentée par

**VIRGINIA CORNEA-HÉBERT**

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

**VINCENT CASTELLUCCI**

.....  
président-rapporteur

**LAURENT DESCARRIES**

.....  
directeur de recherche

**LOUIS-ERIC TRUDEAU**

.....  
membre du jury

**EDITH HAMEL**

.....  
examineur externe

**VINCENT CASTELLUCCI**

.....  
représentant du doyen de la FES

## SOMMAIRE

Cette thèse présente les résultats de deux études publiées et d'une expérimentation immunocytochimique et biochimique, complémentaire, dont l'objectif général était l'élucidation du rôle et les modalités de fonctionnement du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> de la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) dans le système nerveux central, grâce à l'analyse de sa distribution aux échelons anatomique, cellulaire et subcellulaire.

Dans un premier temps, nous avons eu recours au marquage à l'immunoperoxydase, avec un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre un peptide correspondant à une séquence N-terminale du récepteur, pour produire la première cartographie détaillée de sa distribution régionale et déterminer sa localisation cellulaire dans le cerveau et la moelle épinière du rat adulte. Cette description en microscopie photonique a été complétée par l'examen de plusieurs régions cérébrales en microscope électronique. (Publié dans *The Journal of Comparative Neurology*).

Plusieurs propriétés du récepteur ont été ainsi mises en évidence : sa distribution régionale ubiquitaire et sa localisation d'hétérorécepteur neuronal dans la plupart des régions du névraxe; le fréquent manque de concordance entre sa densité régionale ou laminaire et celle de l'innervation 5-HT; sa localisation neuronale somatique, dendritique et axonale (axones myélinisés), mais son absence apparente des épines dendritiques et des terminaisons axonales; sa localisation subcellulaire à prédominance cytoplasmique.

Au vu de ces données, et compte tenu de résultats antérieurs démontrant un transport axonal antérograde et rétrograde du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, ainsi que sa contribution à la régulation de plusieurs gènes, nous avons proposé qu'une de ses principales fonctions soit la médiation de cascades de signalisation rétrogrades activées par la sérotonine.

Dans un deuxième temps, trois anticorps différents, marqués à l'or en pré-enrobage, ont été employés aux fins d'une analyse quantitative, en microscopie électronique, de la distribution subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les dendrites du cortex fronto-pariétal du rat adulte. (Publié dans *Neuroscience*).

Cette étude a révélé que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> se trouvait en plus forte concentration dans les ramifications dendritiques de petit calibre, comparativement aux plus grandes, et que sa répartition subcellulaire dans un compartiment neuronal représentatif de la membrane plasmique *versus* un compartiment cytoplasmique reflétait strictement la surface respective de ces deux compartiments, excluant ainsi un enrichissement significatif de la membrane. Au cours de ce travail, nous avons également pris connaissance de résultats biomoléculaires et biochimiques qui suggéraient une association du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> à la protéine MAP1A (*microtubule associated protein 1A*) des microtubules. Nous avons donc comparé la distribution subcellulaire de cette protéine du cytosquelette à celle du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Tout comme le marquage à l'or du récepteur, celui de la protéine MAP1A est apparu plus dense dans les petites que dans les grandes dendrites, et à peine plus faible

que celui du récepteur dans le compartiment membranaire par rapport au compartiment cytoplasmique. Grâce à des doubles marquages à l'immunoperoxydase et à l'or, la protéine MAP1A et le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> ont d'ailleurs pu être visualisés simultanément dans les mêmes dendrites.

Ces résultats ont confirmé la localisation principalement intracellulaire du récepteur et étayé la possibilité de son association au cytosquelette dans les neurones du cerveau. Ils sont aussi venus renforcer notre hypothèse d'une participation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> à des processus de signalisation intraneuronaux.

L'expérimentation complémentaire visait à mieux comprendre les mécanismes d'un tel fonctionnement. D'une part, nous avons voulu déterminer, par immunocytochimie en microscopie optique et électronique, les conséquences d'une déplétion sévère de la 5-HT cérébrale sur la distribution et la localisation subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. À divers temps après traitement des rats avec la *para*-chlorophénylalanine, un inhibiteur de synthèse de la 5-HT, nous avons constaté une évolution quasi-parallèle de la teneur en 5-HT et de la concentration du récepteur dans l'ensemble du cerveau, sous forme d'importantes baisses d'immunoréactivité 5-HT et 5-HT<sub>2A</sub> durant la première semaine après le traitement, avec retour progressif à la normalité dans les deux semaines suivantes. Durant la période initiale de baisse de la quantité de protéine 5-HT<sub>2A</sub>, l'hybridation *in situ* a montré une augmentation de l'expression (ARNm) du récepteur, mais sans qu'il soit possible de documenter un quelconque changement de sa

localisation subcellulaire en microscopie électronique. Ces résultats allaient dans le sens d'une régulation possible de l'expression du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> par la concentration ambiante en 5-HT.

D'autre part, nous avons cherché à caractériser l'association du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> à une ou des protéines du cytosquelette par des expériences d'immunobuvardage et d'immunoprécipitation sur préparations membranaires de cerveau. Bien que très préliminaires, les résultats de ces expérimentations se sont avérés compatibles avec l'existence d'une véritable association physique entre le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et la protéine MAP1A dans le cerveau.

La présence du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans un grand nombre de régions cérébrales, sa distribution souvent éloignée des sites de libération de la 5-HT, sa localisation neuronale majoritairement cytoplasmique et sa prédilection pour les petites branches dendritiques en association avec le cytosquelette suggèrent un rôle et un mode de fonctionnement particuliers pour ce récepteur. Son activation dans le système nerveux central pourrait dépendre de celle d'autres récepteurs de la 5-HT co-localisés sur les mêmes neurones et médier des fonctions de régulation génique du neuromodulateur 5-HT.

**MOTS CLÉS (autres que dans le titre) :** immunocytochimie, microscopie électronique, immunomarquage double, distribution anatomique, localisation cellulaire et subcellulaire, cytosquelette, signalisation rétrograde.



## SUMMARY

This thesis presents the results of two published studies and of complementary immunocytochemical and biochemical experiments, aimed at elucidating the role and function of the serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system through an analysis of its distribution at the anatomical, cellular and subcellular levels.

In a first step, we took advantage of a specific monoclonal antibody, raised against a peptide corresponding to its N-terminal sequence, to label the receptor with immunoperoxidase, to produce the first detailed map of its regional distribution, and determine its cellular localization in the brain and spinal cord of adult rat. This light microscopic description was then completed by the examination of several brain regions with the electron microscope. (Published in *The Journal of Comparative Neurology*).

Many properties of the receptor were thus demonstrated: its ubiquitous regional distribution and its localization as a neuronal heteroreceptor in most regions of the neuraxis; the frequent mismatch between its regional or laminar distribution and that of the 5-HT innervation; its somatic, dendritic and axonal (myelinated axons) neuronal localization, but apparent absence from dendritic spines and axon terminals; its predominantly cytoplasmic subcellular localization. In view of these data and of prior results demonstrating an anterograde and retrograde axonal transport of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor, as well as its contribution to the regulation of several genes, we proposed

that one of its main function might be to mediate retrograde signaling cascades activated by 5-HT.

In a second step, three different antibodies were used after pre-embedding immunolabeling with gold, to carry out a quantitative electron microscopic analysis of the subcellular distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor in dendrites of the fronto-parietal cortex of adult rat. (Published in *Neuroscience*).

This study revealed that the 5-HT<sub>2A</sub> receptor was present in higher concentration in dendritic branches of small caliber compared to larger ones, and that its subcellular repartition in a neuronal compartment representing the plasma membrane *versus* a cytoplasmic compartment was strictly proportional to the relative surface of these two compartments, thus excluding a significant enrichment of the membrane. During this study, we also became aware of biomolecular and biochemical results suggesting an association of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor with the microtubular protein MAP1A. We therefore compared the subcellular distribution of this cytoskeletal protein with that of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor. Much like the immunogold labeling of the receptor, that of the MAP1A protein turned out to be denser in the smaller than the larger dendrites, and barely weaker than that of the receptor in the membrane compared to the cytoplasmic compartment. By double immunoperoxidase and immunogold labeling, it was also possible to simultaneously visualize the MAP1A protein and the 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the same dendrites.

These results confirmed the mainly intracellular localization of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor and supported its possible association to the cytoskeleton in brain neurons. They also reinforced our hypothesis of an implication of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor in intraneuronal signaling processes.

The complementary experiments were performed to better understand some of the mechanisms underlying these functions. On the one hand, we sought to determine, by light and electron microscopic immunocytochemistry, the consequences of a severe depletion of brain 5-HT on the distribution and subcellular localization of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor. At different time intervals after treatment of rats with *para*-chlorophenylalanine, an inhibitor of 5-HT synthesis, we observed parallel changes in 5-HT content and concentration of the receptor throughout brain. There was a marked decrease of 5-HT and 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity during the first week after the treatment, followed by a progressive return to normal within the next two weeks. During the initial period of 5-HT<sub>2A</sub> decrease, an increase in the expression of the receptor mRNA was detected by *in situ* hybridization. However, it was not possible to demonstrate any change in the subcellular distribution of the receptor by electron microscopy. These results appeared to be in line with a possible regulation of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor by the ambient concentration in 5-HT.

On the other hand, we tried to characterize the association of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor with cytoskeletal protein(s), by means of immunoblot experiments on brain membrane preparations. Although very

preliminary, the results of these experiments were compatible with the existence of a physical association between 5-HT<sub>2A</sub> receptor and MAP1A protein in brain.

The presence of 5-HT<sub>2A</sub> receptor in many brain regions, its distribution often remote from sites of 5-HT release, its predominantly cytoplasmic neuronal localization and its predilection for small dendritic branches, in association with the cytoskeleton, suggest a particular role and mode of functioning for this receptor. Its activation in the central nervous system could depend on that of other 5-HT receptors co-localized on the same neurons and mediate gene regulatory functions of the neuromodulator 5-HT.

**KEY WORDS (other than in titles) :** immunocytochemistry, electron microscopy, anatomical distribution, cellular and subcellular localization, double immunolabeling, cytoskeleton, retrograde signaling.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
MOTS CLÉS .....	vi
<i>SUMMARY</i> .....	vii
<i>KEY-WORDS</i> .....	x
TABLE DES MATIÈRES .....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES FIGURES .....	xix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xxiii
REMERCIEMENTS. ....	xxvi
DÉDICACE.....	xxviii

### Chapitre 1

#### INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Préambule: Généralités sur le récepteur 5-HT <sub>2A</sub> de la sérotonine.....	2
1.2 Organisation anatomique du système à sérotonine dans le SNC .....	4
1.2.1 Topographie.....	4
1.2.2 Ultrastructure .....	6
1.3 Les récepteurs à sérotonine du SNC.....	8
1.3.1 La superfamille des récepteurs à sérotonine.....	8
1.3.2 Localisation des divers récepteurs à sérotonine dans le SNC.....	13
1.3.2.1 Distribution régionale.....	15
1.3.2.2 Localisation cellulaire et subcellulaire.....	16
1.4 Le récepteur 5-HT <sub>2A</sub> de la sérotonine.....	18

<b>1.4.1</b>	Neuropharmacologie du récepteur 5-HT <sub>2A</sub> .....	18
<b>1.4.2</b>	Effets biologiques et/ou thérapeutiques des drogues liant le récepteur 5-HT <sub>2A</sub> .....	21
<b>1.4.3</b>	Effets électrophysiologiques médiés par le récepteur 5-HT <sub>2A</sub> dans le SNC.....	25
<b>1.4.4</b>	Caractéristiques moléculaires et biochimiques du récepteur 5-HT <sub>2A</sub> .....	26
<b>1.4.4.1</b>	Structure moléculaire .....	26
<b>1.4.4.1.1</b>	Sites potentiels de glycosylation .....	27
<b>1.4.4.1.2</b>	Sites potentiels de phosphorylation.....	27
<b>1.4.4.1.3</b>	Autres sites ou séquences d'intérêt.....	29
<b>1.4.4.2</b>	Couplage aux messagers intracellulaires.....	30
<b>1.4.4.3</b>	Modulation de l'expression de gènes via le récepteur 5-HT <sub>2A</sub> .....	31
<b>1.4.5</b>	Régulation des récepteurs 5-HT <sub>2A</sub> .....	32
<b>1.4.5.1</b>	Réponses adaptatives : études <i>in vivo</i> .....	32
<b>1.4.5.1.1</b>	Régulation par les antipsychotiques.....	34
<b>1.4.5.1.2</b>	Régulation par les antidépresseurs .....	34
<b>1.4.5.1.3</b>	Dénervation sérotoninergique ou traitement avec la PCPA.....	35
<b>1.4.5.2</b>	Mécanismes biochimiques et moléculaires.....	36
<b>1.4.5.3</b>	Changements de densité des récepteurs 5-HT <sub>2A</sub> dans des états pathologiques .....	39
<b>1.5.</b>	Objectifs de la recherche .....	40

**Chapitre 2****DISTRIBUTION CELLULAIRE ET SUBCELLULAIRE DU RÉCEPTEUR 5-HT<sub>2A</sub> DE LA SÉROTONINE DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL DU RAT ADULTE**

Résumé .....46

Article : Virginia CORNEA-HÉBERT, Mustapha RIAD, Chun WU, Sujay SINGH and Laurent DESCARRIES (1999) *Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system of adult rat. J Comp Neurol 409 :187-209..... 48*

**Chapitre 3****DISTRIBUTION ULTRASTRUCTURALE ANALOGUE DU RÉCEPTEUR 5-HT<sub>2A</sub> DE LA SÉROTONINE ET DE LA PROTÉINE MAP1A DANS LES DENDRITES CORTICALES**

Résumé .....148

Article : Virginia CORNEA-HÉBERT, Kenneth C. WATKINS, Bryan L. ROTH, Wesley K. KROEZE, Pierrette GAUDREAU, Nicole LECLERC and Laurent DESCARRIES (2002) *Similar ultrastructural distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor and microtubule-associated protein MAP1A in cortical dendrites of adult rat. Neuroscience 113 :23-35..... 150*

**Chapitre 4****DONNÉES COMPLÉMENTAIRES**

4.1 Introduction.....200

<b>4.2</b>	<b>Localisation immunocytochimique et expression du récepteur</b>	
	5-HT <sub>2A</sub> par suite de déplétion de la sérotonine.....	200
<b>4.2.1</b>	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>202</b>
<b>4.2.1.1</b>	<b>Anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> et anti-5-HT .....</b>	<b>202</b>
<b>4.2.1.2</b>	<b>Traitement à la PCPA et préparation du tissu cérébral... ..</b>	<b>202</b>
<b>4.2.1.3</b>	<b>Immunocytochimie en microscopie optique.....</b>	<b>203</b>
<b>4.2.1.4</b>	<b>Immunocytochimie en microscopie électronique.....</b>	<b>203</b>
<b>4.2.1.5</b>	<b>Hybridation <i>in situ</i>.....</b>	<b>204</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>204</b>
<b>4.2.2.1</b>	<b>Immunoréactivité de la 5-HT et du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> à différents temps après la fin du traitement à la PCPA (microscopie optique).....</b>	<b>204</b>
<b>4.2.2.2</b>	<b>Expression du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, deux heures après la fin du traitement à la PCPA (hybridation <i>in situ</i>).....</b>	<b>210</b>
<b>4.2.2.3</b>	<b>Localisation subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, deux heures après la fin du traitement à la PCPA (microscopie électronique).....</b>	<b>211</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Interprétation.....</b>	<b>214</b>
<b>4.3</b>	<b>Association physique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> au cytosquelette.....</b>	<b>217</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>219</b>
<b>4.3.1.1</b>	<b>Anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> et anti-MAP1A.....</b>	<b>219</b>
<b>4.3.1.2</b>	<b>Homogénat de cerveau entier .....</b>	<b>220</b>
<b>4.3.1.3</b>	<b>Purification des microtubules.....</b>	<b>220</b>
<b>4.3.1.4</b>	<b>Mesure de la concentration des protéines .....</b>	<b>221</b>
<b>4.3.1.5</b>	<b>Immunobuvardage.....</b>	<b>221</b>



<b>4.3.2 Résultats.....</b>	<b>222</b>
<b>4.3.3 Interprétation.....</b>	<b>228</b>

## **Chapitre 5**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE**

<b>5.1 Topographie régionale.....</b>	<b>232</b>
<b>5.1.1 Les apports de l'immunocytochimie.....</b>	<b>232</b>
<b>5.1.2 Corrélations anatomo-fonctionnelles de la distribution du           récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le SNC.....</b>	<b>236</b>
<b>5.1.3 Distribution du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le système de           transmission sérotoninergique et relation probable avec la           sérotonine elle-même .....</b>	<b>238</b>
<b>5.2 Topographie cellulaire.....</b>	<b>240</b>
<b>5.2.1 Marquage dendritique intense mais non épineux.....</b>	<b>242</b>
<b>5.2.2 Marquage axonal (axones myelinisés) non terminal.....</b>	<b>243</b>
<b>5.3 Topographie subcellulaire.....</b>	<b>246</b>
<b>5.3.1 Le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est majoritairement intracytoplasmique ...</b>	<b>246</b>
<b>5.3.2 Localisation subcellulaire similaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et de           la protéine MAP1A.....</b>	<b>249</b>
<b>5.3.3 Le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est plus concentré au niveau des           dendrites distales .....</b>	<b>251</b>
<b>5.4 Conclusion générale .....</b>	<b>252</b>

## **Chapitre 6**

<b>BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE.....</b>	<b>254</b>
------------------------------------	------------

**Annexe**

Anders JANSSON, Laurent DESCARRIES, Virginia CORNEA-HÉBERT, Mustapha RIAD, Daniel VERGÉ, Mircea BANCILA, Luigi F. AGNATI and Kjell FUXE (2001) *Transmitter-receptor mismatches in central dopamine, serotonin and neuropeptide systems: further evidence for volume transmission*. In W. Waltz (ed) : *The Neuronal Environment : Brain Homeostasis in Health and Disease*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 83-108.

## LISTE DES TABLEAUX

### Chapitre 1

<b>Tableau 1.</b> Caractéristiques pharmacologiques et localisation régionale des récepteurs à sérotonine.....	14
<b>Tableau 2.</b> Sélectivité des radioligands 5-HT <sub>2A</sub> .....	20

### Chapitre 2

<b>Table 1.</b> <i>Somatodendritic 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactivity in the CNS of adult rat</i> .....	113
<b>Table 2.</b> <i>Fiber tracts containing 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactive axons</i> .....	121

### Chapitre 3

<b>Table 1.</b> <i>Distribution of dendritic 5-HT<sub>2A</sub> immunogold labeling in adult rat fronto-parietal cortex</i> .....	189
<b>Table 2.</b> <i>Distribution of dendritic MAPIA immunogold labeling in adult rat fronto-parietal cortex</i> .....	190

### Chapitre 4

<b>Tableau 1.</b> Intensité de l'immunoréactivité 5-HT et 5-HT <sub>2A</sub> à différents temps après la fin du traitement à la PCPA.....	208
<b>Tableau 2.</b> Densité de l'ARNm du récepteur 5-HT <sub>2A</sub> dans le cortex pariétal et le striatum, deux heures après la fin du traitement à la PCPA.....	211

<b>Tableau 3.</b> Distribution subcellulaire du récepteur 5-HT <sub>2A</sub> dans les dendrites des couches supérieures du cortex fronto-pariétal du rat adulte, deux heures après la fin du traitement à la PCPA .....	213
---	-----

## LISTE DES FIGURES

**Chapitre 1**

- Figure 1.** Projections sérotoninergiques ascendantes et descendantes des noyaux du raphé .....5
- Figure 2.** Les récepteurs à sérotonine .....9
- Figure 3.** Séquence en acides aminés du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> de rat .....28
- Figure 4.** Modèle actuel du mécanisme moléculaire de la régulation des RCPG.....38

**Chapitre 2**

- Figures 1-6.** *Anatomical distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity (immunoperoxidase-labeled) in a rostrocaudal series of six transverse sections across adult rat brain.....* 123
- Figures 7-9.** *Cellular distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in three regions of cerebral cortex: anterior cingulate (Fig. 7), piriform (Fig. 8) and parietal (Fig. 9) ..... 126*
- Figures 10 and 11.** *Somatodendritic 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in the hippocampus (Fig. 10) and the subiculum (Fig. 11) ... 129*
- Figures 12-15.** *5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in neostriatum (Fig. 12), mesencephalic nucleus of V (Fig. 13), oculomotor nucleus (Fig. 14), and cerebellar cortex (Fig. 15) ..... 131*

<b>Figures 16-19.</b>	<i>Higher magnifications of the 5-HT<sub>2A</sub> immunostaining in cerebral cortex (Fig. 16), globus pallidus (Fig. 17), red nucleus (Fig. 18) and cerebellar cortex (Fig. 19) .....</i>	<i>133</i>
<b>Figures 20 and 21.</b>	<i>Macrophotograph of the whole cervical spinal cord (Fig. 20,) and higher power view of the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity of the anterior horn (Fig. 21) .....</i>	<i>135</i>
<b>Figures 22-25.</b>	<i>Electron micrographs illustrating the subcellular localization of immunogold-labeled 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the cerebral cortex (Figs. 22 and 23), lateral olfactory tract (Fig. 24) and molecular layer of the piriform cortex (Fig. 25).....</i>	<i>137</i>
 <b>Chapitre 3</b>		
<b>Figure 1.</b>	<i>Light microscopic immunocytochemical visualisation of (A) 5-HT<sub>2A</sub> receptor (N-terminal polyclonal antibody) and (B) MAP1A protein (monoclonal antibody), in the upper layers of adult rat parietal cortex .....</i>	<i>191</i>
<b>Figure 2.</b>	<i>5-HT<sub>2A</sub> receptors in cortical (frontoparietal) dendrites, as visualized by pre-embedding immunogold labeling with three different primary antibodies: (A) N-terminal polyclonal; (B) N-terminal monoclonal, and (C) C-terminal polyclonal.....</i>	<i>193</i>

- Figure 3.** *Part of an immunoreactive nerve cell body from the lower cortical layers, illustrating the predominantly intracytoplasmic localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors.....*195
- Figure 4.** *Large cortical dendrites singly immunogold-labeled for (A) 5-HT<sub>2A</sub> receptors and (B) MAP1A protein, or (C) doubly labeled for 5-HT<sub>2A</sub> receptors (immunoperoxidase) and MAP1A protein (immunogold) .....197*
- Chapitre 4**
- Figure 1.** Immunoréactivité de la sérotonine et du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, sur des coupes adjacentes, deux heures après la fin du traitement à la PCPA. Grossissement 8.5 X.....205
- Figure 2.** Immunoréactivité de la sérotonine et du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, à différents temps après la fin du traitement à la PCPA. Les coupes trouées, placées en haut sur les lames, proviennent de rats témoins. Les coupes provenant de rats traités sont celles du bas sur chaque lame. Images obtenues par photocopie des lames histologiques.....207
- Figure 3.** Distribution subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les dendrites du cortex fronto-pariétal, deux

heures après la fin du traitement à la PCPA.

Echelle : 1 $\mu$ m.....212

**Figure 4.**

Immunobuvardage d'homogénat de cerveau révélé avec les trois anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> disponibles, et l'anticorps MAP1A. Les produits de la réaction ont été détachés de la membrane à l'aide d'un tampon de 'stripping' et la membrane réutilisée pour la révélation de l'anticorps suivant. Résultat représentatif de trois expériences.....223

**Figure 5.**

Immunobuvardage d'un extrait de microtubules en absence ou présence de concentrations croissantes de  $\beta$ -mercaptoéthanol dans le tampon de dissolution de l'échantillon. Révélation successive avec l'anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> monoclonal en N-terminal et l'anticorps anti-MAP1A. Résultat représentatif de deux expériences .....226



**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

A	alanine
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	analyse de variance
Arc	<i>activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>
ARNm	acide ribonucléique messenger
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	albumine de sérum de boeuf
C	cystéine
camK	kinase dépendante de la calmoduline
C-terminal	extrémité carboxylique de la protéine
D	acide aspartique
DAB	3,3'- diaminobenzidine tetrahydrochloride
DTT	dithiothréitol
DOB	4-bromo-2,5-diméthoxyamphétamine
DOI	4-iodo-2,5-diméthoxyamphétamine
DOPAC	acide dihydroxyphénylacétique
E	acide glutamique
F	phénylalanine
Fr1	cortex frontal (moteur)
G	glycine
GABA	acide gamma-amino-butyrique
GRKs	<i>G-protein-coupled receptor kinases</i>

H	histidine
HEK-293	cellules rénales embryonnaires humaines 293
I	isoleucine
IMAO	inhibiteur de la monoamine oxydase
i.p.	intra-péritonéale
ISRS	inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine
Jak/STAT	<i>Janus kinase / signal transducers and activators of transcription</i>
K	lysine
KO	<i>knockout</i>
L	leucine
LSD	acide lysergique diéthylamide
M	méthionine
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAP1A	protéine associée aux microtubules, 1A
MUPP1	<i>multi-PDZ-domain protein</i>
N	asparagine
NEM	N-éthhylmaléimide
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NHS	sérum normal de cheval
N-terminal	extrémité $\alpha$ -aminée de la protéine
P	proline
Par1	cortex pariétal (somatosensoriel)
PBS	tampon phosphate salin
PCPA	<i>para-chlorophénylalanine</i>

PDZ	<i>postsynaptic density / disc large / zona occludens-1</i>
PFA	paraformaldéhyde
PKA	protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	protéine kinase dépendante du Ca <sup>2+</sup>
protéine G	protéine couplée aux nucléotides guanylés
PSD	<i>postsynaptic density (protein)</i>
Q	glutamine
R	arginine
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
S	sérine
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SNC	système nerveux central
T	thréonine
TBS	tampon Tris-salin
TEP	tomographie par émission de positrons
Tris	hydroxyméthyl-aminométhane
V	valine
W	tryptophane
Y	tyrosine
5-HT	5-hydroxytryptamine (sérotonine)

## REMERCIEMENTS

Cette formidable aventure n'aurait pas été possible sans l'appui et la générosité de plusieurs personnes que je tiens à remercier.

Des remerciements des plus sincères vont avant tout à mon directeur, Laurent Descarries, qui m'a permis d'aller au-delà des terrains battus. Son enthousiasme, son appui et son ouverture d'esprit étaient toujours présents, mais non sans méthode, analyse et réflexion et surtout rigueur. Un échange particulièrement enrichissant pour moi, au moment de l'écriture, qui s'avérait encore analyse, réflexion et rigueur, que j'ai eu le privilège de partager avec lui. Je lui suis aussi profondément reconnaissante pour son respect envers ma vie de famille et son soutien financier.

Je tiens à remercier tout spécialement Sujay Singh et Chun Wu (Imgenex, San Diego, CA), dont le don initial d'anticorps monoclonal a permis au projet d'éclorre. Également, Bryan Roth, Wesley Kroeze et Dave Willins (Case Western University, Cleveland, OH), pour leur généreux don d'anticorps polyclonal, leurs discussions fructueuses et leur enthousiasme envers ce projet.

Je remercie mes autres collaborateurs de l'Université de Montréal: Annick Fargin, Pierrette Gaudreau, Nicole Leclerc, Jacques Paiment, Dave Bélanger et Carole AbiFarah, ainsi que ceux de l'Université Laval: Jean-Jacques Soghomonian et Nathalie Laprade, pour m'avoir généreusement fait profiter de leur expérience et de leur compétence.

Mes remerciements vont aussi à mes collègues et amis du laboratoire et particulièrement Mustapha, pour sa compétence et son sens de l'humour, Nicolas pour son art électronique et Sonia, Francine, Sylvie, Ariel et Naguib pour l'ambiance du laboratoire.

Plusieurs collègues des laboratoires de Guy Doucet, Lisa McKerracher et Adriana DiPolo m'ont toujours accueillie avec le sourire même quand j'allais les voir pour leur demander un conseil, un produit ou pour utiliser leurs appareils.

Je remercie également Sylvia Garcia, Annie Vallé et Kenneth Watkins pour l'indispensable apport technique, Denis Rodrigue pour l'histologie, ainsi que Jean Léveillé et Gaston Lambert pour leur excellent travail en photographie.

Le personnel de la bibliothèque de la santé de l'Université de Montréal pour leur efficacité et leur bienveillance.

Les membres du jury, pour avoir gentiment consenti à évaluer cette thèse.

Mes parents pour leur intégrité et leur générosité. Ma sœur et mes « nobles » amis pour leur soutien moral, ainsi que ma petite famille que j'aime. Merci Georges pour ton intelligence artificielle et Gabriela pour ta sagesse.

À mes enfants :

Georges et Gabriela

## **Chapitre 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## 1.1 Préambule : Généralités sur le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> de la sérotonine

Le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (désigné auparavant 5-HT<sub>2</sub>) est le premier des nombreux récepteurs du neurotransmetteur/modulateur sérotonine (5-hydroxytryptamine) à avoir été identifié dans le SNC. Mis en évidence grâce à l'analyse pharmacologique de son affinité pour différents radioligands dans diverses régions du cerveau (Leysen et al., 1978; Peroutka et Snyder 1979), il se distingue dès lors par sa haute affinité (nanomolaire : nM) envers les antagonistes sérotoninergiques comme la spiperone, sa faible affinité (micromolaire :  $\mu$ M) envers la sérotonine elle-même (Leysen et al., 1978; Peroutka et Snyder 1979), et la médiation d'effets neuromodulateurs excitateurs (McCall et Aghajanian 1980; VanderMaelen et Aghajanian 1980; Peroutka et al., 1981; Davies et al., 1987; Araneda et Andrade 1991).

La réponse adaptative du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> à la dénervation sérotoninergique ou l'administration d'antagonistes se révèle imprévisible, en l'absence d'augmentation de la densité ou de l'affinité de ses sites de radioliasion (Blackshear et al., 1986; Conn et Sanders-Bush 1986; Sanders-Bush 1990; Gray et Roth 2001). Au contraire, les traitements aux antagonistes entraînent une régulation à la baisse considérée comme paradoxale (Sanders-Bush 1990; Gray et Roth 2001; Van Oekelen et al., 2003). De plus, l'exposition aux agonistes provoque une désensibilisation rapide ainsi qu'une régulation à la baisse des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> *in vivo* (Sanders-Bush 1990; Gray et Roth 2001; Van Oekelen et al., 2003).



On reconnaît par la suite que l'activation des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> contribue fortement à l'action des drogues hallucinogènes comme le LSD (Glennon 1996; Marek et Aghajanian 1996), et que leur blocage pourrait contribuer à l'efficacité thérapeutique des antipsychotiques dits atypiques (Meltzer 1989, 1999, 2003, 2004). Des études plus récentes ont aussi montré que les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> interviennent dans la médiation et/ou le changement d'expression de plusieurs gènes (Tilakaratne et Friedman 1996; Vaidya et al., 1997; Mijster et al., 1998; Zetterström et al., 1999; Pei et al., 2000; Scruggs et al., 2000) et qu'ils peuvent interagir avec certaines protéines cellulaires de signalisation et/ou de structure (Gelber et al., 1999; Kroeze et al., 1999; Kroeze et Roth 2000; Becamel et al., 2001,2004).

Le rôle physiologique des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> demeure énigmatique. L'hypothèse avancée par Leysen, en 1992, suppose que ces récepteurs soient pratiquement non fonctionnels à l'état normal. Étant donné leur faible affinité envers la sérotonine, ils seraient peu ou pas stimulés en condition physiologique, comme s'ils se trouvaient déjà dans un état d'hypersensibilité (« *super sensitive* »). Ceci expliquerait d'ailleurs leur régulation atypique. Leur activation répétée ou prolongée serait responsable d'états pathologiques. Les hypothèses actuelles n'ont guère évolué depuis (Jakab et Goldman-Rakic 1998; Gray et al., 2003a; Van Oekelen et al., 2003).

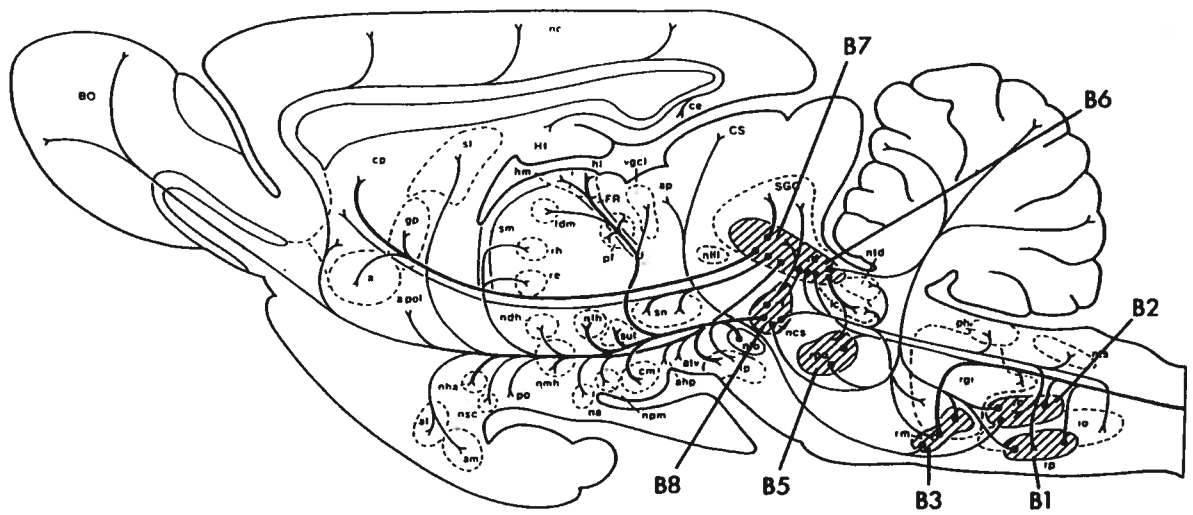
Dans ce contexte, tout avancement des connaissances sur la distribution régionale, et particulièrement la localisation cellulaire et subcellulaire des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, devrait favoriser une meilleure

compréhension de leur(s) rôle physiologique(s), leurs propriétés pharmacologiques et leur(s) mécanisme(s) d'action. Il s'agit donc de l'objectif fondamental de cette thèse. Cependant, pour mieux en apprécier l'intérêt et la portée, il faut d'abord rappeler certaines des caractéristiques fondamentales de l'organisation des systèmes à sérotonine centraux, de même que les données actuelles sur la distribution régionale et la localisation cellulaire et subcellulaire de ses nombreux récepteurs. Ensuite, en complément d'introduction, une revue détaillée des connaissances de la neuropharmacologie, de l'électrophysiologie, des propriétés moléculaires et biochimiques et des capacités adaptatives des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> sera présentée. Ceci permettra de conférer toute leur signification aux objectifs et résultats de la présente recherche.

## **1.2 Organisation anatomique du système à sérotonine dans le SNC**

### **1.2.1 Topographie**

L'identification et la description de l'organisation anatomique des neurones centraux qui synthétisent et utilisent la sérotonine comme neurotransmetteur à été documenté en détail au cours des quarante dernières années, grâce aux techniques de l'histochemie de fluorescence (Dahlström et Fuxe 1964), de la radiographie après capture de sérotonine tritiée (Aghajanian et al., 1966; Calas et al., 1974; Descarries et al., 1975; Chan-Palay 1976; Descarries et Beaudet 1978; Araneda et al., 1989; Parent et al., 1981) et de l'immunohistochemie



**Figure 1.** Projections sérotoninergiques ascendantes et descendantes des noyaux du raphé (selon Steinbush et Nieuwenhuys 1983)

avec des anticorps dirigés contre l'enzyme de biosynthèse (Pickel et al., 1977; Weissmann et al., 1987) ou la sérotonine elle-même (Steinbusch 1981, 1984; Takeuchi et al., 1983). Les corps cellulaires neuronaux contenant la 5-HT sont situés dans le tronc cérébral, constituant les groupes cellulaires B1 à B9 (selon la nomenclature suédoise), au sein des noyaux du raphé (Figure 1). Leurs projections axonales se distribuent profusément à l'ensemble des régions du névraxe, incluant les cavités ventriculaires cérébrales (Parent et al., 1981; Steinbusch 1981; Matsuura et al., 1985; Azmitia et Gannon 1986). Dans les territoires d'innervation, les riches arborisations terminales de ces axones amyéliniques sont munies d'une multitude de « terminaisons » ou varicosités apparaissant comme des renflements ou boutons axonaux, disposées en grains de chapelet le long de leurs ramifications (voir par exemple Törk 1990).

### **1.2.2 Ultrastructure**

Les études initiales de radioautographie en microscopie électronique ont démontré que les varicosités axonales sérotoninergiques se caractérisaient par la présence d'agrégats de vésicules synaptiques associées ou non à un complexe de jonction membranaire synaptique, les reconnaissant formellement comme site présumé de libération du transmetteur (Aghajanian et Bloom 1967; Calas et al., 1974; Descarries et al., 1975; Beaudet et Descarries 1976). Par la suite, leur dénombrement dans plusieurs parties du névraxe a permis d'obtenir des données chiffrées sur les densités régionales et laminaires d'innervation, autorisant une interprétation précise des

données neurochimiques et physiopharmacologiques (Beaudet et Descarries 1976; Soghomonian et al., 1987; Audet et al., 1989; Oleskevich et Descarries 1990).

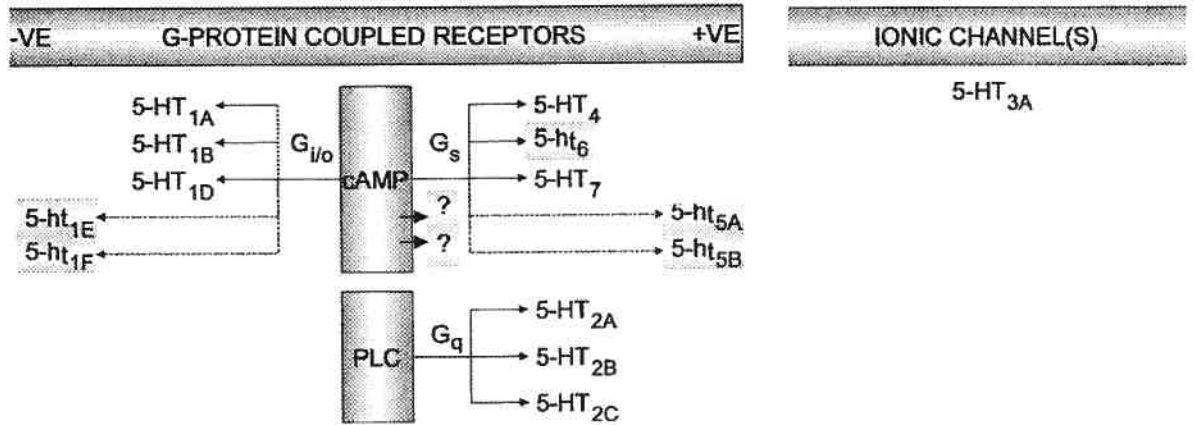
L'étude systématique de la structure fine et des relations intercellulaires de plusieurs innervations sérotoninergiques cérébrales a apporté des données morphologiques d'un intérêt capital dans la compréhension des résultats de la neurochimie, de l'électrophysiologie et de la pharmacologie du système à sérotonine. D'abord en radioautographie puis en immunocytochimie au microscope électronique, il est apparu que dans de nombreux territoires comme le cortex cérébral (Calas et al., 1974; Descarries et al., 1975; Beaudet et Descarries 1976; Séguéla et al., 1989), le cortex cérébelleux (Beaudet et Sotelo 1981), l'hippocampe (Oleskevich et al., 1991), le néostriatum (Soghomonian et al., 1989) et la substance noire (Moukhles et al., 1997), une majorité des terminaisons (ou varicosités) axonales à sérotonine était dépourvue des spécialisations membranaires (complexes de jonction) qui caractérisent classiquement la synapse chimique. Cette particularité a été subséquentement retrouvée dans d'autres régions du cerveau et tant chez le singe que le rongeur (DeFelipe et Jones 1988). Elle a permis à Descarries et coll., de conclure que, dans le système nerveux central, une grande partie des actions de la sérotonine pourrait s'exercer par transmission diffuse, en sus de la transmission synaptique, et probablement sur la glie et les microvaisseaux de même que les neurones (Descarries et al., 1975; Beaudet et Descarries 1976, 1978). Cette hypothèse permettait aussi d'expliquer certains effets

« présynaptiques » (axoniques) de la sérotonine et postulait l'existence de récepteurs sur des régions extrasynaptiques des neurones, qu'il s'agisse de leurs corps cellulaires, leurs dendrites ou leurs axones, de même que sur la glie et les vaisseaux (Beaudet et Descarries 1976, 1978; Soghomonian et al., 1989; Oleskevich et al., 1991).

### **1.3 Les récepteurs à sérotonine du SNC**

#### **1.3.1 La superfamille des récepteurs à sérotonine**

Il est maintenant bien établi que la médiation des effets de la sérotonine fait appel à une grande superfamille de récepteurs dans le SNC. Jusqu'à présent, quatorze types de récepteurs sérotoninergiques, provenant chacun d'un gène différent, ont été identifiés dans le SNC des mammifères (Figure 2; Barnes et Sharp 1999; Roth et al., 2000; Raymond et al., 2001; Hoyer et al., 2002). En plus de cette diversité génomique, plusieurs de ces récepteurs apparaissent exprimés sous plusieurs formes par suite de modifications post-transcriptionnelles : variants d'épissage (*splicing variants*) ou isoformes éditées (*editing isoforms*; voir Hoyer et al., 2002). Tous les récepteurs sérotoninergiques sauf le 5-HT<sub>3</sub>, qui est un récepteur-canal, possèdent la structure moléculaire à sept domaines transmembranaires de récepteurs métabotropes couplés aux protéines G. Des similarités de structure moléculaire, de pharmacologie et des systèmes de transduction ont conduit à leur regroupement en sept familles : de 5-HT<sub>1</sub> à 5-HT<sub>7</sub> (voir Hoyer et Martin 1997).



**Figure 2.** Les récepteurs à sérotonine  
(selon Hoyer et al., 2002)

La famille des récepteurs 5-HT<sub>1</sub> comporte cinq membres : -A, -B, -D, -E et -F. Ceux-ci sont tous dotés d'une affinité relativement haute envers la sérotonine, ne possèdent pas d'introns dans leurs gènes respectifs, et sont couplés négativement à l'adenylate cyclase, inhibant ainsi la formation de l'AMPc (Barnes et Sharp 1999; Roth et al., 2000; Hoyer et al., 2002). Le récepteur 5-HT<sub>1A</sub> est le premier récepteur à sérotonine à avoir été cloné (Kobilka et al., 1987; Fargin et al., 1988), l'un des plus étudiés et des mieux connus (Hoyer et al., 2002). Des travaux récents ont montré que les récepteurs 5-HT<sub>1B/1D</sub> forment des homo- ou hétérodimères (Xie et al., 1999; voir Hoyer et al., 2002).

La famille des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> comporte trois membres : -A, -B et -C. L'affinité du 5-HT<sub>2A</sub> envers la 5-HT est relativement faible et celle des deux autres membres plus élevée (Leysen 1992; voir Roth et Shapiro 2001). Tous trois possèdent au moins deux introns dans leur séquence codante (deux pour les 2A et 2B et trois pour le 2C) et activent la phospholipase C, augmentant ainsi l'hydrolyse des inositol phosphates et la concentration cytosolique du calcium (voir Barnes et Sharp 1999; Roth et al 1998a; Roth et Shapiro 2001; Hoyer et al., 2002). Les trois récepteurs de cette famille contiennent dans leurs séquences respectives un motif consensus pouvant être la cible d'interaction avec des protéines contenant le domaine PDZ (Kornau et al., 1995; Hamblin et al., 1998). Étant le premier « site de liaison sérotoninergique » à avoir été identifié pharmacologiquement dans le SNC (Leysen et al., 1978), le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, comme le 5-HT<sub>1A</sub>, a fait l'objet de très nombreux travaux. Récemment, un isoforme produit par épissage alternatif de



l'ARN messager a été identifié pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> humain (Guest et al., 2000). Un isoforme produit par épissage alternatif (Canton et al., 1996) et au moins quatorze isoformes produites par éditage de l'ARN messager ont été identifiés pour le récepteur 5-HT<sub>2C</sub> (Burns et al., 1997; Fitzgerald et al., 1999). Les isoformes éditées du récepteur 5-HT<sub>2C</sub> possèdent une plus faible efficacité de signalisation (Niswender et al., 1998; Herrick-Davis et al., 1999).

Le récepteur 5-HT<sub>3</sub> manifeste une hétérogénéité fonctionnelle et pharmacologique suggérant l'existence de sous-types. Cependant, du point de vue moléculaire, cette question n'est pas réglée (van Hooft et Yakel 2003). Le récepteur 5-HT<sub>3</sub> est un récepteur canal d'ions cationiques, formé par assemblage de cinq sous-unités (Boess et al., 1995). Au moins trois sous-unités A, B et C ont été clonées (Maricq et al., 1991; Davies et al., 1999; Niesler et al., 2003), mais, hormis la sous-unité A, il n'y a pas de consensus quant à l'implication des autres sous-unités au complexe récepteuriel 5-HT<sub>3</sub> du SNC (van Hooft et Yakel 2003). La sous-unité A se présente sous deux formes, longue (A<sub>l</sub>) et courte (A<sub>s</sub>), produites par épissage alternatif. La forme courte prédomine dans le cerveau (Hope et al., 1993; voir Barnes et Sharp 1999; Hoyer et al., 2002).

Seul membre de sa famille, le récepteur 5-HT<sub>4</sub>, stimule l'adénylate cyclase, augmentant ainsi la production de l'AMPc et conduisant à l'activation de la protéine kinase A (Saudou et Hen 1994; Barnes et Sharp 1999). Le gène du récepteur 5-HT<sub>4</sub> est fortement fragmenté, comportant au moins cinq introns (Bockaert et al., 1998; Barnes et

Sharp 1999; Bender et al., 2000). Huit isoformes produites par épissage alternatif ont été identifiées (Bender et al., 2000; Hoyer et al., 2002). Ces isoformes diffèrent dans l'efficacité de leurs systèmes de transduction (Claeyssen et al., 1999; Pindon et al., 2002), mais il n'est pas certain que leur distribution anatomique respective diffère (Hamblin et al., 1998).

La famille des récepteurs 5-HT<sub>5</sub> comporte deux membres : -A et -B, isolés par clonage moléculaire (Matthes et al., 1993; Erlander et al., 1993; Grailhe et al., 2001). Ils contiennent chacun un intron dans leur gène (Matthes et al., 1993). Bien que les études à l'aide de souris KO-5-HT<sub>5</sub> semblent attester de leur expression *in vivo* (Grailhe et al., 1999), leur démonstration pharmacologique et biochimique (système de transduction) en tant que récepteurs fonctionnels *in vivo* reste encore sous investigation (Barnes et Sharp 1999; Hoyer et al., 2002).

Seul membre de sa famille, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> a été identifié par clonage moléculaire (Sleight et al., 1998; Barnes et Sharp 1999; Branchek et Blackburn 2000). Son gène contient deux introns. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est positivement couplé à l'adenylate cyclase (Branchek et Blackburn 2000) et son rôle fonctionnel *in vivo* a été surtout étudié à l'aide des techniques de traitement avec des oligonucléotides anti-sens (Branchek et Blackburn 2000; Woolley et al., 2001).

Unique aussi de sa famille, le récepteur 5-HT<sub>7</sub> a été identifié fonctionnellement depuis un certain temps comme un récepteur à sérotonine couplé positivement à l'adénylate cyclase. Cloné depuis peu,

son gène contient deux introns (Eglen et al., 1997; Barnes et Sharp 1999). Quatre isoformes ont été identifiées qui semblent partager les mêmes propriétés pharmacologiques (Heidmann et al., 1997, 1998; Krobert et al., 2001). Deux des quatre isoformes du récepteur 5-HT<sub>7</sub> contiennent dans leurs séquences un motif consensus qui pourrait être la cible d'interactions avec des protéines contenant le domaine PDZ (Hamblin et al., 1998).

Le Tableau 1 résume les principales propriétés pharmacologiques de chacun des récepteurs de la sérotonine, ainsi que les implications physiopathologiques probables ou possibles qui leurs sont attribuées.

### **1.3.2 Localisation des divers récepteurs à sérotonine dans le SNC**

On doit essentiellement à trois méthodes cytochimiques les connaissances actuelles sur la distribution régionale et la localisation cellulaire des récepteurs de la sérotonine dans le système nerveux central. L'autoradiographie quantitative des radioligands a permis de déterminer leur distribution et la densité de leurs sites de liaison à l'échelon régional. L'hybridation *in situ* a révélé la distribution anatomique des corps cellulaires neuronaux contenant les ARN messenger(s) respectif(s) à l'échelon de la microscopie photonique. L'immunocytochimie d'anticorps spécifiques a permis, dans certain cas, la visualisation des protéines réceptrices au site même de leur synthèse et/ou de leur utilisation, tant en microscopie électronique que photonique (voir par exemple Radja et al., 1991; Mengod et al., 1996; Vergé et Calas 2000).

**Tableau 1 Caractéristiques pharmacologiques et localisation régionale des récepteurs à sérotonine**

Famille	5-HT <sub>1</sub>							5-HT <sub>2</sub>			5-HT <sub>3</sub>	5-HT <sub>4</sub>	5-HT <sub>5</sub>		5-HT <sub>6</sub>	5-HT <sub>7</sub>
	5-HT <sub>1A</sub>	5-HT <sub>1B</sub>	5-HT <sub>1D</sub>	5-HT <sub>1E</sub>	5-HT <sub>1F</sub>	5-HT <sub>2A</sub>	5-HT <sub>2B</sub>	5-HT <sub>2C</sub>	5-HT <sub>3</sub>	5-HT <sub>4</sub>	5-HT <sub>5A</sub>	5-HT <sub>5B</sub>	5-HT <sub>6</sub>	5-HT <sub>7</sub>		
agonistes (K <sub>i</sub> <10nM)	8-OH-DPAT	Sumatriptan L 694 247	Sumatriptan PNU 109291	—	LY 334 370	DOI	BW 723 C86	RU 600 175	SR 57 227 m-CPPBG	BIMU 8 RS 67 506 ML 10 302	—	—	—	—	—	—
affinité relative envers la 5-HT (K <sub>i</sub> ,nM)	1.9-6.7	2.4-24	1.8-6.2	4	10	500-3000	10	9-30	80-900	100	250	250	50-150	1		
antagonistes (K <sub>i</sub> <10nM)	WAY 100 635	GR 55 562 SB 224 289 SB 236 057	BRL 15 572	—	—	Ketanserine MDL 100 907	SB 200 646 SB 204 741	Mesulergin SB 242 048 RS 102 221	Granisetron Odansetron Tropisetron	GR 113 808 SB 204 070 RS 100 235	—	—	Ro 630 563 SB 271 046 SB 357 134	SB 258 719 SB 269 970		
radioligands	<sup>3</sup> H-WAY100 635 <sup>3</sup> H-8-OH-DPAT	125 <sub>I</sub> -GTI 125 <sub>I</sub> -CYP <sup>3</sup> H-Sumatriptan <sup>3</sup> H-GR 125 743	125 <sub>I</sub> -GTI <sup>3</sup> H-Sumatriptan <sup>3</sup> H-GR 125 743	<sup>3</sup> H-5-HT	125 <sub>I</sub> -LSD <sup>3</sup> H-LY 334370	125 <sub>I</sub> -DOI <sup>3</sup> H-Ketanserine <sup>3</sup> H-MDL 100 9007	<sup>3</sup> H-5-HT	125 <sub>I</sub> -LSD <sup>3</sup> H-Mesulergin	<sup>3</sup> H-Zacopride <sup>3</sup> H-Tropisetron <sup>3</sup> H-Granisetron <sup>3</sup> H-GR 65 630 <sup>3</sup> H-LY 27 85 84	125 <sub>I</sub> -SB 207 710 <sup>3</sup> H-GR 113 808 <sup>3</sup> H-RS 57 639	125 <sub>I</sub> -LSD <sup>3</sup> H-5-CT	125 <sub>I</sub> -LSD <sup>3</sup> H-5-CT	125 <sub>I</sub> -SB 258 585 125 <sub>I</sub> -LSD <sup>3</sup> H-5-HT	125 <sub>I</sub> -LSD <sup>3</sup> H-SB 269 970 <sup>3</sup> H-5-CT <sup>3</sup> H-5-HT		
régions de forte densité	n. du raphé hippocampe septum cortex entorhinal	substance noire globus pallidus striatum cortex frontal	striatum n. accumbens hippocampe	cortex entorhinal striatum claustrum	cortex striatum hippocampe claustrum	cortex frontal hippocampe striatum tube olfactif	cervelet septum hypothalamus amygdale	plexus choroïde cortex hippocampe striatum	NTS area postrema hippocampe cortex	striatum globus pallidus substance noire n. accumbens	cortex bulbe olfactif hippocampe	habenula hippocampe cortex	striatum n. accumbens hippocampe cortex	hypothalamus thalamus hippocampe		
implication pharmaco- thérapeutique probable	dépression anxiété	migraine agression anxiété	migraine agression anxiété	—	migraine	psychoses anxiété	rôles trophiques en périphérie	emesis	apprentissage et mémoire olfactive	—	—	—	—	"jet lag" dépression		

Références: Adham et al., 1993; Barnes et Shap 1999; Battaglia et al., 1984; Glennon et Dukat 1995; Glennon et al., 1991; Hoyer et al., 2002; Peroutka et Snyder 1979; Roth et al., 2000; Westkaemper et Glennon 1993; Zifa et Fillion 1992.

### 1.3.2.1 Distribution régionale

Compte tenu de la distribution ubiquitaire des arborisations axonales à sérotonine dans le SNC, il va sans dire que les divers récepteurs de la sérotonine, quel que soit leur type ou leur sous-type, sont distribués soit dans les noyaux d'origine ou dans les nombreuses régions de projection sérotoninergique (voir Barnes et Sharp 1999). La présence de l'un et/ou l'autre type ou sous-type dans une région anatomique donnée, ainsi que sa(leur) densité relative dans cette région, est cependant distinct pour chacun d'eux (Pazos et Palacios 1985; Pazos et al., 1985; Palacios et al., 1990; 1996; Radja et al., 1991; Laporte et al., 1992; Jakeman et al., 1994; Gustafson et al., 1996; Mengod et al., 1996; Lopez-Gimenez et al., 1997; Waeber et al., 1998; Martin-Cora et Pazos 2004). Les études de localisation par suite de lésion sélective des neurones sérotoninergiques ont montré que la plupart des quatorze types réceptoriels peuvent être qualifiés d'hétérorécepteurs, au sens où ils appartiennent à des neurones non sérotoninergiques (Verge et al., 1986; Waeber et al., 1990; Miquel et al., 1992; Manrique et al., 1993, 1994; Kia et al., 1995; Compan et al., 1996, 1998a,b; Sari et al., 1999). Le 5-HT<sub>1A</sub>, en plus d'être retrouvé comme hétérorécepteur dans plusieurs territoires d'innervation sérotoninergique, agit également comme autorécepteur, puisqu'il a été formellement identifié, par toutes les méthodes disponibles, dans les corps cellulaires et dendrites des neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé (Sotelo et al., 1990; Chalmers et Watson 1991; Riad et al., 1991, 2000, 2001; Miquel et al., 1991, 1992; Gobbi et al., 1994). Cette

localisation particulière rend compte de son rôle de premier plan dans la régulation de l'activité des neurones à sérotonine, dont il contrôle la synthèse, l'activité spontanée et la libération (Blier et al., 1998; Riad et al., 2000, 2001; Bortolozzi et al., 2004). Le 5-HT<sub>1B</sub>, dont l'ARNm est aussi présent dans les neurones à sérotonine du raphé, agirait également comme auto- de même qu'hétérorécepteur, cette fois en localisation préterminale (Doucet et al., 1995; Riad et al., 2000; Adell et al., 2001). Quant au 5-HT<sub>7</sub>, la signification de sa présence dans le raphé dorsalis reste encore sous investigation (Martin-Cora et Pazos 2004; Harsing et al., 2004).

La distribution des récepteurs à sérotonine dans le SNC est résumée au Tableau 1. On y constate que plusieurs régions sont riches de plusieurs types et que peu d'entre elles n'en contiennent qu'un. Dans le cortex cérébral, presque tous les types sont retrouvés. De plus, dans des régions comme le cortex cérébral, l'hippocampe, le striatum, et les noyaux du raphé, il est d'ores et déjà établi que divers types peuvent être co-exprimés par les mêmes neurones (Pompeiano et al., 1994; Wright et al., 1995; Bonaventure et al., 1998). Pour la plupart des types et dans la plupart des régions du SNC, cependant, on ignore encore, quelle est la localisation cellulaire des différents types et sous-types, sur quelle partie des neurones ils se situent, et ce qu'il en est ou non de leur co-expression dans les mêmes cellules ?

### **1.3.2.2 Localisation cellulaire et subcellulaire**

En effet, les études immunocytochimique de la localisation cellulaire et surtout subcellulaire des récepteurs à sérotonine

demeurent limitées. Ceci est surtout dû au manque d'anticorps spécifiques pour de nombreux sous-types, mais aussi aux difficultés d'application des techniques immunocytochimiques reposant sur l'utilisation de marqueurs non diffusibles (comme l'or plutôt que la peroxydase), pour la microscopie électronique. Or seul les marqueurs non diffusibles autorisent une localisation précise à l'échelon subcellulaire et particulièrement membranaire. Récemment, cependant, deux récepteurs de la sérotonine ont pu être ainsi visualisés, tant en microscopie photonique que électronique, laissant entrevoir tout l'intérêt des connaissances de cet ordre.

La localisation ultrastructurale du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> a été étudiée dans le noyau raphé dorsalis, le septum et l'hippocampe, à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre une portion sélective (résidus 343-368) de la séquence du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> du rat (El Mestikawy et al., 1990). Après marquage à l'or, Riad et coll., (2000) ont pu non seulement faire la preuve de la localisation fortement membranaire de ce récepteur somato-dendritique, mais aussi la quantifier et démontrer qu'elle était essentiellement extra-synaptique, aussi bien dans le noyau raphé dorsalis (autorécepteur) que l'hippocampe (hétérorécepteur) (Riad et al., 2000). Par la suite, ces mêmes auteurs ont même pu mettre en évidence une internalisation du récepteur *in vivo*, lors du traitement aigu avec un agoniste sélectif (8-OH-DPAT), ou par suite de l'administration d'un inhibiteur de recapture (fluoxétine). Du fait que cette internalisation est observable dans le raphé dorsalis mais non l'hippocampe, tout comme la désensibilisation provoquée par les mêmes

traitements, il est vraisemblable qu'elle en soit le principal mécanisme responsable (Riad et al., 2001, 2004).

La localisation ultrastructurale du récepteur 5-HT<sub>1B</sub> a été étudiée dans la substance noire et le globus pallidus, ou ce sous-type est connu pour agir principalement comme hétérorécepteur sur les neurones de projection striato-nigraux et striato-pallidaux (Riad et al., 2000). Cette étude a également mis en évidence une localisation à forte prédominance membranaire de ce récepteur, mais cette fois en localisation pré-terminale, sur les fines arborisations amyéliniques de ces axones présumément gabaergiques.

Quelques données ultrastructurales dont la valeur est discutable ont été également rapportées pour les récepteurs 5-HT<sub>2C</sub> (Bancila et al., 1999), 5-HT<sub>3</sub> (Morales et al., 1996; Jakab et Goldman-Rakic 2000) et le 5-HT<sub>6</sub> (Gérard et al., 1997; Brailov et al., 2000).

Quant au récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, aucune information ultrastructurale n'avait été rapportée au moment où les travaux présentés dans cette thèse ont été entrepris.

## **1.4 Le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> de la sérotonine**

### **1.4.1 Neuropharmacologie du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>**

L'essentiel des connaissances actuelles sur les propriétés pharmacologiques du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> proviennent d'études réalisées avec les ligands dont la liste figure au Tableau 2. La sélectivité de ces ligands envers le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est généralement limitée par leur capacité de lier aussi d'autres sites réceptoriels et surtout le récepteur



5-HT<sub>2C</sub>, qui lui est apparenté (voir Leysen 1990; Lopez-Gimenez et al., 1997). Des drogues d'occlusion sont donc nécessaires afin d'isoler les effets proprement 5-HT<sub>2A</sub>.

L'antagoniste kétansérine (Leysen et al., 1982b) a longtemps été considéré comme le plus sélectif envers le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Il a donc été utilisé dans un grand nombre d'études biochimiques, autoradiographiques et comportementales. Son affinité est 140 fois plus élevée pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> que pour le 5-HT<sub>2C</sub> (Leysen 1990). Dans le striatum, cependant, la kétansérine se lie aussi à des sites à haute affinité pour le DOPAC (Tableau 2; Leysen et al., 1987; Roth et al., 1987). L'antagoniste MDL100,907 (Palfreyman et al., 1993; Johnson et al., 1996), également disponible sous forme tritiée, est un composé plus récent qui semble plus sélectif. Son affinité est 300 fois plus élevée pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> que pour le 5-HT<sub>2C</sub> et elle est négligeable vis-à-vis d'autres récepteurs monoaminergiques (Palfreyman et al., 1993). Sa forme [<sup>11</sup>C]MDL100,907 est déjà utilisé pour des études de visualisation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le cerveau vivant du singe et de l'humain en tomographie par émission de positrons (TEP; Lundkvist et al., 1996; Ito et al., 1998; Kakiuchi et al., 2000 Talvik-Lotfi et al., 2000). Les agonistes comme le DOI et le DOB possèdent une sélectivité 100 fois plus élevée envers le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> que le récepteur 5-HT<sub>2C</sub> (Tableau 2; Titeler et al., 1988). L'étude de la liaison aux agonistes a révélé que la population de récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> se présente sous deux états d'affinité : un état de haute affinité (ex.  $K_i \sim 0.39$  nM du DOB pour les sites 5-HT<sub>2A</sub> marqués par le <sup>3</sup>H-DOB; Lyon et al., 1987) et un

**Tableau 2. Sélectivité des radioligands 5-HT<sub>2A</sub>**

5-HT <sub>2A</sub> (K <sub>i</sub> , nM)	Autres sites de liaison (K <sub>i</sub> , nM)
<p>antagonistes</p> <p><sup>3</sup>H-MDL 100 907 (0.36)<sup>b</sup>  <sup>3</sup>H-ketanserin (0.38)<sup>a</sup>  <sup>3</sup>H-spiperone (0.46)<sup>a</sup>  <sup>3</sup>H-mianserin (1.5)<sup>a</sup>  <sup>3</sup>H-mesulergin (3.2)<sup>a</sup></p> <p>agoniste-antagoniste mixte</p> <p><sup>3</sup>H-LSD, <sup>125</sup>I-LSD (0.54)<sup>c</sup></p> <p>agoniste</p> <p><sup>3</sup>H-DOB, <sup>77</sup>Br-DOB (0.39)<sup>c</sup>  <sup>125</sup>I-DOI (0.70)<sup>c</sup></p>	<p>5-HT<sub>2C</sub> (105)<sup>b</sup>  H<sub>1</sub> (0.36)<sup>a</sup>, 5-HT<sub>2C</sub> (54)<sup>a</sup>, sites DOPAC  D<sub>2</sub> (0.26)<sup>a</sup>, 5-HT<sub>1A</sub> (nd)  H<sub>1</sub> (0.58)<sup>a</sup>, 5-HT<sub>2C</sub> (4.3)<sup>a</sup>  5-HT<sub>2C</sub> (1.4)<sup>a</sup></p> <p>D<sub>2</sub> (nd), 5-HT<sub>1A</sub> (0.43)<sup>c</sup>, 5-HT<sub>2C</sub> (3.8)<sup>c</sup></p> <p>5-HT<sub>2C</sub> (47)<sup>c</sup>  5-HT<sub>2C</sub> (30)<sup>c</sup></p>

**Abbreviations:** DOB : 4-bromo-(2,5-dimethoxy)phenylisopropylamine; DOI : 4-iodo-(2,5dimethoxy) phenylisopropylamine; DOPAC : dihydroxyphenylacetic acid; K<sub>i</sub>: constante d'affinité; LSD : lysergic acid diethylamide; MDL 100 907 : 2,3-dimethoxyphenyl-1-[2-(4-piperidine)-methanol]; nd : non disponible dans les mêmes conditions; nM : nanomolaire.

**Références:** <sup>a</sup> Leysen 1992; <sup>b</sup> Palfreyman et al.,1993; <sup>c</sup> Titeler et al., 1988.

état de basse affinité (ex.  $K_i \sim 24$  nM du DOB pour les sites marqués par l'antagoniste  $^3\text{H}$ -kétanserin; Lyon et al., 1987). Il est à noter que les antagonistes ne discriminent pas entre ces deux états d'affinité et reconnaissent une population uniforme de récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> avec une affinité équivalente (ex.  $K_i \sim 1.25$  nM de la kétansérine pour les sites 5-HT<sub>2A</sub> marqués, soit avec la  $^3\text{H}$ -kétansérine soit avec le  $^3\text{H}$ -DOB; Lyon et al., 1987).

L'état de haute affinité est celui d'une faible proportion de la population totale des sites de liaison au récepteur 5-HT<sub>2A</sub> ( $\sim 10$  %, selon l'agoniste) et il est modulé par les nucléotides guanylés. Il s'agirait d'une conformation du récepteur activé, couplé aux protéines G (Lyon et al., 1987; Branchek et al., 1990; Teitler et al., 1990; Leonhardt et al., 1992; Sleight et al., 1995; Lopez-Gimenez et al., 2001). Dans le tissu cérébral de rat, la sérotonine se lie à cette conformation avec une affinité nanomolaire qui représenterait  $\sim 5$  à  $10$  % de la population totale des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> (Battaglia et al., 1984; Lyon et al., 1987; Glennon et al., 1988; McKenna et Peroutka 1989; Leonhardt et al., 1992). Tel que déjà mentionné, la conformation majoritaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, initialement identifié par les antagonistes, présente une faible affinité envers la sérotonine ( $K_i \sim 500$  nM; Leysen et al., 1978; Peroutka et Snyder 1979; Battaglia et al., 1984).

#### **1.4.2 Effets biologiques et/ou thérapeutiques des drogues liant le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>**

Chez les rongeurs, les études comportementales par suite de l'administration d'agonistes et/ou d'antagonistes, laissent supposer une

activation des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> lors de certains comportements d'excitation motrice comme le « *head-shake* », ainsi que dans l'hyperthermie, la facilitation du comportement sexuel femelle et l'hypophagie (voir Glennon et Lucki 1988; Wilkinson et Dourish 1991; Willins et Meltzer 1997). De plus, une interaction fonctionnelle entre les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et 5-HT<sub>2A</sub> a été mise en évidence dans plusieurs de ces comportements (Pranzatelli et Pluchino 1991; Willins et Meltzer 1997).

Chez l'humain, de nombreuses drogues ayant des effets agonistes envers le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, telles que les indoleamines (LSD, psilocybine) et les phenéthylamines (DOM, DOB, DOI), produisent des hallucinations. Telle que déterminée *in vitro* sur des préparations membranaires du cortex de rat, l'affinité de liaison de ces agents pharmacologiques au récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est étroitement corrélée à leur puissance hallucinogénique chez l'humain (Glennon et al., 1984; voir revue de Glennon 1996).

Des études plus récentes d'imagerie cérébrale par TEP ont montré que les symptômes psychotiques induits par la psilocybine sont significativement corrélés avec l'augmentation du métabolisme cérébral du glucose dans le cortex frontal, cingulé et temporal (Vollenweider et al., 1997) et que ces effets psychotiques sont dus principalement à l'activation des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> (Vollenweider et al., 1998). Même si plusieurs drogues hallucinogènes montrent aussi une affinité particulière envers d'autres récepteurs, comme le 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> et 5-HT<sub>5A</sub>, l'activation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> semble dominante en termes

d'hallucinoïse (Fiorella et al., 1995; Grailhe et al., 1999; Nelson et al., 1999) probablement en raison d'une modulation de la transmission glutamatergique dans le néocortex (Aghajanian et Marek 1999a, 2000; Gewirtz et Marek 2000). Il est intéressant de noter que les traitements (avec des IMAO ou ISRS) qui élèvent la 5-HT endogène ne produisent pas d'hallucinations et pourraient même atténuer les effets subjectifs des hallucinogènes chez l'humain. Ces effets seraient dus à l'action de la 5-HT sur des récepteurs sérotoninergiques autres que le 5-HT<sub>2A</sub> (Aghajanian et Marek 1999b). Par ailleurs, la stimulation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> semble également impliquée dans des processus pro-cognitifs chez le rat (Meneses 2002) et le singe, et notamment le renforcement de la mémoire procédurale (*working memory*) (Williams et al., 2002). Une étude génétique récente, montre qu'une variation génétique fonctionnelle du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> influence la mémoire épisodique chez l'humain (de Quervain et al., 2003).

Même si l'administration d'antagonistes 5-HT<sub>2A</sub> à des animaux normaux ne semble pas s'accompagner de changements neurophysiologiques ou comportementaux très marqués, on lui attribue certaines perturbations du sommeil (augmentation du sommeil lent et diminution du sommeil paradoxal) et une forme de désinhibition à l'égard des stimuli aversifs (Leysen 1990, 1992). Par contre, une grande variété de drogues ayant des propriétés antagonistes envers le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> possèdent des vertus thérapeutiques (Leysen 1990, 1992; Roth et al., 2000). Il en est ainsi de certains antidépresseurs et surtout des antipsychotiques atypiques (Roth et al., 1999; Roth et

Shapiro 2001). Sans être sélectifs, plusieurs antidépresseurs lient les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> avec une haute affinité (Palvimaki et al., 1996; Roth et al., 1998a, 2000; Van Oekelen et al., 2003). Il reste à démontrer dans quelle mesure le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> participe à leur action thérapeutique (voir Roth et al., 1998a et Roth et Shapiro 2001). Quant aux antipsychotiques atypiques (clozapine, olanzapine, risperidone, quetiapine), ils sont plus efficaces que les antipsychotiques classiques car ils entraînent peu ou pas d'effets extrapyramidaux et ne produisent pas d'hyperprolactinémie. Plusieurs de ces composées améliorent les fonctions cognitives; la clozapine, en particulier, est efficace chez des patients réfractaires aux traitements avec les antipsychotiques typiques (voir Kapur et Seeman 2001; Meltzer 2004). Bien que leur pharmacologie soit complexe (Roth et al., 1998b; Rauser et al., 2001), beaucoup d'antipsychotiques atypiques présentent des affinités plus élevées envers les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> qu'envers les récepteurs dopaminergiques de type D<sub>2</sub> (Roth et al., 1998b; Meltzer 1999, 2004; Roth et Shapiro 2001; Meltzer et al., 2003). Selon Meltzer et coll., le blocage des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> jouerait un rôle important dans le caractère atypique de ces composées. Ces auteurs supposent un équilibre entre l'occupation des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> et celle des récepteurs D<sub>2</sub>, qui résulterait d'une affinité relativement élevée envers le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (et probablement d'autres récepteurs à sérotonine) et relativement moindre envers le récepteur D<sub>2</sub> (Meltzer 1999, 2004; Meltzer et al., 2003). Cette hypothèse reste toutefois controversée (voir Kapur et Seeman 2001; Kapur et Mamo 2003).

### 1.4.3 Effets électrophysiologiques médiés par le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le SNC

L'activation locale des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> dans le cortex frontal induit soit une augmentation soit une diminution de l'excitabilité de neurones pyramidaux présumés ou identifiées (Ashby et al., 1990; Araneda et Andrade 1991; Ashby et al., 1994; Aghajanian et Marek 1997, 1999b; Zhou et Hablitz 1999). Les effets excitateurs de la sérotonine ou du DOI seraient alors imputables à une action directe sur les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, tandis que les effets inhibiteurs impliqueraient des interneurones GABAergiques (Aghajanian et Marek 1997; Zhou et Hablitz 1999). L'administration systémique de DOI induit des excitations et des inhibitions des neurones pyramidaux du cortex préfrontal médiées par le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, avec une augmentation de 240% de leur taux de décharge moyen (Puig et al., 2003). Cette prédominance d'effets excitateurs dans le cortex est en accord avec l'augmentation de la relâche de sérotonine mesurée par microdialyse dans le cortex préfrontal du rat, après application locale de DOI (Martin-Ruiz et al., 2001; Puig et al., 2003).

Même si l'approche de microdialyse ne permet pas de discerner quel sous-ensemble de récepteurs médie l'action du DOI sur la relâche de 5-HT, la plus forte proportion de récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> sur les neurones pyramidaux par rapport aux neurones GABAergiques (voir Amargos-Bosch et al., 2004) et l'effet globalement excitateur du DOI sur le taux de décharge des cellules pyramidales *in vivo* suggèrent que l'action de la sérotonine sur les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> des cellules pyramidales soit

prédominante par rapport à celle qu'elle exerce sur les cellules GABAergiques (Bortolozzi et al., 2003).

#### **1.4.4 Caractéristiques moléculaires et biochimiques du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>**

##### **1.4.4.1 Structure moléculaire**

Le clonage du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> a été réalisé une dizaine d'années après son identification pharmacologique. Pritchett et coll. (1988) ont été les premiers à cloner le gène du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> du rat, suivis, en 1990, par Julius et coll., qui ont apporté une légère correction (délétion d'un nucléotide) à la séquence décrite par Pritchett. Le clonage chez d'autres espèces a suivi peu après : hamster, humain, souris, singe (voir Gerhardt et Van Heerikhuizen 1997). Le gène du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> contient deux introns, dont la position est la même dans les gènes des deux autres membres de la famille 5-HT<sub>2</sub> (voir Gerhardt et Van Heerikhuizen 1997). Un isoforme produit par épissage alternatif de l'ARNm du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> humain a été récemment identifié (Guest et al., 2000), mais sa signification biologique reste inconnue.

La séquence oligonucléotidique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> encode une protéine de 471 acides aminés, laquelle appartient structurellement (Pritchett et al. 1988; Julius et al. 1990) à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). La modélisation de ces protéines (Baldwin 1994) prédit sept domaines hydrophobes traversant la membrane, avec trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires, l'extrémité N-terminale en extracellulaire et l'extrémité C-terminale en intracellulaire (Figure 3). Le poids



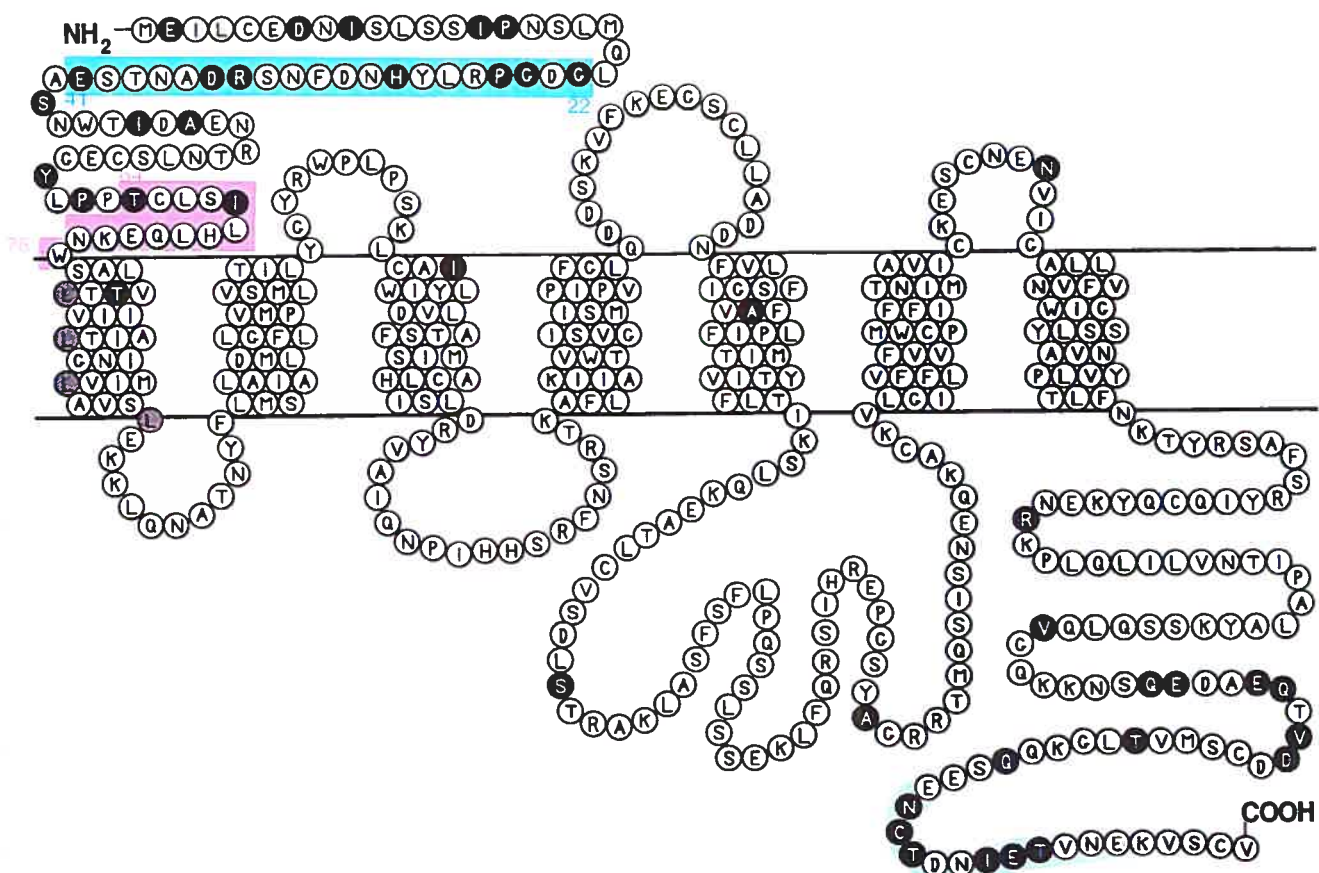
moléculaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, calculé à partir de sa séquence en acides aminés chez le rat, est de 53 kD, ce qui concorde avec le poids moléculaire de 55-60 kD estimé par des études d'inactivation par radiation (Gozlan et al., 1986) et de 67-80 kD estimé après solubilisation du récepteur (Wouters et al., 1987).

#### **1.4.4.1.1 Sites potentiels de glycosylation**

Cinq sites potentiels de glycosylation N-liée (N-X-S/T) sont présents dans l'extrémité N-terminale du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (Saltzman et al., 1991). Jusqu'à maintenant, il n'y a pas eu d'étude expérimentale de la glycosylation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>.

#### **1.4.4.1.2 Sites potentiels de phosphorylation**

Il y a trente-sept résidus Sérine (S) et Thréonine (T) dans les domaines intracellulaires putatifs du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Ceux-ci pourraient constituer autant de sites potentiels de phosphorylation (Gray et al., 2003b), dont au moins quatre font partie des séquences consensus de la phosphokinase C (PKC; Vouret-Craviari et al., 1995; Gray et al., 2003b). Jusqu'à présent, aucune étude n'a montré la phosphorylation de ces sites par la PKC ou d'autres kinases connues. Au contraire, une étude sur des chimères 5-HT<sub>2A</sub>/récepteur thrombine a conclu que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> n'est pas phosphorylé par la PKC (Vouret-Craviari et al., 1995). Par ailleurs, des études de mutagenèse ont révélé que les sites S188 et S421 sont essentiels à la désensibilisation du récepteur induite par les agonistes (Gray et al., 2003b). Ces sites ne correspondent cependant pas à des séquences de



**Figure 3.** Séquence en acides aminés du récepteur 5-HT2A de rat (selon Hartig et al., 1990)

- leucine zipper
- séquence de liaison aux domaines PDZ
- différent chez l'humain

● monoclonal : aa 1-76, épitope 64-76 (Wu et al., 1998)

● polyclonal : aa 22-41 (Roth et al., 1995)

phosphorylation consensus pour des kinases connues (Gray et al., 2003b).

#### 1.4.4.1.3 Autres sites ou séquences d'intérêt

Dans son premier domaine hydrophobe, le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> possède une séquence périodique de résidus Leucine (Hartig et al., 1990) appelée « *Leucine zipper* ». La signification de l'existence d'une telle séquence dans le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> reste inconnue, mais dans d'autres protéines, celle-ci semble faciliter la dimérisation (voir Hartig et al., 1990). Il est intéressant de constater que le récepteur 5-HT<sub>1A</sub> possède aussi une telle séquence dans son troisième domaine hydrophobe (voir Hartig et al., 1990).

Dans son extrémité C-terminale, le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> contient la séquence V-S-C-V (Kornau et al., 1995), un motif potentiellement impliqué dans des interactions protéine-protéine avec des protéines contenant le domaine PDZ (*postsynaptic density / disc large / zona occludens-1*). Ces protéines, à domaine PDZ, sont en général reconnues comme ayant des fonctions dans l'assemblage des complexes de signalisation, le trafic et le ciblage des RCPG, ainsi que la modulation de la fonction de certains canaux ioniques (voir Xia et al., 2003a et b; Bécamel et al., 2004). Par une approche protéomique associant la chromatographie d'affinité et la spectroscopie de masse, il a été montré récemment (Bécamel et al., 2001; 2004) que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> interagit *in vitro*, avec quatre protéines contenant le domaine PDZ : MUPP1 (*multi-PDZ-domain protein-1*), CIPP (*channel interacting PDZ domain protein*), MPP-3 (*membrane-associated guanylate kinase p55*

*subfamily member-3*) et PSD-95 (*postsynaptic density protein-95*). D'autres travaux indiquent que la protéine PSD-95 interagit directement avec le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, dont elle semble moduler la signalisation et le trafic dans des cellules transfectées *in vitro* (Xia et al., 2003a).

#### 1.4.4.2 Couplage aux messagers intracellulaires

La voie de transduction intracellulaire la plus étudiée et la mieux connue du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le tissu nerveux ou d'autres tissus est celle de l'activation de la phospholipase C avec hydrolyse subséquente des phosphoinositides. Le couplage du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> avec une protéine G (G<sub>q</sub>) active la phospholipase C, qui hydrolyse les phosphatidylinositides en inositol triphosphate et diacylglycerol. L'inositol triphosphate augmente la concentration du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et le diacylglycerol active la protéine kinase C (PKC; voir Sanders-Bush et Canton 1995; Szele et Pritchett 1993; Oksenberg et al., 1995; Raymond et al., 2001).

D'autres voies de signalisation ont été décrites pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans certains types cellulaires *in vitro* (Raymond et al., 2001). Dans des neurones hippocampiques, l'activation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> stimule la relâche d'acide arachidonique via l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub>, indépendamment du métabolisme des phosphoinositides (Felder et al., 1990). Dans des myoblastes de muscle squelettique de fœtus de rat, le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> active la voie de phosphorylation intracellulaire des cytokines Jak/STAT (*Janus kinase / signal transducers and activators of transcription*), conduisant à

l'augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la différenciation myogénique (Guillet-Deniau et al., 1997). Dans des cellules du muscle lisse vasculaire et des cellules rénales, la stimulation des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> active la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), menant, dans les cellules rénales, à l'induction des gènes à expression précoce PGHS-2 (*prostaglandin G/H synthase-2*) et *egr-1* (*early growth response gene*) ou du facteur de croissance TGF-beta1 (*transforming growth factor-beta1*; Florian et Watts 1998; Goppelt-Struebe et Stroebel 1998; Watts 1998; Goppelt-Struebe et al., 1999; Grewal et al., 1999; Greene et al., 2000).

#### **1.4.4.3 Modulation de l'expression de gènes via le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>**

Plusieurs études *in vivo* ont montré que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> module l'expression de certaines protéines dans différentes régions du cerveau. Ainsi, l'activation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> entraîne l'induction des gènes à expression précoce *c-fos* (*Finkel-Biskis-Jinkins murine osteogenic sarcoma*), *ngflc* (*nerve growth factor inducible 1c*) et *tis1* (*12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate inducible sequence 1*) dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet (Tilakaratne et Friedman 1996; Scruggs et al., 2000). Elle augmente l'expression d'un autre gène précoce, *Arc* (*activity regulated cytoskeleton associated protein*), localisé aux dendrites dans le cortex cérébral et le striatum, mais non l'hippocampe (Pei et al., 2000). Au cours de cette étude, ces auteurs ont aussi montré que cet effet médié par le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dépend d'une augmentation de la sérotonine endogène (Pei et al., 2000). Dans le

striatum et le noyau accumbens, le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> modulerait l'expression de la dynorphine (Mijnster et al., 1998). Dans le cortex cérébral mais pas dans l'hippocampe du rat, son activation par administration de DOI augmente l'expression du facteur neurotrophique BDNF (*brain-derived neurotrophic factor* ; Vaidya et al., 1997; Zetterström et al., 1999).

### **1.4.5 Régulation des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>**

#### **1.4.5.1 Réponses adaptatives: études *in vivo***

Plusieurs études expérimentales ont démontré que le traitement chronique avec des drogues ayant des propriétés agonistes ou antagonistes envers le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, entraîne une régulation à la baisse de la densité des sites réceptoriels 5-HT<sub>2A</sub> dans le cerveau, telle que mesurée par radioliation (voir Eison et Mullins 1996; Gray et Roth 2001; Van Oekelen et al., 2003). Comme les niveaux d'ARNm du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> mesurés dans le cortex cérébral par suite de traitement chronique avec le DOI (agoniste) ou la miansérine (antagoniste) sont inchangés (Roth et Ciaranello 1991; Anji et al., 2000), ceci suggère des changements de la vitesse de synthèse et/ou de dégradation des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> (Anji et al., 2000; Gray et Roth 2001). Après l'arrêt du traitement chronique à l'agoniste et/ou l'inactivation irréversible du récepteur, la densité des sites 5-HT<sub>2A</sub> met plusieurs jours à revenir au niveau témoin, ce qui a permis d'estimer la demi-vie du récepteur à 3-5 jours (voir Van Oekelen et al., 2003).

Le traitement aigu (une seule injection) avec l'agoniste DOI n'entraîne pas de changements de la densité des sites de liaison 5-HT<sub>2A</sub>

dans le cortex cérébral après 24 heures (McKenna et al., 1989; Buckholtz et al., 1988; Anji et al., 2000). Une réduction transitoire de l'ARNm du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est cependant observée 1 h après l'injection de DOI, avec des niveaux d'ARNm revenant à la normale après 3 h (Anji et al., 2000). Bien que cette réduction transitoire de l'ARNm soit bloquée par un prétraitement avec l'antagoniste kétansérine, il faut noter qu'une baisse significative de la densité des sites de liaison 5-HT<sub>2A</sub> a également été rapportée, de 1 h à 6 h post-injection par suite de l'administration de kétansérine ou de miansérine seule (Sanders-Bush et al., 1987; Smith et al., 1990; Hensler et Truet 1998; Anji et al., 2000). Dans ces conditions également, les niveaux d'ARNm montrent une diminution transitoire, 1h après l'injection, pour revenir à la normale après 3 h puis diminuer de nouveau en fonction du temps (Anji et al., 2000). Ces auteurs suggèrent que l'occupation des récepteurs soit par l'agoniste soit par l'antagoniste serait responsable de la diminution transitoire de l'ARNm (Anji et al., 2000).

D'une façon générale, la réponse du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> aux agonistes évoque une réponse classique des RCPG, tandis que sa réponse aux antagonistes est paradoxale. En effet, lors d'un traitement aux antagonistes, la plupart des RCPG répondent par une augmentation de la densité de leurs sites de liaison (Sanders-Bush 1990; Freedman et Lefkowitz 1996).

Les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> peuvent aussi être modulés d'une façon hétérologue. L'administration aiguë d'agonistes sélectifs des récepteurs

5-HT<sub>1A</sub> inhibe la réponse comportementale à l'activation des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>. De plus, l'administration chronique d'agonistes sélectifs du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> s'accompagne d'une régulation à la baisse du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le cortex cérébral. Cette action des agonistes 5-HT<sub>1A</sub> persiste après dénervation sérotoninergique, suggérant que l'influence sur la sensibilité des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> soit le résultat d'une stimulation de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> postsynaptiques (voir Eison et Mullins 1996).

#### **1.4.5.1.1 Régulation par les antipsychotiques**

De nombreux antipsychotiques typiques et atypiques entraînent une régulation à la baisse des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> (voir Gray et Roth 2001; Van Oekelen et al., 2003). Des composées comme l'haloperidol, qui montrent peu d'affinité envers le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, n'entraînent pas de changement de la densité de ses sites de liaison, mais il en est aussi de même de la risperidone qui présente une forte affinité envers le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Gray et Roth (2001) en concluent qu'un effet antagoniste puissant des antipsychotiques envers le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est nécessaire mais non suffisant pour induire une régulation à la baisse des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> (Gray et Roth 2001).

#### **1.4.5.1.2 Régulation par les antidépresseurs**

Plusieurs antidépresseurs entraînent une régulation à la baisse des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> (Gray et Roth 2001; Van Oekelen et al., 2003). Les niveaux d'ARNm du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> restent cependant inchangés par suite de traitement chronique avec la miansérine ou l'imipramine (Roth et Ciaranello 1991; Burnet et al., 1994; Anji et al., 2000). La



plupart des antidépresseurs ont des actions antagonistes envers le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, ce qui pourrait expliquer cette réponse. Cependant les inhibiteurs de la monoamine oxidase, qui n'ont pas d'affinité envers le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, entraînent également une régulation à la baisse du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (voir Van Oekelen et al., 2003). Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) ont très peu (fluoxétine, sertraline) ou pas (citalopram, paroxétine) d'affinité envers le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (Palvimaki et al., 1996; Van Oekelen et al., 2003). Les résultats rapportés par suite de traitement chronique aux ISRS diffèrent d'une étude à l'autre. Pour la fluoxétine et le citalopram, des régulations à la baisse, à la hausse ou pas de changement ont été rapportés (Gray et Roth 2001; Van Oekelen et al., 2003). Des différences dans la durée des traitements ou dans le mode d'action des agents utilisés pourraient expliquer ces données contradictoires (Gray et Roth 2001). Il est intéressant de noter que des souris dont le gène du transporteur de la sérotonine est invalidé montrent également une baisse de la densité des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> à l'âge adulte (Rioux et al., 1999).

#### **1.4.5.1.3 Dénervation sérotoninergique ou traitement avec la PCPA**

Plusieurs études ont montré qu'il n'y avait pas de changement de densité des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, tel que mesuré par radioliation avec l'antagoniste [<sup>3</sup>H]ketanserin, après lésions des neurones sérotoninergiques induites par la neurotoxine 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) ou déplétions de sérotonine induites par inhibition de sa synthèse avec la *para*-chlorophénylalanine (PCPA; Conn et Sanders-

Bush 1986; Fischette et al., 1987; Compan et al., 1998b). L'hydrolyse des phosphoinositides induite par la 5-HT reste également inchangée dans ces paradigmes (Conn et Sanders-Bush 1986).

Cependant, une autre étude plus récente montre dans le cortex cérébral, qu'une lésion d'environ 90% des neurones sérotoninergiques n'entraîne pas de changement de densité des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, tel que mesuré avec l'agoniste [<sup>125</sup>I]DOI (Compan et al., 1998a,b). Par contre, dans la même étude, ils mesurent une diminution d'environ 25% de la liaison du [<sup>125</sup>I]DOI suite à une dénervation encore plus sévère qu'ils appellent complète (de plus de 95%). Ils expliquent qu'une dénervation de moins de 90% n'est pas suffisante pour entraîner un changement dans la densité des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, ainsi que d'autres récepteurs à sérotonine, étant donné l'extrême plasticité et pouvoir compensatoire des axones sérotoninergiques restants (Compan et al., 1998a,b; Vanderwolf et al., 1990). Ce résultat rejoint un ancien résultat de Leysen et al., 1982a, qui montre aussi une diminution de 30% de la liaison de la [<sup>3</sup>H]ketansérine dans le cortex préfrontal, 4 jours suivant une bi-section cérébrale (Leysen et al., 1982a).

#### **1.4.5.2 Mécanismes biochimiques et moléculaires**

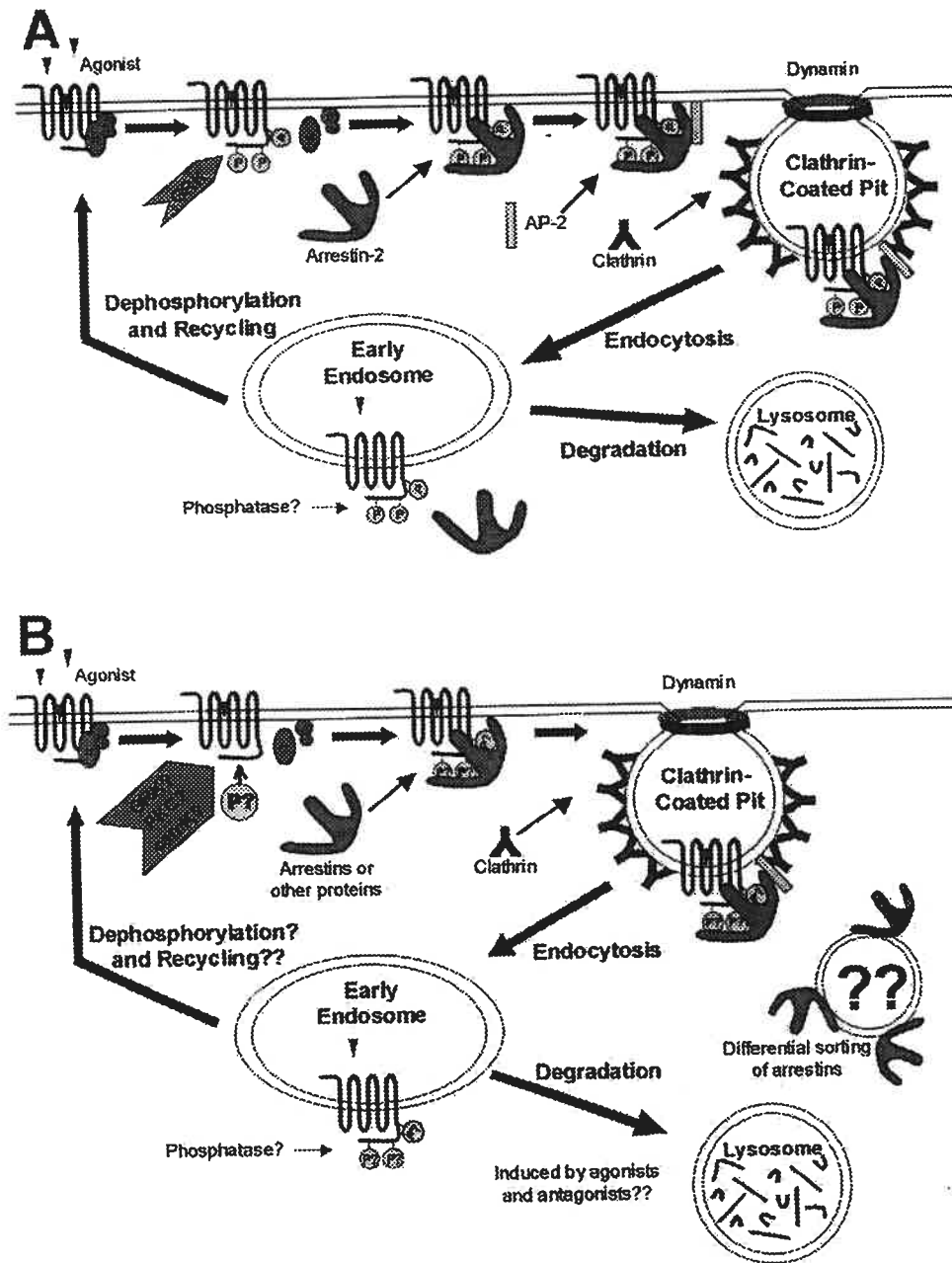
Les mécanismes moléculaires et biochimiques sous-jacents à la régulation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> par les agonistes et les antagonistes demeurent obscurs, malgré de nombreuses études *in vivo* et surtout *in vitro* (Gerhardt et van Heerikhuizen 1997; Roth et al., 1998a; Gray et Roth 2001; Van Oekelen et al., 2003). Les études *in vitro* sont compliquées du fait que les réponses varient en fonction du système

cellulaire utilisé (Grotewiel et Sanders-Bush 1994). Peu d'étapes de la régulation par les antagonistes sont connues. Quant à la régulation par les agonistes (Figure 4), les explications qu'on en donne actuellement s'appuient sur le modèle proposé pour le récepteur  $\beta_2$  adrénergique, prototype des récepteurs de la famille des RCPG (voir Gray et Roth 2001). Certaines similitudes mais plusieurs différences avec ce modèle sont notées (Figure 4A et B) :

1) La phosphorylation du récepteur par les GRKs (*G protein-coupled receptor kinases*), qui survient généralement au cours de la désensibilisation homologe des RCPG, ne semble pas se produire dans le cas de la désensibilisation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Par contre, les GRKs pourraient agir directement sur la protéine Gq (Gray et al., 2001).

2) *In vitro*, l'internalisation des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> par les agonistes, et aussi par les antagonistes, est dépendante de la dynamine, mais pas de l'arrestine, contrairement à celle de la plupart de RCPG (Bhatnagar et al., 2001; Gray et al., 2001; Gray et al., 2003a). La relation entre l'arrestine et le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> demeure d'ailleurs ambiguë (Gray et Roth 2001) : alors que l'arrestine purifiée lie le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> *in vitro* (Gelber et al., 1999), l'activation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> induit une redistribution de l'arrestine dans des compartiments cellulaires différents de celui du récepteur (Bhatnagar et al., 2001).

3) *In vivo*, Willins et coll (1999) observent en microscopie à fluorescence confocale qu'un traitement chronique avec la clozapine



**Figure 4.** Modèle actuel du mécanisme moléculaire de la régulation des RCPG. A) Modèle prototype du récepteur  $\beta_2$  adrénergique B) Modèle proposé pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. (selon Gray et Roth 2001)

augmente l'immunoréactivité 5-HT<sub>2A</sub> intra-somatique tout en la diminuant dans les dendrites apicales des cellules pyramidales du cortex préfrontal. Ils concluent que la clozapine induit une redistribution des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> *in vivo* (Willins et al., 1999). Cette internalisation et redistribution aurait comme but ultime la dégradation des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> dans les lysosomes (Gray et Roth 2001).

4) Bon nombre d'études *in vivo* et *in vitro* ont suggéré une implication de la PKC (kinases dépendantes des seconds messagers) dans certains aspects de la désensibilisation (Roth et al., 1986, 1995; Vouret-Craviari et al., 1995; Gray et al., 2003b), de l'internalisation (Bhattacharyya et al., 2002) et de la régulation à la baisse du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (Anji et al., 2001). Le mécanisme en cause reste cependant à démontrer, car la PKC ne semble pas phosphoryler les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> directement (Vouret-Craviari et al., 1995; Gray et al., 2003b).

#### **1.4.5.3 Changements de densité des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> dans des états pathologiques**

Malgré plusieurs données contradictoires rapportées dans la littérature, la majorité des études sur des cerveaux postmortem de patients schizophrènes montrent une diminution de la liaison des radiologands au récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le cortex préfrontal dorsolatéral (Dean 2003). Les études d'imagerie cérébrale de patients schizophrènes rapportent soit aucun changement, soit une diminution des densités corticales du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (Ngan et al., 2000; Dean 2003). Malgré une diminution naturelle des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> avec l'âge, des études

postmortem ou d'imagerie cérébrale rapportent une diminution significative des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> dans le neocortex des patients Alzheimer (Versijpt et al., 2003).

Certaines, mais pas toutes les études postmortem suggèrent une augmentation significative des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> dans le cortex préfrontal dorsolatéral des suicidés (Mann 1999; Pandey et al., 2002; Stockmeier 2003; Rosel et al., 2004). Un rapport récent en TEP rapporte une augmentation du potentiel de liaison aux récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> dans le cortex préfrontal dorsolatéral chez les dépressifs ayant un score élevé de pessimisme, mais pas chez les autres dépressifs (Meyer et al., 2003; Stockmeier 2003).

Curieusement, les traitements chroniques de l'animal normal avec des antipsychotiques et certains antidépresseurs, entraînent des régulations à la baisse du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (voir ci-haut). Des traitements aux électrochocs (electroconvulsive seizures) d'animaux normaux entraînent des régulations à la hausse du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (Butler et al., 1993). On peut alors se demander par quel mécanisme passe leur effet bénéfique ?

### **1.5 Objectifs de la recherche**

Quand nous avons entrepris nos travaux, l'information sur la distribution anatomique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le SNC provenait principalement des études d'autoradiographie (Pazos et al., 1985; Appel et al., 1990; Mengod et al., 1990) et d'hybridation *in situ* (Mengod et al., 1990; Pompeiano et al., 1994; Wright et al., 1995). En effet, les études immunocytochimiques ciblant le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> en étaient à leur

début, et une première série de publications reposait sur l'utilisation d'un anticorps dont la sensibilité et la spécificité *in situ* pouvaient être mises en doute, ne montrant qu'une faible corrélation avec la localisation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> décrite par les études d'autoradiographie et/ou d'hybridation (Morilak et Ciaranello 1993; Morilak et al., 1993, 1994). La disponibilité de l'anticorps monoclonal spécifique, produit par Wu et al., en 1995 (Wu et al., 1995, 1998), nous a permis de relancer l'exploration de la localisation immunocytochimique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (Cornea-Hébert et al., 1996). Peu après, plusieurs laboratoires ont également utilisé cet anticorps pour examiner la localisation immunocytochimique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans diverses régions particulières du SNC du rat (Willins et al., 1997; Jansson et al., 1998; Rodriguez et al., 1999; Moyer et Kennaway 1999) et du singe (Jakab et Goldman-Rakic 1998).

En microscopie photonique, notre approche méthodologique a consisté à cartographier, dans toutes les régions du SNC du rat, le marquage immunocytochimique-5-HT<sub>2A</sub> obtenu grâce à cet anticorps. Dans chacune des régions, nous avons systématiquement évalué la quantité des somas et dendrites immunoréactifs et l'intensité relative de leur marquage (Cornea-Hébert et al., 1999a). Cette approche généralisée nous a non seulement permis de compléter la visualisation immunocytochimique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> manquante dans la plupart des régions, mais également de dégager certaines caractéristiques de la distribution régionale et cellulaire de ce récepteur.

Au cours de cette même étude, nous avons également examiné quatre régions du cerveau en microscopie électronique, par suite de marquage en pré-enrobage avec la technique de l'immunoperoxydase (marquage diaminobenzidine : DAB) : cortex fronto-pariétal, cortex piriforme, striatum et tractus olfactif latéral. Le but était d'étudier des régions riches en terminaisons sérotoninergiques (cortex fronto-pariétal, striatum) et montrant de nombreux corps cellulaires et dendrites marqués, une région montrant du marquage axonal (tractus olfactif latéral) et certains territoires de projection des régions riches en corps cellulaires et dendrites immunoréactifs (couche moléculaire du cortex piriforme, cortex fronto-pariétal et striatum). Ensuite, nous avons adapté une méthode de marquage à l'or (Chan et al., 1990) à la visualisation de l'immunoréactivité du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> en microscopie électronique, pour analyser sa distribution subcellulaire dans les neurones du cortex fronto-pariétal (Cornea-Hébert et al., 1996, 1999a). Cette technique nous a permis par la suite de quantifier la distribution du marquage dans un compartiment membranaire prédéterminé, par rapport au compartiment cytoplasmique, et de démontrer ainsi la localisation majoritairement cytoplasmique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (Cornea-Hébert et al., 1999b, 2000, 2002). Par ailleurs, dans aucune des régions étudiées n'avons nous observé la présence de récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les terminaisons axonales. L'ensemble de ces résultats est présenté au Chapitre 2 et 3.

Lors d'un travail subséquent, nous avons voulu mettre à profit la disponibilité de deux autres anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> spécifiques; l'un



produit par nous en collaboration avec le Dr P. Gaudreau (Hôpital Notre-Dame, Montréal), l'autre gracieuseté du laboratoire du Dr B.L. Roth (Case Western University, Cleveland), pour compléter l'étude de la distribution subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les dendrites corticales. Cette étude nous a d'abord permis de confirmer les résultats qualitatifs et quantitatifs précédemment obtenus, mais aussi de comparer ce marquage 5-HT<sub>2A</sub> à celui résultant d'un marquage à l'or de la protéine MAP1A du cytosquelette. Un protocole de double marquage en microscopie électronique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (DAB) et de la protéine MAP1A (or) a aussi été mis au point, afin de visualiser leur co-localisation dans les mêmes neurones *in vivo* (Cornea-Hébert et al., 1999b, 2000, 2002). Ce travail a révélé d'importantes similitudes de la distribution subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et de MAP1A dans les dendrites du cortex cérébral et conduit à l'hypothèse d'une liaison du récepteur au cytosquelette. Ces résultats sont traités au Chapitre 3.

Parallèlement à ces études neurocytologiques, nous avons effectué deux études préliminaires: une cytochimique et l'autre biochimique en vue de mieux comprendre la localisation particulière, majoritairement intra-cytoplasmique, du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. La première étude a été examinée par immunocytochimie en microscopie optique et électronique l'effet d'une déplétion sévère et réversible de sérotonine à l'aide de la neurotoxine *para*-chlorophénylalanine (PCPA; Cornea-Hébert et al., 1997). Dans la deuxième étude, une série d'expériences en Western blot a été réalisée dans le but d'identifier la protéine cytosquelettique qui pourrait être un partenaire d'interaction du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Ces

travaux (Cornea-Hébert et al., 2000) ainsi que ceux de nos collaborateurs (Kroeze et al., 1999; Kroeze et Roth 2000) ont permis de déterminer qu'il s'agit de la protéine MAP1A. L'ensemble de ces résultats non publiés (sous forme d'article) fait l'objet du Chapitre 4.

**Chapitre 2 : Distribution cellulaire et subcellulaire  
du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> de la sérotonine  
dans le système nerveux central du rat  
adulte**

Virginia CORNEA-HÉBERT, Mustapha RIAD, Chun WU, Sujay SINGH and Laurent DESCARRIES (1999) *Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system of adult rat. J Comp Neurol 409 : 187-209.*

**Résumé : Distribution cellulaire et subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> de la sérotonine dans le système nerveux central du rat adulte.**

Grâce à l'immunocytochimie en microscopie photonique et électronique d'un anticorps monoclonal dirigé contre le segment N-terminal de la protéine humaine, nous avons pu décrire et analyser, aux échelons cellulaire et subcellulaire, la distribution du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> de la sérotonine dans le système nerveux central du rat adulte. Par suite d'immunomarquages en pré-enrobage utilisant soit la peroxydase soit l'or intensifié à l'argent, nous avons mis en évidence de nombreux corps cellulaires et dendrites neuronales dans toutes les régions du cerveau où des sites de liaison et/ou l'ARN messager du récepteur avaient été précédemment détectés : cortex cérébral, système olfactif, septum, formation hippocampique, noyaux gris centraux, complexe amygdalien, diencephale, cervelet, tronc cérébral et moelle épinière. De plus, nous avons observé des axones immunoréactifs dans plusieurs faisceaux myélinisés tirant leur origine des régions occupées par ces neurones immunoréactifs.

Dans les somata/dendrites et les axones immunoréactifs, le récepteur est apparu localisé principalement au cytoplasme plutôt qu'associé à la membrane plasmique. Même si le marquage des dendrites était généralement plus intense que celui des corps cellulaires, il ne s'étendait pas aux épines dendritiques dans des régions comme le cortex pariétal, le cortex piriforme, le néostriatum ou la couche moléculaire du cervelet. De même nous n'avons détecté aucun

marquage de terminaisons ou varicosités axonales dans une région pourtant connue pour être fortement innervée par des axones immunoréactifs comme la couche moléculaire du cortex piriforme.

Ces résultats montrent que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> du système nerveux central est principalement intracellulaire et laissent supposer qu'il est transporté dans les dendrites et les axones, mais sans envahir les épines dendritiques et les terminaisons nerveuses. Comme il a déjà été démontré que ce récepteur est l'objet d'un transport axonal rétrograde aussi bien qu'antérograde, qu'il active des cascades de signalisation intracellulaire et qu'il intervient dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes, nous proposons que l'un de ses rôles principaux soit de participer à une signalisation neuronale rétrograde déclenchée par la sérotonine.

**CELLULAR AND SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF THE  
SEROTON 5-HT<sub>2A</sub> RECEPTOR IN THE CENTRAL NERVOUS  
SYSTEM OF ADULT RAT**

Virginia CORNEA-HÉBERT<sup>1</sup>, Mustapha RIAD<sup>1</sup>,  
Chun WU<sup>2</sup>, Sujay SINGH<sup>3</sup> and Laurent DESCARRIES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Départements de pathologie et biologie cellulaire et de physiologie,  
and Centre de recherche en sciences neurologiques, Faculté de  
médecine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada H3C  
3J7; <sup>2</sup> PharMingen, San Diego, CA 92121, and Department of  
Pathological Sciences, University of Manchester, Manchester,  
United Kingdom, and <sup>3</sup> Imgenex, San Diego, CA 92121

(51 text pages; 2 tables and 25 figures)

Abbreviated title: **5-HT<sub>2A</sub> receptors in rat CNS**

**KEYWORDS** electron microscopy; regional distribution; cellular  
localization; subcellular localization;  
immunocytochemistry

This work was supported by a studentship from the Groupe de  
recherche sur le système nerveux central (FCAR) to V.C.-H., grant  
MT-3544 from the Medical Research Council of Canada (L.D.), and  
NIH grant IR 43 MH 54437-01 (S.S.).

**Abstract-** Light and electron microscope immunocytochemistry with a monoclonal antibody against the N-terminal domain of the human protein was used to determine the cellular and subcellular localization of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the central nervous system of adult rat. Following immunoperoxidase or silver-intensified immunogold labeling, neuronal, somatodendritic and/or axonal, immunoreactivity was detected in numerous brain regions, including all those in which ligand binding sites and 5-HT<sub>2A</sub> mRNA had previously been reported. The distribution of 5-HT<sub>2A</sub> immunolabeled soma/dendrites was characterized in cerebral cortex, olfactory system, septum, hippocampal formation, basal ganglia, amygdala, diencephalon, cerebellum, brainstem and spinal cord. Labeled axons were visible in every myelinated tract known to arise from immunoreactive cell body groups.

In immunopositive soma/dendrites as well as axons, the 5-HT<sub>2A</sub> receptor appeared mainly cytoplasmic rather than membrane bound. Even though the dendritic labeling was generally stronger than the somatic, it did not extend to dendritic spines in such regions as the cerebral and piriform cortex, the neostriatum or the molecular layer of the cerebellum. Similarly, there were no labeled axon terminals in numerous regions known to be strongly innervated by the immunoreactive somata and their axons (e.g., molecular layer of piriform cortex). It was concluded that the 5-HT<sub>2A</sub> receptor is mostly intracellular and transported in dendrites and axons, but does not reach into dendritic spines or axon

terminals. Because it has previously been shown that this serotonin receptor is transported retrogradely as well as anterogradely, activates intracellular transduction pathways and intervenes in the regulation of the expression of many genes, it is suggested that one of its main functions is to participate in retrograde signaling systems activated by serotonin.



More than a dozen proteins of the G protein-coupled superfamily as well as one ligand-gated ion channel have already been identified as receptors for the neurotransmitter/modulator serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) in mammalian central nervous system (CNS; for reviews: Boess and Martin, 1994; Hoyer et al., 1994; Saudou and Hen, 1994). Among these, the 5-HT<sub>2</sub> receptor family comprises three subtypes, the 5-HT<sub>2A</sub> (formerly 5-HT<sub>2</sub>), 5-HT<sub>2B</sub> (formerly 5-HT<sub>2F</sub>) and 5-HT<sub>2C</sub> (formerly 5-HT<sub>1C</sub>; for review: Roth et al., 1998). In rat brain, 5-HT<sub>2B</sub> receptors are present in discrete nuclei (Flanigan et al., 1995; Duxon et al., 1997), whereas the 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> subtypes have a widespread distribution, suggesting their participation in numerous central effects of 5-HT (Morilak et al., 1993; Pompeiano et al., 1994; Wright et al., 1995; Abramowski et al., 1995; Sharma et al., 1997; Hamada et al., 1998; Jansson et al., 1998).

Interest in the 5-HT<sub>2A</sub> receptor subtype (Leysen et al., 1978; Peroutka and Snyder, 1979) has been prompted by increasing evidence of its implication in the etiopathology of neuropsychiatric diseases (Stanley and Mann, 1983; Yates et al., 1990; Arora and Meltzer, 1991; Gross-Isserof et al., 1990; D'haenen et al., 1992; Hrdina et al., 1993; Burnet et al., 1996; Biver et al., 1997) and the therapeutic effects of neuroleptics, notably those of the new generation of antipsychotics such as clozapine and olanzapine (Berendsen and Broekkamp, 1991; Arranz et al., 1998; Arvanov and Wang, 1998; Kapur et al., 1998; Masellis et al., 1998). Moreover,

5-HT<sub>2A</sub> receptors appear to be a major site of action of hallucinogens (Glennon et al., 1984; Titeler et al., 1988; Marek and Aghajanian, 1996; Jakab and Goldman-Rakic, 1998). Accurate knowledge of the regional, cellular and subcellular distribution of these receptors should therefore help to elucidate their physiological role(s), pharmacological properties and mechanism(s) of action.

In adult rat CNS, autoradiography with the radioligand antagonists, [<sup>3</sup>H]spiperone, [<sup>3</sup>H]ketanserin, [<sup>3</sup>H]mesulergine, [<sup>125</sup>I]7-amino-8-iodo-ketanserin (AMIK) and MDL 100907 (Leysen et al., 1982; Pazos et al. 1985; Schotte and Leysen, 1988; Appel et al., 1990; Lafaille et al., 1991; Marlier et al., 1991; López-Giménez, 1997), and/or the radioligand agonists, [<sup>3</sup>H]LSD and [<sup>125</sup>I]DOI (Altar et al., 1985, 1986; McKenna et al., 1989b; Nazarali et al., 1989; Appel et al., 1990; Mengod et al., 1990), has yielded considerable information on the regional distribution of 5-HT<sub>2A</sub> binding sites under control and experimental conditions (see also Biegon and Israeli, 1987; Fischette et al., 1987; McKenna et al., 1989a; Radja et al., 1993; Compan et al., 1998). *In situ* hybridization histochemistry with oligonucleotide or cDNA probes made it possible to visualize the neuronal somata containing 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA (Mengod et al., 1990; Pompeiano et al., 1994; Burnet et al., 1995; Wright et al., 1995; Mijster et al., 1997), and to investigate how the production of these receptors might be affected by lesions and/or pharmacological treatments (Chen et al. 1995; Numan et al., 1995; Laprade et al., 1996). Yet, both the autoradiographic and *in situ* hybridization approaches lack the

resolution to reveal the subcellular and ultrastructural localization of the receptor protein, which can only be determined by immunocytochemistry at the light and electron microscopic levels.

Several immunocytochemical studies with antibodies raised against different segments of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor protein have already been performed (Morilak et al., 1993, 1994; Willins et al., 1997; Jansson et al., 1998; Maeshima et al., 1998a,b; Wu et al., 1998), some of which included descriptions at the electron as well as light microscopic level (Carleton and Coggeshall, 1997; Jakab and Goldman-Rakic, 1998; Hamada et al., 1998). Until now, however, all these studies have relied on the diffusible diaminobenzidine marker to visualize the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity, so that little could be inferred from the observed distributions at the subcellular level. The present study was therefore undertaken to complement earlier light microscopic descriptions and to obtain more precise information at the electron microscopic level, using a well characterized monoclonal antibody (Wu et al., 1998). In view of preliminary results demonstrating a predominantly intracytoplasmic as opposed to membrane distribution of the neuronal 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in many brain regions (Cornea-Hébert et al., 1996), care was taken to validate these findings under different conditions of tissue fixation, and to obtain ultrastructural data with the immunogold as well as avidin-biotin-peroxidase technique.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Anti-5-HT<sub>2A</sub> antibody**

Monoclonal 5-HT<sub>2A</sub> receptor antibody was prepared from a fusion protein antigen containing the entire N-terminal domain (1-76) of the cloned human 5-HT<sub>2A</sub> receptor sequence. The specificity of this antibody was verified on Western blots of rat brain membranes, human brain, and transfected NIH 3T3 cell lysates, and by immunofluorescence of rat Schwann cells in culture (Wu et al., 1998).

### **Histological processing**

All experiments were performed according to the policies and guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the regulations of the Animal Care Committee at the Université de Montréal. Fourteen adult male Sprague-Dawley rats (Charles River, Canada, Inc.; body weight: 250 ± 50 g) were used. In preliminary trials, tissue fixation with various fixative solutions proved compatible with immunodetection, including perfusion of a mixture of 0.01 M periodate, 0.075 M lysine and 2% paraformaldehyde (McLean and Nakane, 1974); 3.5% glutaraldehyde (Mrini et al., 1995); 4% paraformaldehyde and 1.75% glutaraldehyde (below).

For the present study, each rat was deeply anesthetized with sodium pentobarbital (Somnotol: 65 mg/kg, i.p.) and perfused through the aortic arch with 40 ml phosphate buffered saline (0.9% NaCl in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4) followed by 700 ml of 4%

paraformaldehyde in 0.2 M phosphate buffer (PB) for light microscopy, or 1.75% glutaraldehyde in PB for electron microscopy. The brain and spinal cord were carefully removed and cut in 5- to 7-mm-thick transverse slabs which were further postfixed by immersion in the corresponding fixatives (1-2 h at 4°C).

Vibratome sections, 50  $\mu\text{m}$ -thick, were cut from each slab. One in every ten section was selected for light or electron microscopic immunocytochemical processing. Adjacent sections were mounted on gelatin-coated slides, air-dried and stained with cresyl violet.

### **Light microscope immunocytochemistry**

After washes (2 x 5 min) in Tris-buffered saline (0.9% NaCl in 50 mM Tris, pH 7.4: TBS), the formaldehyde-fixed sections were preincubated for 2 h at room temperature (RT) in TBS containing 10% normal horse serum (NHS), 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% sodium azide, and then for 48 hours at 4°C in the same solution containing 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of monoclonal 5-HT<sub>2A</sub> antibodies. This was followed by incubation for 2 hours at RT with biotinylated horse anti-mouse IgGs (Sigma, St. Louis, MO) diluted 1:200 in TBS containing 2% NHS and 1% BSA, incubation in avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector, Burlingame, CA) also for 2 h at RT, and revelation with a 0.05% solution of 3,3'-diaminobenzidine (DAB) containing 0.005% hydrogen peroxide in TBS (5-7 minutes).

### **Electron microscope immunocytochemistry**

After washes in TBS (2 x 5 min), the glutaraldehyde-fixed sections were treated with 0.5% sodium borohydride in TBS for 15 minutes to saturate free aldehyde bonds, and labeled with immunoperoxidase as above, or with silver-intensified immunogold. This latter procedure consisted of 2 hours incubation at RT with a 1/50 dilution of goat anti-mouse IgGs conjugated to 1 nm colloidal gold particles (AuroProbe™ One, Amersham, Arlington Heights, IL) in TBS containing 0.4% gelatin, followed by silver enhancement (IntenSE™, Amersham), postfixation with 1% osmium tetroxide in 0.1 M PB (30 minutes at RT), dehydration in a graded series of ethanol followed by propylene oxide, and flat-embedding in Durcupan resin between a glass slide and plastic coverslip (Rinzl, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). After polymerization (48 hours at 60°C), the coverslips were removed and the regions of interest selected by light microscopy, excised from the slides and reembedded in resin. Thin (silver-gold) sections were cut on an ultramicrotome (Reichert-Jung Ultracut), collected onto one-slot copper grids coated with Piloform (Polaron Instruments, Cambridge, MA), stained with Reynold's lead citrate, and examined in the electron microscope (Philips CM100; 60 KV).

### **Controls**

Incubations were carried out without primary antibody, with primary antibody preadsorbed with the GST-5-HT2A fusion protein

antigen (6 $\mu$ g/ $\mu$ g IgG), or with primary antibody exposed to recombinant proteins containing the N-terminal domains of 5-HT<sub>2B</sub> (GST-5-HT<sub>2B</sub>) and 5-HT<sub>2C</sub> (GST-5-HT<sub>2C</sub>) receptors (3  $\mu$ g/ $\mu$ g IgG). The primary antibody was also omitted in the electron microscopic experiments using gold-conjugated anti-mouse IgGs as secondary antibody.

### **Analysis of anatomical and cytological distribution**

Light microscopic sections were examined using bright-field microscopy (X 2.5 to X 100). Anatomical structures were identified by direct observation of cresyl-violet-stained sections, using the atlases of Kruger (1995), Swanson (1992) and Paxinos and Watson (1986) as basic references. The nomenclature was that of Paxinos and Watson (1986). The distribution and intensity of immunostaining of cell bodies and/or dendrites were evaluated by two of the authors (V.C.-H. and L.D.). In each region, the intensity of immunostaining was rated as weak (+), moderate (++) or strong (+++), and the number of immunolabeled elements relative to total number as low (1) medium (2) or high (3) (see Table 1). These observations were collected from at least 3 rats in each region. Axonal labeling was also recorded, but did not lend itself to quantitative evaluation (Table 2).

Tissue from four rats was examined by electron microscopy. Observations were made in five anatomical regions exhibiting strong cell body and dendritic labeling, namely the frontoparietal neocortex (deep and superficial layers), piriform cortex (all layers),

islands of Calleja, neostriatum, and cerebellum, and in the lateral olfactory tract displaying axonal labeling. Particular attention was paid to the molecular layer of the piriform cortex as a region known to receive axon terminals from the mitral cells of the main olfactory bulb, the soma/dendrites and axons of which were strongly immunopositive.

## RESULTS

### **Specificity of 5-HT<sub>2A</sub> immunostaining**

The 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity was mainly neuronal throughout the CNS (Figs. 1-25), except in spinal cord in which peripheral radial glia also showed selective immunostaining at every anatomical level (Fig. 20). In all regions examined, the neuronal labeling was essentially somatodendritic and axonal, as confirmed by electron microscopy (see below). 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity was totally absent after omission of the primary antibody or its preadsorption with homologous protein. It was unaltered by pre-exposure of the primary antibody to heterologous GST-5-HT<sub>2B</sub> or 5-HT<sub>2C</sub> fusion protein. In specimens processed for electron microscopy with the silver-intensified gold procedure, occasional artefactual labeling of glial, endothelial and pericytic nuclei was noted, that was present even after incubation without primary antibody.



## **Regional distribution of somatodendritic and axonal immunoreactivity**

The data on the regional distribution of the somatodendritic immunoreactivity are summarized in Table 1. Somatodendritic labeling was present in all regions previously reported to contain 5-HT<sub>2A</sub> mRNA as demonstrated by *in situ* hybridization. However, as analyzed at the light microscopic level, there were striking differences in both the number of labeled cells and intensity of immunolabeling between anatomical regions (see also Figs. 1-21). The axonal labeling (Table 2) invariably involved myelinated bundles known to arise at least in part from gray matter regions displaying immunoreactive somata/dendrites. In some of these bundles (e.g., lateral olfactory tract, dorsal corticospinal tract), a vast majority of myelinated axons appeared to be labeled. The following description was primarily based on light microscopic DAB-immunostained material, which provided the most sensitive detection of the receptor.

**Cerebral cortex** (Figs. 1-5,7,9 and 16). In the neocortex, the somatodendritic immunoreactivity gave rise to a strong laminar pattern. The frontal (Fr) and parietal (Par) cortices displayed a high number of large layer V pyramidal neurons exhibiting intense labeling of their somata and apical dendrites (Figs. 1-4, 9 and 16). In layers II and III, numerous weakly to moderately immunostained, smaller, multipolar somata/dendrites were visible (Fig. 9). These were interspersed between the intensely stained, vertically oriented

apical dendrites of layer V neurons, which seemed to ramify as an intricate meshwork in upper layer II and layer I. In layer VI also, there were a few multipolar neurons exhibiting somatodendritic labeling of weak to moderate intensity. A similar pattern prevailed in the temporal (Te) and the occipital (Oc) cortices (Figs. 4 and 5), but these seem to display a lower number of labeled cells in layer V, and less numerous labeled dendrites in the upper layers. In granular cortices, the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity spared layer IV, in which only a few weakly labeled dendritic branches were visible among the strongly labeled climbing apical dendrites of layer V pyramidal neurons.

The cingulate cortex also showed a considerable number of immunoreactive pyramidal somata/dendrites in layer V (Figs. 1-5 and 7). Rostrally (anterior cingulate; Cg), these cell bodies appeared less intensely labeled than caudally (retrosplenial; RS). Bundling of their apical dendrites appeared to be a characteristic feature. Dendritic branching within layer II was also prominent (Fig. 7). A similar pattern could be observed in the insular (Ins) and perirhinal (PRh) cortices, except for fainter staining of the layer V somata (Figs. 1-5). In the claustrum, there were no immunopositive cell bodies, but numerous small and thin dendrites running in every direction (Fig. 2). Axonal labeling was prominent in the cingulum and was also seen in some fibers of the corpus callosum (cc; Figs. 2-4).

**Olfactory system** (Figs. 1-4 and 8). The overall labeling pattern in olfactory bulb was also laminated (not illustrated, but see

Table 1). In the glomerular layer, there were only some moderately positive small somata and proximal dendrites. The external plexiform layer was the most immunoreactive, exhibiting a high number of dendrites and occasional, heavily stained, large somata. In the mitral cell layer, large somata and their dendrites were also intensely immunoreactive, contrasting with the weakly labeled internal plexiform and internal granular layers. Somatodendritic labeling was also noticeable in the accessory olfactory bulb and fairly strong in the anterior olfactory nucleus (AO, Fig. 1). Immunoreactive myelinated axons were seen in the intrabulbar anterior commissure and in the lateral olfactory tract (lo, Figs. 1, 2 and Fig. 8).

In piriform cortex (Pir, Figs. 1-4 and Fig. 8), strong dendritic immunoreactivity was present in layer II pyramidal neurons, but also in dispersed interneurons of the plexiform (layer I) and polymorph layer (layer III). Somatodendritic immunolabeling was also abundant in layer II of the olfactory tubercle (Tu, Fig. 2), and particularly intense in the islands of Calleja (Fig. 2). Weakly labeled somata and moderately labeled dendrites were visible in the endopiriform nucleus (Fig. 3 and DEn, Fig. 4).

**Septum** (Fig. 2). Weak somatodendritic immunoreactivity was detected in the lateral nucleus. In the medial nucleus (MS) as well as in the nuclei of the vertical (VDB) and horizontal limb (HDB) of the diagonal band of Broca, large, intensely labeled cell bodies and dendrites were visible. Weaker and exclusively dendritic labeling

was seen in the triangular nucleus. Both the fornix and neighboring anterior commissure contained numerous strongly labeled myelinated axons.

***Hippocampal formation*** (Figs. 1-5 and 10,11). The hippocampal formation showed some of the most intense and abundant 5-HT<sub>2A</sub> immunostaining in brain. Strong somatodendritic labeling was present in both hippocampal rudiments: indusium griseum (Fig. 2) and tenia tecta (TT, Fig. 1 and 2), in the entire granule cell layer of the dentate gyrus (DG, Figs. 3-5 and 10), and throughout the pyramidal cell layer of Ammon's horn (CA1-CA3, Figs. 3-5 and 10). The labeling of granule and pyramidal cells was particularly strong in the dendrites, extending into their most distal branches in the molecular (Mol) and radiatum (Rad) layers, respectively (Fig. 10). However, there was no indication of punctate, dendritic spine labeling in the stratum lacunosum moleculare, as readily observed after immunoperoxidase and even immunogold immunostaining of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor (Riad et al., 1995). In stratum oriens (Or), occasional elongated somata with horizontal proximal dendrites were suggestive of interneurons. In the polymorph layer (PoDG), larger multipolar somata, possibly belonging to mossy cells, were prominent. The fiber containing alveus showed unequivocal axonal immunoreactivity, as well as the fimbria (fi, Fig. 3), to a lesser extent.

Strongly labeled somata/dendrites were also present in the subiculum (S, Figs. 5 and 11), contrasting with only faint

somatodendritic immunoreactivity in the presubiculum and parasubiculum. The entorhinal cortex (Ent, Fig. 5) displayed strong somatodendritic labeling of the pyramidal cells in its layer II.

**Basal ganglia** (Figs. 2,3,12 and 17). Somatodendritic 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity was prominent in all components of the basal ganglia. In nucleus accumbens (Acb, Fig. 2), this labeling involved numerous medium-sized neurons and their dendrites in both the shell and the core of the nucleus. In neostriatum (CPu, Figs. 2,3 and 12), most of the predominant medium spiny neurons appeared to be immunostained, as well as some larger neuronal somata/dendrites, presumably interneurons. There was no punctate labeling suggestive of immunostained dendritic spines. Immunoreactive myelinated axons were abundant in the bundles of the internal capsule (ic, Fig. 3 and 12).

In the globus pallidus (GP, Fig. 3; see also Fig. 17) and entopeduncular nucleus (EP, Fig. 3), many multipolar medium-sized neurons, with long, thin varicose proximal dendrites emerging from their somata, displayed moderate to strong immunoreactivity (Fig. 17). These cells were scattered among myelinated fascicles exhibiting immunostained axons. Rostrally, strong somatodendritic labeling was also observed in the ventral pallidum (Fig. 2). Labeled axons were also seen in the external capsule (Fig. 3).

**Amygdala** (Figs. 3 and 4). As shown in Table 1, most nuclei of the amygdalar complex displayed somatodendritic labeling of weak to strong intensity but relatively low abundance, except in the

basolateral nucleus (BL, Fig. 3 and Fig. 4). Numerous moderately stained cells were visible in the anterior and posterior subdivisions of the BL, but only scattered albeit intensely stained cells in its ventral subdivision. Dendrites in the cortical amygdaloid nucleus (Co, Fig. 3 and 4) also showed strong immunoreactivity, particularly in its posterolateral part.

***Epithalamus, thalamus and subthalamus*** (Figs. 3-5).

Weak somatodendritic immunoreactivity was found in the posterior part of the lateral subdivision of the habenula (Fig. 3). Most of the nuclei of thalamus showed moderate to strong and widespread immunostaining, except for the midline and intralaminar nuclei in which there was no or only light labeling (Figs. 3,-5). In the reticular nucleus (Rt, Fig. 3), elongated proximal dendrites displayed stronger immunoreactivity than their weakly stained and scattered cell bodies. Each of the anterior nuclei showed moderate or dense immunostaining of many cell bodies and dendrites (Fig. 3). In the lateral group, most nuclei except the laterodorsal (LD, Fig. 3) were also highlighted by moderate or intense immunostaining of a majority of their somata/dendrites. In the posterior group, the strongest immunoreactivity was observed in the dorsal lateral (DLG) and medial geniculate (MG), whereas in the ventral lateral geniculate (VLG), there was only some dendritic staining (Fig. 4). In the substantia innominata, zona incerta (ZI, Fig. 4), and subthalamic nucleus, moderate to strongly stained soma/dendrites were also numerous. Immunoreactive axons were seen in the

fasciculus retroflexus (fr, Fig. 4), superior thalamic radiation (Fig. 4) and stria terminalis (st, Fig. 3).

**Hypothalamus** (Figs. 3 and 4). In the hypothalamus, the somatodendritic 5-HT<sub>2A</sub> labeling was generally weaker, sparing numerous nuclei, notably in the medial and periventricular zone. The strongest immunoreactivity was seen in the magnocellular preoptic nucleus and the magnocellular nucleus of the lateral hypothalamus, but even in these nuclei, this labeling did not involve a majority of the neurons. Strong and abundant dendritic staining was also observed in the parastrial nucleus. The ventromedial hypothalamic nucleus (VMH, Fig. 3) showed intense but solely dendritic labeling. Weak staining only was seen in the mammillary complex, except in the medial mamillary nucleus (MM, Fig. 4) and supramamillary nucleus, which showed moderately labeled somata/dendrites. There was no apparent labeling of the magnocellular neurons in the paraventricular and supraoptic nuclei. Immunoreactive axons were present in the medial forebrain bundle (Figs. 3 and 4), fornix (f, Fig. 3) and mammillary peduncle (Fig. 4). Some were also noticeable in the optic tract (Fig. 3) and, rostrally, within the optic chiasm.

**Cerebellum** (Figs. 6, 15 and 19). A common pattern of somatodendritic immunoreactivity prevailed throughout the cerebellum. In the cortex, the cell bodies of the Purkinje cells were moderately stained and often seen in continuity with their even more strongly stained dendritic shafts extending across the whole

molecular layer (Figs. 15 and 19). Rare stained somata/dendrites of large size were also seen in the granular layer. No punctate labeling suggestive of dendritic spines was seen in the molecular layer. All deep cerebellar nuclei showed numerous strongly immunoreactive cell bodies and dendrites (Fig. 6). Immunoreactive myelinated axons were present in the inferior, middle and superior cerebellar peduncles (e.g., icp in Fig. 6).

**Brainstem** (Figs. 4-6, 13, 14 and 18). Immunoreactive somata/dendrites and axons were visible at all brainstem levels. In the mesencephalon, strong somatodendritic labeling was observed in the deep gray layers of the superior colliculus (DpG, Fig. 5), oculomotor nucleus (3, Figs. 5 and 14), trochlear nucleus, mesencephalic trigeminal nucleus (Me5, Fig. 13) and red nucleus (R, Fig. 5 and 18). The intermediate gray layer of superior colliculus (InG, Fig. 5), all subdivisions of the inferior colliculus, nucleus of Darkschewitsch, interstitial nucleus of the mlf (medial longitudinal fasciculus), magnocellular nucleus of the posterior commissure, anterior pretectal nucleus, deep mesencephalic nucleus (DpMe, Fig. 5) and median raphe nucleus displayed abundant but less intense immunoreactivity. Moderate somatodendritic staining was also seen in the substantia nigra, reticular part (SNR, Figs. 4 and 5), whereas in the compact part (Fig. 5), the staining was mainly dendritic. Similarly, in the interpeduncular nucleus (IP, Fig. 5), there was no somatic staining but rather abundant dendritic staining which predominated in the lateral as opposed to central nuclei. There were



no labeled somata/dendrites within the dorsal raphe nucleus. Only sparse, weakly labeled dendrites were seen at its ventrolateral border. Strongly immunostained axons were prominent in the posterior commissure (pc, Fig. 4), medial longitudinal fasciculus (mlf, Fig. 6), rubrospinal (Fig. 5) and tectospinal tracts, intracerebral trajectories of nerves 3 and 4, tract of Me5 (Fig. 13), superior cerebellar peduncle (Figs. 5 and 6) and cerebral peduncle (Fig. 5).

In the pons, the strongest somatodendritic immunoreactivity was that of the motor trigeminal and abducens nuclei. Moderate to strong somatodendritic labeling was also found in the tegmental nuclei (dorsal, laterodorsal, and ventral). Only few weakly labeled dendrites but no labeled somata were visible in the locus coeruleus. A fair number of moderately labeled cells were present in the pontine reticular nucleus, oral and caudal parts, but only few in the pontine nuclei proper. Axonal labeling was prominent in the ventral spinocerebellar tract, sensory and motor roots of the fifth nerve, middle cerebellar peduncle, medial and lateral lemniscus and trapezoid bodies (Fig. 6).

In the medulla oblongata (Fig. 6), very strong somatodendritic immunoreactivity was observed in the superior and lateral vestibular (LVe) nuclei, facial (7), ambiguus and hypoglossal nuclei and lateral reticular nucleus. The medial (MVe) and spinal vestibular nuclei, spinal trigeminal nucleus (Sp5), reticular field nuclei - gigantocellular (Gi), intermediate, parvocellular (PCRt) - and dorsal motor nucleus of the vagus showed moderate to strong

immunoreactivity. Moderately labeled cells were also seen but in small number in the ventral (VC) and dorsal (DC) cochlear nuclei and in the lateral superior olive. Faintly labeled somata and dendrites were visible in the nucleus of the solitary tract, mostly in its lateral part. Weak somatodendritic immunostaining was present throughout the inferior olive. The spinal trigeminal tract (sp 5), solitary tract, inferior cerebellar peduncle (icp), pyramidal tract (py) and roots of nerves 6-9 and 12 displayed strong axonal labeling.

**Spinal cord** (Figs. 20 and 21). As illustrated at cervical cord level, the large neurons in lamina IX showed relatively strong immunostaining of their somata and proximal dendrites. Smaller immunostained somata/dendrites were also visible in the intermediolateral nucleus at thoracic levels. There were also scattered immunoreactive neurons throughout laminae IV- VIII and lamina X, and relatively weak dendritic staining in laminae I- III of the dorsal horn. White matter immunoreactivity was prominent, particularly in the dorsal corticospinal tract (dcs) and gracile fasciculus (gr). Immunostained axons were also visible in the cuneate fasciculus (cu), lateral funiculus (lfu), ventral funiculus (vfu) and dorsal and ventral roots. Strongly immunoreactive radial glia bordered the periphery of all spinal cord sections.

### **Ultrastructural distribution of 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity**

In all regions examined (frontoparietal and piriform cortex, islands of Calleja, neostriatum, cerebellum and lateral olfactory tract), the labeling observed at the electron microscopic level was consistent with the light microscopic observations. Except for the occasional artefactual accumulation of immunogold particles over the nucleus of a few glial or endothelial cells, only somata/dendrites and myelinated axons were detected as immunoreactive in either immunoperoxidase- or immunogold-labeled material. In general, the number of these labeled elements appeared greater after immunoperoxidase than immunogold labeling, so that immunoperoxidase-labeled material was always examined to reach conclusions based on immunonegativity. Irrespective of the brain region examined, the somatodendritic as well as axonal labeling was predominantly cytoplasmic rather than associated with the plasma membrane. This was indicated by the absence of sublemmal accumulation of immunoperoxidase precipitate in cell bodies or large dendrites (not illustrated), but most evident after immunogold labeling (Figs. 22-25). For example, over 123 sections of immunopositive dendrites from the upper layers of the parietal cortex of 3 rats, only 10% of all gold particles (89/899) were superimposed or in contact with the plasma membrane, as opposed to 90% over the cytoplasm (see also Figs. 23 and 25). In immunoreactive perikarya and/or dendrites, the immunogold particles spared the mitochondria, and showed no obvious

predilection for the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus, multivesicular bodies or endosomal-like vesicles (Fig. 22). Neither in the neocortex, piriform cortex, neostriatum or cerebellum was there any immunogold or diaminobenzidine labeling of dendritic spines. Similarly, even though the immunolabeling of myelinated axons was present along the whole length of these fibers, none of the specimens from the above regions displayed immunostained axon terminals.

## DISCUSSION

### Methodological considerations

The monoclonal antibody directed against the AA 1-76 portion of the N-terminus of the human 5-HT<sub>2A</sub> has been well characterized in various cell and tissue preparations (Wu et al., 1998). Its specificity for immunolabeling the 5-HT<sub>2A</sub> receptor has been verified in the present and earlier experiments (Carlton and Coggeshall, 1997; Willins et al., 1997; Jakab and Goldman-Rakic, 1998; Wu et al., 1998). As judged from the prior light microscopic report of Willins et al. (1997) on the rat cerebral cortex, this antibody yielded immunocytochemical signals which are undistinguishable from those produced with two other polyclonal antibodies directed against different sequences of the rat receptor: the AA 22-41 portion of the N-terminus (Roth et al., 1995; Berry et al. 1996; Willins et al., 1997) and the AA 330-345 portion of the C-terminus (Willins et al., 1997). Comparable distribution patterns have also been recently reported at both the light and electron microscopic levels in studies performed with two other polyclonal anti 5-HT<sub>2A</sub> antibodies, one directed against a 65 AA peptide from the C-terminus of the mouse receptor and the other against AA 14-33 from the N-terminus of the rat receptor (Hamada et al., 1998; Maeshima et al., 1998a,b).

The mainly cytoplasmic distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in neuronal cell bodies, dendrites and their axons could hardly be considered as a mobilization artefact, because it was

observed at the electron microscopic level, in widely different conditions of chemical fixation of the tissue and with the particulate, nondiffusible, silver-intensified immunogold as well as diffusible immunoperoxidase marker. This localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors was in marked contrast with the obvious predilection for the plasma membrane of other 5-HT receptor subtypes (5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub>) visualized under similar conditions of tissue processing and immunolabeling (Riad et al., 1995, 1996). It is noteworthy that, even though membrane labeling was described by Willins et al. (1997) in their description of the 5-HT<sub>2A</sub> immunostaining in the rat cerebral cortex with the present antibody, they had noted "a small but significant portion of the 5-HT<sub>2A</sub>-like immunoreactivity in cytoplasmic vesicles", as observed by confocal microscopy (see also Wu et al., 1998). Similarly, Berry et al. (1996), who examined the subcellular localization of rhodamine-labeled 5-HT<sub>2A</sub> receptor by confocal microscopy in transfected GF-62 cells grown under standard culture conditions, reported their labeling as "primarily on the plasma membrane", but "with a small but significant amount of 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactivity also present intracellularly". However, in recent immunofluorescence and immunoperoxidase descriptions of transfected cells and motoneurons labeled with either one of their two antibodies, Hamada et al. (1998) and Maeshima et al. (1998a) emphasized the immunostaining of "the entire region of somatic profiles excluding the nucleus" of transfected cells, and of the "cytoplasm/cell membrane" of motoneuronal somata. Obviously,

some of these discrepancies were due to the limited resolution of the immunofluorescence approach, even when combined with confocal microscopy.

### **Cellular mapping of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor**

**Cerebral cortex.** The strong 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity of numerous large pyramidal cells in layer V of the frontal and parietal neocortex has been emphasized in earlier immunocytochemical studies (Willins et al., 1997; Hamada et al., 1998). It was consistent with the 5-HT<sub>2A</sub> immunolabeling of nearly all pyramidal neurons reported by Jakab and Goldman-Rakic (1998) in the prefrontal cortex of the primate. As previously noted by Morilak et al. (1993), a great number of smaller pyramidal cells and stellate cells were also immunoreactive in all neocortical areas. Only layer IV neurons in granular areas appeared to lack 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity. Such an areal and laminar distribution was consistent with the *in situ* hybridization results showing 5-HT<sub>2A</sub> mRNA not only in pyramidal cells of layer V but also in numerous neurons of cortical layers II-III and VI (Mengod et al., 1990; Pompeiano et al., 1994; Burnet et al., 1995; Wright et al., 1995). The absence of labeled dendritic spines, observed at the electron microscopic as well as light microscopic level, had already been noted by Jakab and Goldman-Rakic (1998) in the monkey prefrontal cortex.

In rat somatosensory cortex, the density of specific radioligand binding to 5-HT<sub>2A</sub> receptor has been shown to closely match that of the 5-HT innervation, at least in layer Va (Blue et al., 1988; see also

Audet et al., 1989). Based on this evidence, Jakab and Goldman-Rakic (1998) have suggested that the high concentration of 5-HT<sub>2A</sub> receptor labeling in proximal apical dendrites might relate to a higher concentration of 5-HT in the microenvironment of these dendritic segments. In relation with this hypothesis, it must be pointed out that the high number of fine dendritic branches observed in the superficial layers I and II presumably corresponds to distal ramifications of the apical dendrites from the pyramidal neurons. Furthermore, in monkey (DeFelipe and Jones, 1988; Smiley and Goldman-Rakic, 1996) as well as rat neocortex (Descarries et al., 1975; Séguéla et al., 1989), a minority of 5-HT axon terminals appear to make morphologically defined synaptic contacts irrespective of the cortical layer examined. Lastly, these infrequent synaptic contacts are mostly found on the dendritic shafts of interneurons and not on pyramidal cells in the monkey prefrontal cortex (Smiley and Goldman-Rakic, 1996). In this context, the strong 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity over the entire pyramidal cell dendritic tree may be viewed as further evidence for the mediation of 5-HT effects dependent on diffuse transmission (Jansson et al., 1998). Such an interpretation would be consistent with considerable data indicating that the match between 5-HT innervation density and 5-HT<sub>2A</sub> receptor distribution does not hold true in other layers of somatosensory and other areas of the rat cerebral cortex (Lidov et al., 1980; Pazos et al., 1985; Audet et al., 1989; Appel et al., 1990).



Extra- and intracellular recordings *in vivo* and *in vitro* have demonstrated opposite, hyperpolarizing and depolarizing, 5-HT<sub>1A</sub>- and 5-HT<sub>2A</sub>-mediated effects of 5-HT on the same cells in cerebral cortex (Davies et al. 1987; Araneda and Andrade, 1991; Ashby et al., 1994; Aghajanian and Marek, 1997). In pyramidal neurons, the coactivation of both receptor subtypes results in selective enhancement of the responsiveness to strong excitatory stimuli (Araneda and Andrade, 1991). 5-HT acting through the 5-HT<sub>2A</sub> receptor has indeed been shown to facilitate excitatory responses to N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) agonists (Rahman and Neuman, 1993; Ashby et al., 1994). Aghajanian and Marek (1997) have reached the conclusion that the 5-HT<sub>2A</sub>-mediated action of 5-HT is to enhance spontaneous excitatory postsynaptic potentials and currents through both pre- and postsynaptic mechanisms. The absence of 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactive axon terminals either in the frontoparietal or piriform cortex would seem to indicate that the pre-synaptic effects would be indirect and dependent on the activation of postsynaptic receptors.

**Olfactory system.** The strong 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in many components of the olfactory system was consistent with a number of *in situ* hybridization (Pompeiano et al., 1994; Wright et al., 1995; McLean et al., 1995; Mijnster et al. 1997), autoradiographic (Pazos et al., 1985; Appel et al., 1990), and immunocytochemical observations (Hamada et al. 1998). In particular, the presence of numerous immunoreactive dendrites in the external plexiform layer

could account for the high density of ligand binding sites previously described in this layer. The strong somatodendritic labeling in the islands of Calleja supports one of the alternatives proposed by Mijster et al. (1997) that rapid turnover of the 5-HT<sub>2A</sub> mRNA explains the weak or absent *in situ* hybridization signals but strong radioligand binding detected in this region.

The 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in the dendrites of layer II pyramidal neurons as well as in dispersed interneurons in the plexiform (layer I) and polymorph layer (layer III) of piriform cortex was rather unexpected. In rat piriform cortex slices, it has been suggested that 5-HT induces miniature inhibitory postsynaptic potentials in layer II pyramidal cells by activating 5-HT<sub>2A</sub> receptors in a subpopulation of interneurons at the border of layers II and III (Sheldon and Aghajanian, 1990, 1991; Gellman and Aghajanian, 1994; Marek and Aghajanian, 1994). Further studies led to the conclusion that direct excitatory effects of 5-HT on pyramidal cells were mediated by 5-HT<sub>2C</sub> rather than 5-HT<sub>2A</sub> receptors (Sheldon and Aghajanian, 1991; see also Wright et al., 1995). Direct 5-HT<sub>2A</sub> effects on the pyramidal neurons in piriform cortex remain to be documented.

The lateral olfactory tract displayed strong immunoreactivity in a large number of its myelinated axons, presumably because these are, for the most part, issued from the mitral and tufted cells in the olfactory bulb. In this context, the ultrastructural demonstration of a lack of axon terminal labeling in the molecular layer of piriform

cortex was all the more significant because many of these axons end within that layer. Unfortunately, no autoradiographic data are currently available on the laminar distribution of specific radioligand binding to 5-HT<sub>2A</sub> receptors in piriform cortex.

***Septum and hippocampus.*** The presence of scattered 5-HT<sub>2A</sub>-immunoreactive neurons in the medial septal nucleus and in the nuclei of the diagonal band of Broca was in full agreement with earlier ligand binding and *in situ* hybridization data (Pazos et al., 1985; Appel et al., 1990; Pompeiano et al., 1994; Wright et al., 1995). The absence of such labeling in the adjacent nucleus basalis magnocellularis had already been noted by Morilak and Ciaranello (1993; see also Pompeiano et al., 1994).

The strong and widespread distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in hippocampus was also in keeping with ligand binding and *in situ* hybridization results (e.g., Pompeiano et al., 1994; Wright et al., 1995). However, it did not match the density of 5-HT innervation (Oleskevitch and Descarries, 1990), notably in the oriens layer of CA1 and CA3, in which only scattered 5-HT<sub>2A</sub>-immunoreactive interneurons were detected. On the other hand, the relatively lower density of immunostaining in cell bodies than dendrites of the stratum pyramidale and granulosum throughout hippocampus did seem to match the low density of 5-HT innervation in both these cell layers.

There is good electrophysiological evidence for the presence of 5-HT<sub>2A</sub> receptor in hippocampal pyramidal neurons. Whole cell

recordings from pyramidal cell bodies freshly dissociated from 2-week-old rat ventral hippocampal CA1 have demonstrated an outward current (hyperpolarizing) induced by 5-HT, mimicked by alpha-methyl-5-HT and blocked by ketanserin in a concentration dependent manner (Uneyama et al., 1992). In slices, hyperpolarization and slow excitatory responses of CA1 pyramidal neurons to 5-HT have been attributed to 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors, respectively (Andrade et al., 1986; Colino and Halliwell, 1987; Andrade and Nicoll, 1987; Gurevich et al., 1990; Andrade and Chaput, 1991). In keeping with the presence of 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in some hippocampal interneurons, other 5-HT effects on pyramidal or granule cell activity have been shown to result from the activation of 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub> or 5-HT<sub>3</sub> receptors located on gamma aminobutyric acid (GABA)ergic interneurons (Segal, 1990; Ropert and Guy, 1991; Kawa, 1994; Piguet and Galvan, 1994; Shen and Andrade, 1998). In all these studies, however, a clear distinction between 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> responses was not possible, owing to the limited selectivity of available agonists and antagonists. Moreover, *in situ* hybridization has demonstrated the presence of these two receptor subtypes in hippocampal interneurons as well as pyramidal and granule cells (Wright et al., 1995). In this context, it appears likely that, in hippocampus at least, the physiological effects of 5-HT mediated by 5-HT<sub>2A</sub> receptors also entail and/or require co-activation of other 5-HT receptor subtypes.

***Basal ganglia and amygdala.*** All components of the basal ganglia (nucleus accumbens, ventral pallidum, caudate putamen, globus pallidus and entopeduncular nucleus) showed relatively abundant somatodendritic 5-HT<sub>2A</sub> receptor labeling, in keeping with earlier *in situ* hybridization (Mengod et al., 1990; Pompeiano et al., 1994; Wright et al., 1995; Mijnster et al., 1997) radioligand binding (Pazos et al., 1985; Roth et al., 1987; Fischette et al., 1987; Appel et al., 1990; Radja et al., 1993; López-Giménez, 1997) and immunocytochemical data (Morilak et al., 1993; Hamada et al., 1998).

In the neostriatum, the immunoreactivity of a vast majority of the medium spiny neurons was consistent with iontophoretic results showing depression by DOI of the spontaneous firing rate of 92% of striatal neurons in normal rat (El Mansari et al., 1994). Moreover, it has recently been shown that 5-HT<sub>2A</sub> mRNA hybridized cells represent 80% of all Nissl-stained neurons in this region (Laprade et al., 1996), whereas double labeling *in situ* hybridization data have indicated that the receptor mRNA is present in both enkephalinergic (striatopallidal) and dynorphinergic (striatonigral) projection neurons (Ward and Dorsa, 1996; Mijnster et al., 1997). It was also of interest to observe some large, intensely immunostained cells throughout the neostriatum, some of which could be cholinergic interneurons. In the globus pallidus and entopeduncular nucleus, the existence of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor had previously gone unnoticed, presumably because the widely spaced immunostained

somata/dendrites could only give rise to absent or weak ligand binding and *in situ* hybridization signals.

The 5-HT<sub>2A</sub> immunostaining of the amygdalar complex was also stronger and more widespread than expected from earlier autoradiographic (Pazos et al., 1985) and immunocytochemical reports (Morilak et al., 1993). The heterogeneous distribution of the immunoreactivity contrasted with the uniform distribution of its mRNA (Wright et al. 1995), presumably because of local differences in post-transcriptional processing. The 5-HT<sub>2</sub> receptors of this region have been implicated in kindling epileptogenesis in the rat (Wada et al., 1997).

***Diencephalon.*** There was a marked contrast between the strong and widespread, yet anatomically selective 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in the thalamic region and the weaker and/or less abundant immunostaining in hypothalamus.

In the thalamus, the 5-HT<sub>2A</sub> somatodendritic immunoreactivity in numerous relay nuclei was unexpected in view of the reported lack of mRNA hybridization signals, except in the reticular nucleus (Pompeiano et al., 1994; Wright et al., 1995). The moderate albeit abundant dendritic immunoreactivity in the parafascicular and ventrolateral nuclei correlated with earlier measurements of moderate levels of binding (Pazos et al., 1985; Appel et al., 1990), but only low to very low or negligible binding levels had been described in all other thalamic nuclei including the most intensely immunoreactive. The presence of 5-HT<sub>2A</sub> receptor in

thalamic relay nuclei could account for the fact that local administration of the 5-HT<sub>2A/2C</sub> agonist DOI into the ventroposteromedial thalamus decreases the neocortical high voltage spindle activity in adult rats, an effect blocked by systemic administration of ketanserin (Jäkälä et al., 1995). The detection of high levels of 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactivity in the lateral as well as medial geniculate nucleus was consistent with the observation that systemic administration of the 5-HT<sub>2A/2C</sub> antagonist ketanserin potentiates the inhibitory effects of 5-HT iontophoresed in these thalamic relay nucleus (Lakoski and Aghajanian, 1985).

In hypothalamus, 5-HT<sub>2A</sub> receptors have been implicated in the 5-HT control of various neuroendocrine responses (oxytocin, adrenocorticotrophic hormone [ACTH] and prolactin secretion; e.g., Bagdy, 1996). The immunoreactivity in the ventromedial and medial mamillary nuclei did seem to correlate with significant levels of both 5-HT<sub>2A</sub> mRNA and 5-HT<sub>2A</sub> binding sites (Pazos, 1985; Appel et al., 1990; Pompeiano et al., 1994; Wright et al., 1995), but the relationship did not hold true for several other nuclei showing relatively strong immunoreactivity (parastrial, supramamillary, magnocellular preoptic and magnocellular nucleus of lateral hypothalamus). It was noteworthy that other nuclei displaying little if any somatodendritic immunoreactivity have been shown to receive a relatively dense 5-HT innervation (Descarries and Beaudet, 1978; Steinbusch and Nieuwenhuys, 1981).

**Cerebellum.** The selective localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactivity in Purkinje cells was consistent with recent immunocytochemical observations by Maeshima et al. (1998b) using a different antibody. As proposed by this author, the negative *in situ* hybridization and radioligand binding results previously reported for this region (Pazos et al., 1985; Fischette et al., 1987; Appel et al., 1990; Pompeiano et al., 1994; Wright et al., 1995) could be due to lower sensitivity of both techniques or the presence of a splicing variant of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor. In the cerebellar nuclei, intermediate levels of 5-HT<sub>2A</sub> mRNA have been described (Wright et al., 1995). 5-HT<sub>2A/2C</sub> activation of GABAergic interneurons has been suggested to account at least in part for inhibitory effects of 5-HT on the spontaneous activity of dentate and interpositus neurons (Cumming-Hood et al., 1993). Yet, the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in numerous axons of the superior cerebellar peduncle indicates that projection neurons in the deep cerebellar nuclei also express 5-HT<sub>2A</sub> receptor.

**Brainstem and spinal cord.** The detection of somatodendritic 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in many nuclei of the brainstem and spinal cord complemented early autoradiographic observations of binding sites in the inferior olive and facial nucleus (Pazos et al., 1985; Appel et al., 1990), but also in motor nucleus of trigeminal nerve, dorsal motor nucleus of the vagus, solitary nucleus and hypoglossal nucleus (Fischette et al., 1987). It was also consistent with the *in situ* hybridization data of Pompeiano et al., (1994) and



Wright et al. (1995) and with the recent immunocytochemical results of Hamada et al. (1998), Maeshima et al. (1998) and Jansson et al. (1998). It could account for 5-HT<sub>2A</sub> mediated effects of 5-HT, as described in the facial nucleus (Rasmussen and Aghajanian, 1990), trigeminal nucleus (Hsiao et al., 1997), midbrain tectum (Brandão et al., 1991) and midbrain dopamine neurons (Ugedo et al., 1989). Moderately 5-HT<sub>2A</sub>-immunoreactive somata and dendrites were visible in the dopamine-rich substantia nigra, pars compacta, reticularis, and lateralis, but not in the serotonin-containing raphe dorsalis nucleus or noradrenaline-containing locus coeruleus.

One of the most striking localization was to motoneurons, which all showed strong immunoreactivity from cranial nerve nuclei to spinal cord. 5-HT<sub>2A</sub> receptors have been implicated in complex behaviors dependent on 5-HT and involving hindbrain neuron activity, such as shaking behavior (head shakes and wet-dog shakes), forepaw tapping and skin jerks (for review, see Pranzatelli, 1990). All 5-HT-mediated motor syndromes are not dependent on 5-HT<sub>2A</sub> receptor activation, however, and at least some of their components might require the coactivation of other 5-HT receptor subtypes such as the 5-HT<sub>1A</sub> or 5-HT<sub>2C</sub>, perhaps co-localized with their 5-HT<sub>2A</sub> homologues (Backus et al., 1990; Darmani et al., 1990 a,b; Wright et al., 1995).

In spinal cord, the distribution of the somatodendritic 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity was also consistent with *in situ* hybridization results (Pompeiano et al, 1994; Wright et al., 1995), as well as earlier

ligand binding data (Fischette et al., 1987; Marlier et al., 1991). The cytoplasmic localization of the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in anterior horn motoneurons was emphasized in the recent immunocytochemical description of Maeshima et al. (1998a), who also observed the 5-HT<sub>2A</sub> immunolabeling in the intermediolateral cell column, suggesting a role for this receptor in the 5-HT control of sympathetic as well as motoneuron function. 5-HT<sub>2A</sub> receptors have also been implicated in nociception (Eide and Hole, 1991; Doi-Saika et al., 1997). The weakly 5-HT<sub>2A</sub> immunostained neurons in dorsal horn could be involved in this modulation.

The present study demonstrated prominent 5-HT<sub>2A</sub> immunostaining of myelinated axons in the dorsal corticospinal tract and numerous other spinal cord fascicles issued from nuclei displaying immunoreactive somata/dendrites. This included the gracile and cuneate fasciculi, in which excitatory and inhibitory effects of 5-HT have been recorded as excitability changes from myelinated axons and respectively attributed to 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors located directly on these fibers (Saruhashi et al., 1994, 1997). Similarly, 5-HT<sub>2A</sub> immunolabeled axons could be observed in the dorsal root, in keeping with the detection of 5-HT<sub>2A</sub> mRNA and immunoreactivity in dorsal root ganglia (Pierce et al., 1996; Maeshima et al., 1998a).

At variance with Maeshima et al. (1998a), who detected glial 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in all white matter fasciculi of the spinal cord, we observed a selective localization of the 5-HT<sub>2A</sub>

immunolabeling to radial glia. It remains to be determined whether this selective localization reflected a regional specificity of expression or merely the presence of a greater concentration of 5-HT<sub>2A</sub> receptor in these as opposed to other spinal cord glial cells.

### **Subcellular localization of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor**

One of the main results of the present study was the demonstration that a major fraction of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor was cytoplasmic rather than membrane bound in both its somatodendritic and axonal locations. It could not be excluded that the present antibody failed to recognize the receptor associated with the plasma membrane because of epitope masking due to conformational changes and/or steric hindrance. However, the significant albeit low proportion of immunogold labeling associated with the membrane of dendrites weakened this possibility.

A more likely explanation was that the 5-HT<sub>2A</sub> receptor is permanently internalized for the most part under normal, physiological conditions. Ligand-induced internalization has been described for various G protein-coupled neurotransmitter receptor proteins in CNS tissue, including the neuropeptides, substance P (Mantyh et al., 1995ab), neurotensin (Faure et al., 1995), opioid (Sternini et al., 1996) and somatostatin (Dournaud et al., 1998), and the D<sub>1</sub> dopamine (Dumartin et al., 1998) and m<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptors (Bernard et al., 1998). In the study of Dournaud et al. (1998), low proportions of membrane-associated as compared to intracellular sst<sub>2A</sub> receptor immunoreactivity were

found after immunogold labeling in brain regions where the somata/dendrites laden with receptor were heavily innervated by somatostatin fibers. In the case of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor, however, there was no apparent relationship between the local density of 5-HT innervation and that of the intrasomatic or dendritic immunolabeling of the receptor, as also recently emphasized in the double labeling, fluorescence immunocytochemical study of Jansson et al. (1998). This latter study has insisted on the importance of diffuse (volume) transmission by 5-HT for the activation of this receptor, in keeping with an earlier suggestion that this receptor acts as a neuronal sensor of the ambient 5-HT levels in CNS tissue (Cornea-Hébert et al., 1997).

In this context, it may be postulated that the predominantly cytoplasmic localization of the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity reflects a particular mode of functioning for this 5-HT receptor subtype. It could account for the relative low affinity of this 5-HT receptor subtype for its endogenous ligand, at least in whole tissue (Peroutka and Snyder, 1979), assuming that only the small fraction located on the plasma membrane would have a high affinity for 5-HT. Interestingly, the high affinity agonist state of this receptor has been estimated at approximately 10% of total receptor binding sites in mammalian brain tissue and stably transfected cell lines (Leonhardt et al., 1992), a value strikingly similar to the proportion of membrane-associated 5-HT<sub>2A</sub> receptor found in immunogold-labeled dendrites. The predominant cytoplasmic localization of the

5-HT<sub>2A</sub> receptor could also explain the capacity of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor to bind exogenous ligands (ketanserin) even after agonist-dependent internalization in stably transfected NIH-3T3 cells (Berry et al., 1996), or its apparently desensitized and/or down-regulated states when these cells are cultivated in the presence of serotonin (Saucier and Albert, 1997). Lastly, it could account for the apparently low level of activation of this 5-HT receptor subtype under normal physiological conditions (Leysen, 1992). In adult rat hypothalamus, chronic treatment with fluoxetine has been shown to increase the proportion of high affinity 5-HT<sub>2A/2C</sub> binding sites labeled with the agonist DOI (Teitler et al., 1990), presumably because of increased G protein coupling (Li et al., 1997). It would be of interest to know whether the fraction of hypothalamic 5-HT<sub>2A</sub> receptor located on the plasma membrane is then increased as opposed to that in the cytoplasm.

Another major finding was that the intracellular 5-HT<sub>2A</sub> receptor was more concentrated in dendrites than neuronal cell bodies (e.g., Figs. 8-11, 15-19). In this context, the absence of 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in dendritic spines appeared all the more significant. It was observed in many brain regions containing 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactive cell bodies and/or dendrites of neurons known to be densely spiny (cortex, neostriatum, hippocampus, cerebellum). This finding suggested a mode of functioning having little dependency on synaptic input. Accordingly, the lack of 5-HT<sub>2A</sub> labeling of axon terminals in regions known to receive a strong

innervation from 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactive cell bodies and axons seemed to rule out the mediation of so-called "presynaptic" effects.

Intracellular 5-HT<sub>2A</sub> receptor could serve various functions. For example, it might activate intracellular phosphorylation pathways used by cytokines or other chemical messengers, as recently described in rat skeletal myoblasts by Guillet-Deniau et al. (1997). These authors even showed that the 5-HT<sub>2A</sub> receptor coprecipitated with Jak2, and was therefore physically bound to this cytoplasmic signal transducer involved in the cascade. The 5-HT<sub>2A</sub> receptor has also been demonstrated to mediate induction by 5-HT of early response genes, such as prostaglandin G/H synthase-2 and *egr-1* (Tilakaratne and Friedman, 1996; Goppelt-Struebe and Stroebel, 1998). A 5-HT<sub>2A</sub> mediation of the regulation of other genes, evidenced by the expression of the mRNAs for brain-derived neurotrophic factor (Vaidya et al., 1997) several neuropeptides, and glutamic acid decarboxylase (Mijnster et al., 1998), could also operate through such mechanisms.

In view of these properties, the predominant intradendritic and intra-axonal localization of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the absence of dendritic spine and axon terminal labeling could represent not only anterogradely transported, but also retrogradely transported 5-HT<sub>2A</sub> receptor moving toward the nucleus. Strong autoradiographic evidence for such a retrograde axonal transport in rat brain has indeed been provided by Snowhille and Wamsley (1983) in [<sup>3</sup>H]ketanserin binding autoradiographic experiments after

mesencephalic transection of the medial forebrain bundle. The 5-HT<sub>2A</sub> receptor could thus fulfill the requirements of a retrograde signaling system arising from both the dendritic and axonal arborization and accessing the nucleus following activation by 5-HT.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Sylvia Garcia, Annie Vallée and Kenneth C. Watkins for expert technical assistance, and Gaston Lambert for the photography. The study was supported by grant MT-3544 from the Medical Research Council of Canada (L.D.) and NIH grant IR 43 MH 54437-01 (S.S.). V.C.-H. and M.R., respectively held a Studentship and a Postdoctoral Fellowship from the GRSNC (Centre FCAR) at the Université de Montréal, and C.W. an Overseas Research Student Award from the CVCP, U.K. The authors are also indebted to PharMingen (San Diego, CA) for its generous gift of 5-HT<sub>2A</sub> antibody.

**LITERATURE CITED**

- Abramowski, D., M. Rigo, D. Duc, D. Hoyer, and M. Staufenbiel (1995) Localization of the 5-Hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor protein in human and rat brain using specific antisera. *Neuropharmacology* 34:1635-1645.
- Aghajanian, G.K. and G.J. Marek (1997) Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. *Neuropharmacology* 36:589-599.
- Altar, C.A., H. Kim, and J.F. Marshall (1985) Computer imaging and analysis of dopamine (D<sub>2</sub>) and serotonin (S<sub>2</sub>) binding sites in rat basal ganglia or neocortex labeled by [<sup>3</sup>H]spiroperidol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233:527-538.
- Altar, C.A., W.C. Boyar, and M.R. Marien (1986) <sup>125</sup>I-LSD autoradiography confirms the preferential localization of caudate-putamen S<sub>2</sub> receptors to the caudal (peripallidal) region. *Brain Res.* 372:130-136.
- Andrade, R. and Y. Chaput (1991) 5-Hydroxytryptamine 4-like receptors mediate the slow excitatory response to serotonin in the rat hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257:930-937.
- Andrade, R. and R. A. Nicoll (1987) Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded *in vitro*. *J. Physiol.* 394:99-124.



- Andrade, R., R.C. Malenka, and R. A. Nicoll (1986) A G protein couples serotonin and GABAB receptors to the same channels in hippocampus. *Science* 234:1261-1265.
- Appel, N. M., Wm.M. Mitchell, R.K. Garlick, R.A. Glennon, M. Teitler, and E.B. DeSouza (1990) Autoradiographic characterization of ( $\pm$ )-1-(2,5-dimethoxy-4-[ $^{125}$ I]iodophenyl)-2-aminopropane ([ $^{125}$ I]DOI) binding to 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1C</sub> receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255:843-857.
- Araneda, R. and R. Andrade (1991) 5-hydroxytryptamine 2 and 5-hydroxytryptamine 1A receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40:399-412.
- Arora, R.C. and H.Y. Meltzer (1991) Serotonin 2 (5-HT<sub>2</sub>) receptor binding in the frontal cortex of schizophrenic patients. *J. Neural Transm.* 85:19-29.
- Arranz, M.J., J. Munro, M.J. Owen, G. Spurlock, P.C. Sham, J. Zhao, G. Kirov, D.A. Collier, and R.W. Kerwin (1998) Evidence for association between polymorphisms in the promoter and coding regions of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene and response to clozapine. *Mol. Psychiatry* 3:61-66.
- Arvanov, V.L. and R.Y. Wang (1998) M100907, a selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist and a potential antipsychotic drug, facilitates N-methyl-D-aspartate-receptor mediated neurotransmission in the rat medial prefrontal cortical neurons in vitro. *Neuropsychopharmacology* 18:197-209.

- Ashby, C.R. Jr., E. Edwards, and R.Y. Wang (1994) Electrophysiological evidence for a functional interaction between 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat medial prefrontal cortex: an iontophoretic study. *Synapse* 17:173-181.
- Audet, M.A., L. Descarries, and G. Doucet (1989) Quantified regional and laminar distribution of the serotonin innervation in the anterior half of adult rat cerebral cortex. *J. Chem. Neuroanat.* 2:29-44.
- Backus, L.I., T. Sharp, and D.G. Grahame-Smith (1990) Behavioural evidence for a functional interaction between central 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.* 100:793-799.
- Bagdy, G. (1996) Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor-mediated oxytocin, prolactin and ACTH/corticosterone responses. *Behav. Brain Res.* 73: 277-280.
- Berendsen, H.H.G. and C.L.E. Broekkamp (1991) Attenuation of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> but not 5-HT<sub>1C</sub> receptor mediated behaviour in rats following chronic treatment with 5-HT receptor agonists, antagonists or anti-depressants. *Psychopharmacology* 105:219-224.
- Bernard, V., O. Laribi, A.I. Levey, and B. Bloch (1998) Subcellular re-distribution of m2 muscarinic acetylcholine receptors in striatal interneurons in vivo following acute cholinergic stimulation. *J. Neurosci.* 18:10207-10218.

- Berry, S.A., M.C. Shah, N. Khan, and B.L. Roth (1996) Rapid agonist-induced internalization of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor occurs via the endosome pathway in vitro. *Mol. Pharmacol.* *50*:306-313.
- Biegon, A. and M. Israeli (1987) Quantitative autoradiographic analysis of the effects of electroconvulsive shock on serotonin-2 receptors in male and female rats. *J. Neurochem.* *48*:1386-1391.
- Biver, F., D. Wikler, F. Lotstra, P. Damhaut, S. Goldman, and J. Mendlewicz (1997) Serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor imaging in major depression: focal changes in orbito-insular cortex. *Br. J. Psychiatry* *171*:444-448.
- Blue, M.E., K.A. Yagaloff, L.A. Mamounas, P.R. Hartig, and M.E. Molliver (1988) Correspondence between 5-HT<sub>2</sub> receptors and serotonergic axons in rat neocortex. *Brain Res.* *453*:315-328.
- Boess, F.G. and I.L. Martin (1994) Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* *33*:275-317.
- Brandão, M.L., J.A. Lopez-Garcia, F.G. Graeff, and M.H.T. Roberts (1991) Electrophysiological evidence for excitatory 5-HT<sub>2</sub> and depressant 5-HT<sub>1A</sub> receptors on neurones of the rat midbrain tectum. *Brain Res.* *556*:259-266.
- Burnet, P.W.J., S.L. Eastwood, K. Lacey, and P.J. Harrison (1995) The distribution of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA in human brain. *Brain Res.* *676*:157-168.

- Burnet, P.W.J., S.L. Eastwood, and P.J. Harrison (1996) 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 15:442-455.
- Carlton, S.M. and R.E. Coggeshall (1997) Immunohistochemical localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in peripheral sensory axons in rat glabrous skin. *Brain Res.* 763:271-275.
- Chen , H., L. Zhang, D.R. Rubinow, and De-M. Chuang (1995) Chronic buspirone treatment differentially regulates 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA and binding sites in various regions of the rat hippocampus. *Molec. Brain Res.* 32:348-353.
- Colino, A. and J.V. Halliwell (1987) Differential modulation of three separate K-conductances in hippocampal CA1 neurons by serotonin. *Nature* 328:73-77.
- Compan V., L. Segu, M.C. Buhot, and A. Daszuta (1998) Selective increases in serotonin 5-HT<sub>1B/1D</sub> and 5-HT<sub>2A/2C</sub> binding sites in adult rat basal ganglia following lesions of serotonergic neurons. *Brain Res.* 793:103-111.
- Cornea-Hébert V., M. Riad, F. Zerari, S. Garcia, L. Descarries, C. Wu, and S. Singh (1996) Cellular mapping of 5-HT<sub>2A</sub> receptor protein in adult rat CNS. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22:1775.
- Cornea-Hébert V., S. Vermette, S. Garcia, N. Laprade, C. Wu, J.-J. Soghomonian, and L. Descarries (1997) Serotonin depletion

by PCPA lowers 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactivity but increases its mRNA levels in adult rat brain. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23:971.

Cumming-Hood, P.A., H.K. Strahlendorf, and J.C. Strahlendorf (1993) Effects of serotonin and the 5-HT<sub>2/1C</sub> receptor agonist DOI on neurons of the cerebellar dentate/interpositus nuclei: possible involvement of a GABAergic interneuron. *Eur. J. Pharmacol.* 236:457-465.

Darmani, N.A., B.R. Martin, U. Pandey, and R.A. Glennon (1990) Do functional relationships exist between 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36:901-906.

Davies, M.F., R.A. Deisz, D.A. Prince, and S.J. Peroutka (1987) Two distinct effects of 5-hydroxytryptamine on single cortical neurons. *Brain Res.* 423:347-352.

DeFelipe, J. and E.G. Jones (1988) A light and electron microscopic study of serotonin-immunoreactive fibers and terminals in the monkey sensory-motor cortex. *Exp. Brain Res.* 71:171-182.

Descarries, L. and A. Beaudet (1978) The serotonin innervation of adult rat hypothalamus. In J.D. Vincent, C. Kordon (eds): *Cell Biology of Hypothalamic Neurosecretion*. Paris: Editions du C.N.R.S., pp. 135-153.

Descarries, L., A. Beaudet, and K.C. Watkins (1975) Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res.* 100:563-588.

- D'haenen, H., A. Bossuyt, J. Mertens, C. Bossuyt-Piron, M. Gijsemans, and L. Kaufman (1992) SPECT imaging of serotonin 2 receptors in depression. *Psychiatry Res.* *45*:227-237.
- Doi-Saika, M., A. Tokunaga, and E. Senba (1997) Intradermal 5-HT induces Fos expression in rat dorsal horn neurons not via 5-HT<sub>3</sub> but via 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *Neurosci. Res.* *29*:143-149.
- Dournaud, P., H. Boudin, A. Schonbrunn, G.S. Tannenbaum, and A. Beaudet (1998) Interrelationships between somatostatin sst<sub>2A</sub> receptors and somatostatin-containing axons in rat brain: evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin. *J. Neurosci.* *18*:1-16.
- Dumartin, B., I. Caillé, F. Gonon, and B. Bloch (1998) Internalization of D<sub>1</sub> dopamine receptor in striatal neurons in vivo as evidence of activation by dopamine agonists. *J. Neurosci.* *18*:1650-1661.
- Duxon, M.S., T.P. Flanigan, A.C. Reavley, G.S. Baxter, T.P. Blackburn, and K.C.F. Fone (1997) Evidence for expression of the 5-hydroxytryptamine-2B receptor protein in the rat central nervous system. *Neuroscience* *76*:323-329.
- Eide, P.K. and K. Hole (1991) Different role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in spinal cord in the control of nociceptive responsiveness. *Neuropharmacology* *30*:727-731.
- El Mansari, M., F. Radja, A. Ferron, T.A. Reader, E. Molina-Holgado, and L. Descarries (1994) Hypersensitivity to serotonin and its

agonists in serotonin-hyperinnervated neostriatum after neonatal dopamine denervation. *Eur. J. Pharmacol.* 261:171-178.

Faure, M.P., A. Alonso, D. Nouel, G. Gaudriault, M. Dennis, J.P. Vincent, and A. Beaudet (1995) Somatodendritic internalization and perinuclear targeting of neurotensin in mammalian brain. *J. Neurosci.* 15:4140-4147.

Fischette, C.T., B. Nock, and K. Renner (1987) Effects of 5,7-dihydroxytryptamine on serotonin 1 and serotonin 2 receptors throughout the rat central nervous system using quantitative autoradiography. *Brain Res.* 421:263-279.

Flanigan, T.P., A.C. Reavley, J.E. Carey, and R.A. Leslie (1995) Evidence for expression of the 5-HT<sub>2B</sub> receptor mRNA in rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 114:369P.

Gellman, R.L. and G.K. Aghajanian (1994) Serotonin 2 receptor-mediated excitation of interneurons in piriform cortex: antagonism by atypical antipsychotic drugs. *Neuroscience* 58:515-525.

Glennon, R.A., M. Titeler, and J.D. McKenney (1984) Evidence for 5-HT<sub>2</sub> involvement in the mechanism of action of hallucinogenic agents. *Life Sci.* 35:2505-2511.

Goppelt-Struebe, M. and M. Stroebel (1998) Signaling pathways mediating induction of the early response genes prostaglandin

G/H synthase-2 and egr-1 by serotonin via 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *J. Cell. Physiol.* 175:341-347.

Gross-Isseroff, R., D. Salama, M. Israeli, and A. Biegon (1990) Autoradiographic analysis of [<sup>3</sup>H]ketanserin binding in the human brain postmortem: effect of suicide. *Brain Res.* 507:208-215.

Guillet-Deniau, I., A-F. Burnol, and J. Girard (1997) Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J. Biol. Chem.* 272:14825-14829.

Gurevich, N., P.H. Wu, and P.L. Carlen (1990) Serotonin agonist and antagonist actions in hippocampal CA1 neurons. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68:586-595.

Hamada, S., K. Senzaki, K. Hamaguchi-Hamada, K. Tabuchi, H. Yamamoto, T. Yamamoto, S. Yoshikawa, H. Okano, and N. Okado (1998) Localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptor in rat cerebral cortex and olfactory system revealed by immunohistochemistry using two antibodies raised in rabbit and chicken. *Mol. Brain Res.* 54:199-211.

Hoyer, D., D.E. Clarke, J.R. Fozard, P.R. Hartig, G.R. Martin, E.J. Mylecharane, P.R. Saxena, and P.P.A. Humphrey (1994) VII. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46:157-203.



- Hrdina P.D., E. Demeter, T.B. Vu, P. Sótónyi, and M. Palkovits (1993) 5-HT uptake sites and 5-HT<sub>2</sub> receptors in brain of antidepressant-free suicide victims/depressives: increase in 5-HT<sub>2</sub> sites in cortex and amygdala. *Brain Res.* 614:37-44.
- Hsiao, C.F., P.R. Trueblood, M.S. Levine, and S.H. Chandler (1997) Multiple effects of serotonin on membrane properties of trigeminal motoneurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 77:2910-2924.
- Jakab, R.L. and P.S. Goldman-Rakic (1998) 5-Hydroxytryptamine 2A serotonin receptors in the primate cerebral cortex: Possible site of action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:735-740.
- Jäkälä, P., J. Sirviö, E. Koivisto, M. Björklund, J. Kaukua, and P. Riekkinen Jr. (1995) Modulation of rat neocortical high-voltage spindle activity by 5-HT<sub>1</sub>/5-HT<sub>2</sub> receptor subtype specific drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 282:39-55.
- Jansson, A., B. Tinner, H.W.M. Steinbusch, L.F. Agnati, and K. Fuxe (1998) On the relationship of 5-hydroxytryptamine neurons to 5-hydroxytryptamine 2A receptor-immunoreactive neuronal processes in the brain stem of rats. A double immunolabelling analysis. *NeuroReport* 9:2505-2511.
- Kapur, S., R.B. Zipursky, G. Remington, C. Jones, J. DaSilva, A.A. Wilson, and S. Houle (1998) 5-HT<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> receptor occupancy of olanzapine in schizophrenia: a PET investigation. *Am. J. Psychiatry* 155:921-928.

- Kawa, K. (1994) Distribution and functional properties of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat hippocampal dentate gyrus: a patch-clamp study. *J. Neurophysiol.* *71*:1935-1947.
- Kruger, L., S. Saporta, and L. W. Swanson (1995) *Photographic Atlas of the Rat Brain*. New York: Cambridge University Press.
- Lafaille, F., S.A. Welner, and B.E. Suranyi-Cadotte (1991) Regulation of serotonin type 2 (5-HT<sub>2</sub>) and  $\beta$ -adrenergic receptors in rat cerebral cortex following novel and classical antidepressant treatment. *J. Psychiatr. Neurosci.* *16*:209-214.
- Lakoski, J.M. and G.K. Aghajanian (1985) Effects of ketanserin on neuronal responses to serotonin in the prefrontal cortex, lateral geniculate and dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* *24*:265-273.
- Laprade, N., F. Radja, T.A. Reader, and J-J. Soghomonian (1996) Dopamine receptor agonists regulate levels of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor and its mRNA in a subpopulation of rat striatal neurons. *J. Neurosci.* *16*:3727-3736.
- Leonhardt, S., E. Gorospe, B.J. Hoffman, and M. Teitler (1992) Molecular pharmacological differences in the interaction of serotonin with 5-hydroxytryptamine 1C and 5-hydroxytryptamine 2 receptors. *Molec. Pharmacol.* *42*:328-335.
- Leysen, J.E. (1992) 5-HT<sub>2</sub>-receptors: location, pharmacological, pathological and physiological role. In S.Z. Langer, N. Brunello, G. Racagni, J. Mendlewicz (eds): *Serotonin Receptor Subtypes:*

Pharmacological Significance and Clinical Implications. Int. Acad. Biomed. Drug Res. Basel: Karger, pp. 31-43.

Leysen, J.E., C.J.E Niemegeers, J.P. Tollenaere, and P.M. Laduron (1978) Serotonergic component of neuroleptic receptors. *Nature* 272:168-171.

Leysen, J.E., C.J.E Niemegeers, J.M. Van Nueten, and P.M. Laduron (1982) [<sup>3</sup>H]ketanserin (R 41 468) a selective <sup>3</sup>H ligand for serotonin 2 receptor binding sites. Binding properties, brain distribution, and functional role. *Molec. Pharmacol.* 21:301-314.

Li Q., N.A. Muma, G. Battaglia, and L.D. Van de Kar (1997) Fluoxetine gradually increases [<sup>125</sup>I]DOI-labelled 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors in the hypothalamus without changing the levels of Gq- and G11-proteins. *Brain Res.* 775:225-228.

Lidov, H.G.W., Grzanna R., and M.E. Molliver (1980) The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat-an immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 5:207-227.

López-Giménez, J.F., G. Mengod, J.M. Palacios, and M.T. Vilaro (1997) Selective visualisation of rat brain 5-HT<sub>2A</sub> receptors by autoradiography with [<sup>3</sup>H]MDL 100,907. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 356:446-454.

Maeshima, T., R. Ito, S. Hamada, K. Senzaki, K. Hamaguchi-Hamada, F. Shutoh, and N. Okado (1998a) The cellular localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the spinal cord and spinal ganglia of the adult rat. *Brain Res.* 797:118-124.

- Maeshima, T., F. Shutoh, S. Hamada, K. Senzaki, K. Hamaguchi-Hamada, R. Ito, and N. Okado (1998b) Serotonin 2A receptor-like immunoreactivity in rat cerebellar Purkinje cells. *Neurosci. Lett.* 252:72-74.
- Mantyh, P.W., C.J. Allen, J.R. Ghilardi, S.D. Rogers, C.R. Mantyh, H.T. Liu, A.I. Basbaum, S.R. Vigna, and J.E. Maggio (1995a) Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: substance P-evoked internalization of its receptor in the rat striatum in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:2622-2626.
- Mantyh, P.W., E. DeMaster, A. Malhotra, J.R. Ghilardi, S.D. Rogers, C.R. Mantyh, H.T. Liu, A.I. Basbaum, S.R. Vigna, and J.E. Maggio (1995b) Receptor endocytosis and dendrite reshaping in spinal neurons after somatosensory stimulation. *Science* 268:1629-1632.
- Marek, G.J. and G.K. Aghajanian (1994) Excitation of interneurons in piriform cortex by 5-hydroxytryptamine: blockade by MDL 100,907, a highly selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 259:137-141.
- Marek, G.J. and G.K. Aghajanian (1996) LSD and the phenethylamine hallucinogen DOI are potent partial agonists at 5-HT<sub>2A</sub> receptors on interneurons in rat piriform cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278:1373-1382.
- Marlier, L., J.-R. Teilhac, C. Cerruti, and A. Privat (1991) Autoradiographic mapping of 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat spinal cord. *Brain Res.* 550:15-23.

- Masellis, M., V. Basile, H.Y.Meltzer, J.A. Lieberman, S. Sevy, F.M. Macciardi, P. Cola, A. Howard, F. Badri, M.M. Nöthen, W. Kalow, and J.L.Kennedy (1998) Serotonin subtype 2 receptor genes and clinical response to clozapine in schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacology* 19:123-132.
- McKenna, D.J., A.J. Nazarali, A. Himeno, and J.M. Saavedra (1989a) Chronic treatment with (+) DOI, a psychotomimetic 5-HT<sub>2</sub> agonist, downregulates 5-HT<sub>2</sub> receptors in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 2:81-87.
- McKenna, D.J., A.J. Nazarali, A. J. Hoffman, D.E. Nichols, C.A. Mathis, and J.M. Saavedra (1989b) Common receptors for hallucinogens in rat brain: a comparative autoradiographic study using [<sup>125</sup>I]LSD and [<sup>125</sup>I]DOI, a new psychotomimetic radioligand. *Brain Res.* 476:45-56.
- McLean, I.W. and P.K. Nakane (1974) Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 22:1077-1083.
- McLean, J.H., A. Darby-King, and G.D. Paterno (1995) Localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA by in situ hybridization in the olfactory bulb of the postnatal rat. *J. Comp. Neurol.* 353:371-378.
- Mengod, G., M. Pompeiano, M.I. Martinez-Mir, and J.M. Palacios (1990) Localization of the mRNA for the 5-HT<sub>2</sub> receptor by *in situ* hybridization histochemistry. Correlation with the distribution of receptor sites. *Brain Res.* 524:139-143.

- Mijnster, M.J., A.G.V. Raimundo, K. Koskuba, H. Klop, G.J. Docter, H.J. Groenewegen, and P. Voorn (1997) Regional and cellular distribution of serotonin 5-hydroxytryptamine 2a receptor mRNA in the nucleus accumbens, olfactory tubercle, and caudate putamen of the rat. *J. Comp. Neurol.* 389:1-11.
- Mijnster, M.J., Y. Galis-de Graaf, and P. Voorn (1998) Serotonergic regulation of neuropeptide and glutamic acid decarboxylase mRNA levels in the rat striatum and globus pallidus: studies with fluoxetine and DOI. *Mol. Brain Res.* 54:64-73.
- Morilak, D.A. and R.D. Ciaranello (1993) 5-HT<sub>2</sub> receptor immunoreactivity on cholinergic neurons of the pontomesencephalic tegmentum shown by double immunofluorescence. *Brain Res.* 627:49-54.
- Morilak, D.A., S.J. Garlow, and R.D. Ciaranello (1993) Immunocytochemical localisation and description of neurons expressing serotonin 2 receptors in the rat brain. *Neuroscience* 54:701-717.
- Morilak, D.A., P. Somogyi, R. Lujan-Miras, and R.D. Ciaranello (1994) Neurons expressing 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat brain: neurochemical identification of cell types by immunocytochemistry. *Neuropsychopharmacology* 11:157-166.
- Mrini, A., H. Moukhles, H. Jacomy, O. Bosler, and G. Doucet (1995) Efficient immunodetection of various protein antigens in glutaraldehyde-fixed brain tissue. *J.Histochem. Cytochem.* 43:1285-1291.

- Nazarali, A.J., D.J. McKenna, and J.M. Saavedra (1989) Autoradiographic localization of 5-HT<sub>2</sub> receptors in rat brain using [<sup>125</sup>I]-DOI, a selective psychotomimetic radioligand. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 13:573-581.
- Numan S., K.H. Lundgren, D.E. Wright, J.P. Herman, and K.B. Seroogy (1995) Increased expression of 5-HT<sub>2</sub> receptor mRNA in rat striatum following 6-OHDA lesions of the adult nigrostriatal pathway. *Mol. Brain Res.* 29: 391-396.
- Oleskevich, S. and L. Descarries (1990) Quantified distribution of the serotonin innervation in adult rat hippocampus. *Neuroscience* 34:19-33.
- Paxinos, G. and C. Watson (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. London: Academic Press.
- Pazos, A., R. Cortez, and J.M. Palacios (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res.* 346:231-249.
- Peroutka, S.J. and S.H. Snyder (1979) Multiple serotonin receptors: differential binding of [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine, [<sup>3</sup>H]lysergic acid diethylamide and [<sup>3</sup>H]spiroperidol. *Mol. Pharmacol.* 16:687-699.
- Pierce P.A., G.X. Xie, J.D. Levine, and S.J. Peroutka (1996) 5-hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70:553-559.

- Piguet, P. and M. Galvan (1994) Transient and long-lasting actions of 5-HT on rat dentate gyrus neurones in vitro. *J. Physiol.* *481*:629-639.
- Pranzatelli, M.R. (1990) Evidence for involvement of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1C</sub> receptors in the behavioral effects of the 5-HT agonist 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenylaminopropane)-2 (DOI). *Neuroscience Lett.* *115*:74-80.
- Pompeiano, M., J.M. Palacios, and G. Mengod (1994) Distribution of the serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor family mRNAs: comparison between 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Mol. Brain Res.* *23*:163-178.
- Radja, F., L. Descarries, K.M. Dewar, and T.A. Reader (1993) Serotonin 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in adult rat brain after neonatal destruction of nigrostriatal dopamine neurons: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res.* *606*:273-285.
- Rahman, S. and R.S. Neuman (1993) Activation of 5-HT<sub>2</sub> receptors facilitates depolarization of neocortical neurons by N-methyl-D-aspartate. *Eur. J. Pharmacol.* *231*:347-354.
- Rasmussen, K. and G.K. Aghajanian (1990) Serotonin excitation of facial motoneurons: receptor subtype characterization. *Synapse* *5*:324-332.
- Riad, M., S. Garcia, M. Hamon, and L. Descarries (1995) Somatodendritic localization of the serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor in adult rat brain. *Soc. Neurosci. Abstr.* *21*:1368.



- Riad, M., N. Jodoin, S. Garcia, X. Langlois, M. Darmon, M. Hamon, and L. Descarries (1996) Axonal localization of the serotonin 5-HT<sub>1B</sub> receptor in adult rat brain. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22:1329.
- Ropert, N. and N. Guy (1991) Serotonin facilitates GABAergic transmission in the CA1 region of rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* 441:121-136.
- Roth, B.L., S. McLean, X.-Z. Zhu, and D.-M. Chuang (1987) Characterization of two [<sup>3</sup>H]ketanserin recognition sites in rat striatum. *J. Neurochem.* 49:1833-1838.
- Roth, B.L., E.P. Palvimaki, S. Berry, N. Khan, N. Sachs, A. Uluer, and M.S. Choudhary (1995) 5-Hydroxytryptamine 2A (5-HT<sub>2A</sub>) receptor desensitization can occur without down-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275:1638-1646.
- Roth, B.L., D.L. Willins, K. Kristiansen, and W.K. Kroeze (1998) 5-Hydroxytryptamine 2-family receptors (5-hydroxytryptamine 2A, 5-hydroxytryptamine 2B, 5-hydroxytryptamine 2C): where structure meets function. *Pharmacol. Ther.* 79:231-257.
- Saruhashi, Y., W. Young, A. Z. Hassan, and R. Park (1994) Excitatory and inhibitory effects of serotonin on spinal axons. *Neuroscience* 61:645-653.
- Saruhashi, Y., W. Young, M. Sugimori, J. Abrahams, and J. Sakuma (1997) Evidence for serotonin sensitivity of adult rat spinal axons: studies using randomized double pulse stimulation. *Neuroscience* 80:559-566.

- Saucier, C. and P.R. Albert (1997) Identification of an endogenous 5-Hydroxytryptamine 2A receptor in NIH-3T3 cells: agonist-induced down-regulation involves decreases in receptor RNA and number. *J. Neurochem.* *68*:1998-2011.
- Saudou, F. and R. Hen (1994) 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. Invited review. *Neurochem. Int.* *25*:503-532.
- Schotte, A. and J.E. Leysen (1988) Distinct autoradiographic labelling of serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors,  $\alpha$ <sub>1</sub>-adrenoceptors, and histamine-H<sub>1</sub> receptors and of tetrabenazine-displaceable ketanserin binding sites in rodent brain with [<sup>125</sup>I]7-amino-8-iodo-ketanserin. *Eur. J. Pharmacol.* *145*:213-216.
- Segal, M. (1990) Serotonin attenuates a slow inhibitory postsynaptic potential in rat hippocampal neurons. *Neuroscience* *36*:631-641.
- Séguéla, P., K.C. Watkins, and L. Descarries (1989) Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* *289*:129-142.
- Sharma, A., T. Punhani, and K.C.F. Fone (1997) Distribution of the 5-hydroxytryptamine 2C receptor protein in adult rat brain and spinal cord determined using a receptor-directed antibody: Effect of 5,7-dihydroxytryptamine. *Synapse* *27*:45-56.
- Sheldon, P.W. and G.K. Aghajanian (1990) Serotonin (5-HT) induces IPSPs in pyramidal layer cells of rat piriform cortex: evidence

for the involvement of a 5-HT<sub>2</sub>-activated interneuron. *Brain Res.* 506:6269.

Sheldon, P.W. and G.K. Aghajanian (1991) Excitatory responses to serotonin (5-HT) in neurons of the rat piriform cortex: evidence for mediation by 5-HT<sub>1C</sub> receptors in pyramidal cells and 5-HT<sub>2</sub> receptors in interneurons. *Synapse* 9:208-218.

Shen, R-Y. and R. Andrade (1998) 5-hydroxytryptamine 2 receptor facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285:805-812.

Smiley, J.F. and P.S. Goldman-Rakic (1996) Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* 367: 431-443.

Snowhill, E.W. and J.K. Wamsley (1983) Serotonin type-2 receptors undergo axonal transport in the medial forebrain bundle. *Eur. J. Pharmacol.* 95:325-327.

Stanley, M. and J.J. Mann (1983) Increased serotonin-2 binding sites in frontal cortex of suicide victims. *Lancet* 29:214-216.

Steinbusch, H.W.M. and R. Nieuwenhuys (1981) Localization of serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat, with special reference to the innervation of the hypothalamus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 133:7-35.

Sternini, C., M. Spann, B. Anton, D.E.Keith Jr., N.W. Bunnett, M. von Zastrow, C. Evans, and N.C. Brecha (1996) Agonist-

selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9241-9246.

Swanson, L.M. (1992) *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*. Amsterdam: Elsevier.

Teitler, M., S. Leonhardt, E.L. Weisberg, and B.J. Hoffman (1990) 4-[<sup>125</sup>I]iodo-(2,5-dimethoxy)phenylisopropylamine and [<sup>3</sup>H]ketanserin labeling of 5-hydroxytryptamine 2 (5-HT<sub>2</sub>) receptors in mammalian cells transfected with a rat 5-HT<sub>2</sub> cDNA: evidence for multiple states and not multiple 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* 38:594-598.

Tilakaratne, N. and E. Friedman (1996) Genomic responses to 5-HT<sub>1A</sub> or 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor activation is differentially regulated in four regions of rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 307:211-217.

Titeler, M., R.A. Lyon, and R.A. Glennon (1988) Radioligand binding evidence implicates the brain 5-HT<sub>2</sub> receptor as a site of action for LSD and phenylisopropylamine hallucinogens. *Psychopharmacology* 94:213-216.

Ugedo, L., J. Grenhoff, and T.H. Svensson (1989) Ritanserin, a 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist, activates midbrain dopamine neurons by blocking serotonergic inhibition. *Psychopharmacology* 98:45-50.

Uneyama, H., M. Munakata, and N. Akaike (1992) 5-HT response of rat hippocampal pyramidal cell bodies. *NeuroReport* 3:633-636.

- Vaidya, V.A., G.J. Marek, G.K. Aghajanian, and R.S. Duman (1997) 5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J. Neurosci.* 17:2785-2795.
- Wada, Y., J. Shiraishi, M. Nakamura, and Y. Koshino (1997) Role of serotonin receptor subtypes in the development of amygdaloid kindling in rats. *Brain Res.* 747:338-342.
- Ward R.P. and D.M. Dorsa (1996) Colocalization of serotonin receptor subtypes 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, and 5-HT<sub>6</sub> with neuropeptides in rat striatum. *J. Comp. Neurol.* 370:405-414.
- Willins, D.L., A.Y. Deutch, and B.L. Roth (1997) Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. *Synapse* 27: 79-82.
- Wright, D.E., K.B. Seroogy, K.H. Lundgren, B.M. Davis, and L. Jennes (1995) Comparative localization of serotonin 1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 351:357-373.
- Wu, C., E.J. Yoder, J. Shih, K. Chen, P. Dias, L. Shi, X-D. Ji, J. Wei, J.M. Conner, S. Kumar, M.H. Ellisman, and S.K. Singh (1998) Development and characterization of monoclonal antibodies specific to the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *J. Histochem. Cytochem.* 46:811-824.

Yates, M., A. Leake, J.M. Candy, A.F. Fairbairn, I.G. McKeith, and I.N. Ferrier (1990) 5-HT<sub>2</sub> receptor changes in major depression. *Biol. Psychiatry* 27:489-496.

**Table 1**  
**SOMATODENDRITIC 5-HT<sub>2A</sub> RECEPTOR**  
**IMMUNOREACTIVITY**  
**IN THE CNS OF ADULT RAT**

	<b>somata</b>	<b>dendrites</b>
<i>Cerebral cortex</i>		
Neocortex ( <b>Fr</b> , <b>Par</b> , <b>Te</b> , <b>Oc</b> )		
Layer I	-	++ (2)
Layers II-III	++ (2)	+++ (3)
Layer IV	-	+++ (2)
Layer V	+++ (3)	+++ (3)
Layer VI	++ (1)	++ (2)
Cingular cortex ( <b>Cg</b> and <b>RS</b> )	+++ (2)	+++ (3)
Perirhinal ( <b>PRh</b> ) and insular ( <b>Ins</b> ) cortex	++ (2)	+++ (3)
Clastrum ( <b>Cl</b> ) *	+ (1)	++ (2)
<i>Olfactory system</i>		
Main olfactory bulb		
Glomerular layer (Gl)	+ (1)	+ (1)
External plexiform layer (EPl)	+++ (1)	+++ (3)
Mitral cell layer (Mi)	+++ (2)	+++ (2)
Internal plexiform layer (IPl)	-	+ (2)
Internal granular layer (IGr)	+ (1)	+ (1)
Accessory olfactory bulb (AOB)	+ (1)	++ (2)
Anterior olfactory nucleus ( <b>AO</b> )	+ (2)	+++ (2)
Olfactory tubercle ( <b>Tu</b> )	++ (3)	++ (3)
Islands of Calleja ( <b>ICj</b> ) *	+++ (3)	+++ (3)

Piriform cortex ( <b>Pir</b> )	++ (3)	+++ (3)
Endopiriform nucleus ( <b>En</b> ) *	+ (2)	++ (2)
<u>Septum</u>		
Lateral septal nucleus ( <b>LS</b> ) *	+ (1)	+ (2)
Medial septal nucleus ( <b>MS</b> )	++ (2)	+++ (2)
Nucleus of the diagonal band of Broca		
Vertical limb ( <b>VDB</b> )	++ (2)	++ (2)
Horizontal limb ( <b>HDB</b> )	+++ (2)	+++ (2)
Triangular septal nucleus ( <b>TS</b> )	-	++ (1)
<u>Hippocampal formation</u>		
Hippocampal rudiments		
Tenia tecta ( <b>TT</b> )	+++ (3)	+++ (3)
Indusium griseum ( <b>IG</b> ) *	+++ (3)	+++ (3)
Ammon's horn ( <b>CA1- CA3</b> )		
Oriens layer ( <b>Or</b> )	++ (1)	++ (1)
Pyramidal cell layer ( <b>Py</b> )	+ (3)	+++ (3)
Stratum radiatum ( <b>Rad</b> )	-	+++ (3)
Lacunosum moleculare layer ( <b>LMol</b> )	-	+ (2)
Dentate gyrus ( <b>DG</b> )		
Molecular layer ( <b>Mol</b> )	-	++ (3)
Granular layer ( <b>Gr</b> )	+ (3)	+++ (3)
Polymorph layer ( <b>Po</b> )	++ (2)	++ (2)
Subiculum ( <b>S</b> )	++ (3)	+++ (3)
Pre- ( <b>PrS</b> ) and parasubiculum ( <b>PaS</b> )	+ (1)	+ (1)
Entorhinal cortex ( <b>Ent</b> )	+++ (2)	+++ (3)

Basal ganglia



Nucleus accumbens ( <b>Acb</b> )	++ (2)	++ (2)
Ventral pallidum ( <b>VP</b> ) *	+++ (2)	+++ (2)
Caudate-putamen ( <b>CPu</b> )	++ (2)	++ (2)
Globus pallidus ( <b>GP</b> )	+++ (2)	+++ (2)
Entopeduncular nucleus ( <b>EP</b> )	+++ (2)	+++ (2)
<i><u>Amygdala</u></i>		
Nucleus of lateral olfactory tract (LOT)	++ (2)	++ (2)
Bed nucleus of the stria terminalis (BST)	++ (1)	++ (1)
Bed nucleus of accessory olfactory tract (BAOT)	++ (2)	++ (2)
Cortical amygdaloid nucleus ( <b>Co</b> )	++ (1)	+++ (2)
Central amygdaloid nucleus ( <b>Ce</b> )	++ (2)	++ (2)
Basolateral amygdaloid nucleus ( <b>BL</b> )		
Anterior (BLA)	++ (3)	++ (3)
Posterior (BLP)	++ (3)	++ (3)
Ventral (BLV)	+++ (1)	+++ (1)
Basomedial amygdaloid nucleus ( <b>BM</b> ) *	+ (2)	+ (2)
Lateral amygdaloid nucleus ( <b>La</b> )	+ (2)	+ (2)
Medial amygdaloid nucleus ( <b>Me</b> )	+ (1)	+ (2)
<i><u>Epithalamus, thalamus and subthalamus</u></i>		
Medial habenular nucleus ( <b>MHb</b> ) *	-	+ (1)
Lateral habenular nucleus ( <b>LHb</b> ) *	+ (1)	+ (1)
Reticular thalamic nucleus ( <b>Rt</b> )	++ (1)	+++ (3)
Intralaminar thalamic nuclei		
Parafascicular (PF)	+ (2)	++ (3)
Midline thalamic nuclei		
Reuniens ( <b>Re</b> )	+ (1)	+ (1)
Anterior thalamic nuclei		

Anterodorsal (AD)	+ (2)	++ (3)
Anteroventral (AV)	+ (2)	++ (2)
Anteromedial (AM)	++ (2)	++ (2)
Mediodorsal ( <b>MD</b> )	+++ (2)	+++ (2)
Paratenial (PT)	++ (2)	+++ (2)
<b>Lateral thalamic nuclei</b>		
Ventrolateral ( <b>VL</b> )	++ (3)	++ (3)
Ventromedial ( <b>VM</b> )	+ (2)	+ (2)
Gelatinosus ( <b>G</b> )	++ (3)	++ (3)
Ventral posterolateral ( <b>VPL</b> )	+++ (3)	+++ (3)
Ventral posteromedial ( <b>VPM</b> )	+++ (3)	+++ (3)
Laterodorsal ( <b>LD</b> )	+ (2)	+ (2)
Lateral posterior (LP)	++ (2)	++ (2)
<b>Posterior thalamic nuclei</b>		
Dorsal lateral geniculate ( <b>DLG</b> )	+++ (2)	+++ (2)
Medial geniculate ( <b>MG</b> )	+++ (3)	+++ (3)
Ventral lateral geniculate ( <b>VLG</b> )	-	++ (2)
Substantia innominata ( <b>SI</b> ) *	++ (2)	++ (2)
Zona incerta ( <b>ZI</b> )	++ (2)	++ (2)
Subthalamic nucleus (STh)	+++ (2)	+++ (2)
<b><u>Hypothalamus</u></b>		
Paraventricular (Pa)	+ (1)	++ (2)
Medial preoptic nucleus (MPO)	+ (1)	++ (2)
Parastrial nucleus (PS)	++ (1)	+++ (3)
Anterior hypothalamic area (AH)	+ (1)	+ (1)
Ventromedial hypothalamic nucleus ( <b>VMH</b> )	-	+++ (2)
Medial mammillary nucleus ( <b>MM</b> )	++ (2)	++ (2)

Lateral mammillary nucleus ( <b>LM</b> ) *	+ (1)	+ (1)
Supramammillary nucleus ( <b>SuM</b> ) *	++ (2)	++ (2)
Submammillothalamic nucleus ( <b>SMT</b> )	+ (1)	++ (1)
Lateral preoptic area ( <b>LPO</b> )	+ (1)	+ (1)
Magnocellular preoptic nucleus ( <b>MCPO</b> )	+++ (2)	+++ (2)
Lateral hypothalamic area ( <b>LH</b> )	++ (1)	++ (2)
Magnocell. n. of lat. hypothalamus ( <b>MCLH</b> )	+++ (1)	+++ (1)

### Cerebellum

Deep cerebellar nuclei ( <b>Lat, IntA, Med</b> )	+++ (3)	+++ (3)
Cerebellar cortex		
Molecular layer ( <b>MOL</b> )	-	+++ (3)
Purkinje cell layer ( <b>P</b> )	++ (2)	++ (2)
Granular cell layer ( <b>GrL</b> )	+ (1)	+ (1)

### Brainstem

#### *Mesencephalon*

##### Superior colliculus

Superficial gray ( <b>SuG</b> )	+ (1)	+ (1)
Intermediate gray ( <b>InG</b> )	+ (1)	++ (2)
Deep gray ( <b>DpG</b> )	+++ (2)	+++ (2)
Inferior colliculus ( <b>IC</b> )	++ (2)	++ (2)
Oculomotor nucleus ( <b>3</b> )	+++ (3)	+++ (3)
Trochlear nucleus ( <b>4</b> )	+++ (2)	+++ (2)
Nucleus of Darkschewitsch ( <b>Dk</b> )	++ (3)	++ (3)
Interstitial nucleus of the mlf ( <b>IMLF</b> ) *	++ (2)	++ (2)
Magnocell. n. of post. commissure ( <b>MCPC</b> )	++ (2)	++ (2)
Anterior pretectal nucleus ( <b>APT</b> )	++ (2)	+++ (3)
Deep mesencephalic nucleus ( <b>DpMe</b> )	++ (2)	++ (2)

Central gray ( <b>CG</b> )	+ (1)	+ (1)
Mesencephalic trigeminal nucleus ( <b>Me5</b> )	+++ (3)	+++ (3)
Red nucleus ( <b>R</b> )	+++ (3)	+++ (3)
Dorsal raphe nucleus ( <b>DR</b> )	-	+ (1)
Median raphe nucleus ( <b>MnR</b> )	++ (1)	++ (1)
Substantia nigra, reticular part ( <b>SNR</b> )	++ (2)	++ (2)
Substantia nigra, compact part ( <b>SNC</b> ) *	+ (1)	++ (2)
Substantia nigra, lateral part ( <b>SNL</b> )	+ (2)	++ (2)
Ventral tegmental area of Tsai ( <b>VTA</b> ) *	+ (1)	+ (1)
Interpeduncular nucleus ( <b>IP</b> )		
Central nuclei ( <b>IPC</b> + <b>IPR</b> ) *	-	++ (2)
Lateral nuclei ( <b>IPL</b> ) *	-	+++ (3)
<i>Pons</i>		
Dorsal tegmental nucleus ( <b>DTg</b> )	++ (2)	++ (3)
Laterodorsal tegmental nucleus ( <b>LDTg</b> )	++ (2)	++ (3)
Ventral tegmental nucleus (Gudden) ( <b>VTg</b> )	+++ (2)	+++ (2)
Locus coeruleus ( <b>LC</b> )	-	+ (1)
Motor trigeminal nucleus ( <b>Mo5</b> )	+++ (3)	+++ (3)
Principal sensory trigeminal nucleus ( <b>Pr5</b> )	++ (1)	++ (2)
Pontine reticular nucleus ( <b>PnR</b> )	++ (2)	++ (2)
Pontine nuclei ( <b>Pn</b> )	++ (1)	++ (1)
Abducens nucleus (6)	+++ (3)	+++ (3)
<i>Medulla oblongata</i>		
Superior vestibular nucleus ( <b>SuVe</b> ) *	+++ (2)	+++ (2)
Lateral vestibular nucleus ( <b>LVe</b> )	+++ (2)	+++ (2)
Medial vestibular nucleus ( <b>MVe</b> )	++ (2)	++ (3)
Spinal vestibular nucleus ( <b>SpVe</b> )	++ (2)	++ (2)

Ventral cochlear nucleus ( <b>VC</b> )	++ (1)	++ (1)
Dorsal cochlear nucleus ( <b>DC</b> )	++ (1)	++ (1)
Spinal trigeminal nucleus ( <b>Sp5</b> )	++ (2)	+++ (2)
Facial nucleus ( <b>7</b> )	+++ (3)	+++ (3)
Ambiguous nucleus ( <b>Amb</b> )	+++ (3)	+++ (3)
Lateral superior olive ( <b>LSO</b> )	++ (2)	++ (2)
Gigantocellular reticular field ( <b>Gi</b> )	+++ (2)	+++ (2)
Intermediate reticular field ( <b>IRt</b> ) *	+++ (2)	+++ (2)
Parvocellular reticular field ( <b>PCRt</b> )	+++ (2)	+++ (2)
Lateral reticular nucleus ( <b>Lrt</b> )	+++ (2)	+++ (2)
Inferior olive ( <b>IO</b> )	+ (1)	+ (1)
Nucleus of the solitary tract ( <b>Sol</b> )	+ (1)	++ (2)
Dorsal motor nucleus of vagus ( <b>10</b> )	++ (2)	+++ (2)
Prepositus hypoglossal nucleus ( <b>PrH</b> )	++ (1)	++ (2)
Hypoglossal nucleus ( <b>12</b> )	+++ (3)	+++ (3)
Gracilis nucleus ( <b>Gr</b> )	++ (2)	++ (2)
Cuneate nucleus ( <b>Cu</b> )	++ (2)	++ (2)
<i><u>Spinal cord</u></i>		
Layers <b>I-III</b> *	-	+ (1)
Layers <b>IV-VIII</b> *	+ (1)	++ (2)
Layer <b>IX</b>	++ (3)	+++ (3)
Layer <b>X</b> *	+ (1)	+ (1)
Intermediolateral nucleus ( <b>IML</b> ) *	+ (1)	++ (2)

---

Only anatomical structures displaying 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity are mentioned. The intensity of immunostaining is graded as weak (+), moderate (++) or strong (+++), and the number of immunoreactive somata and/or dendrites as low (1), intermediate (2)

or high (3). Structures visible in the figures are abbreviated in bold characters, and designated by an asterisk if present but not identified in these pictures. For abbreviations, see list.

**Table 2****FIBER TRACTS CONTAINING 5-HT<sub>2A</sub> IMMUNOREACTIVE AXONS**

---

lateral olfactory tract (**lo**)  
anterior commissure (**ac**)  
corpus callosum (**cc**)  
cingulum (**cg**) \*  
external capsule (**ec**) \*  
optic chiasm (**ox**)  
medial forebrain bundle (**mfb**) \*  
internal capsule (**ic**)  
stria terminalis (**st**)  
fornix (**f**)  
optic tract (**opt**) \*  
alveus hippocampus (**alv**) \*  
fimbria hippocampus (**fi**)  
fasciculus retroflexus (**fr**)  
medial lemniscus (**ml**)  
superior thalamic radiation (**str**) \*  
cerebral peduncle, basal (**cp**) \*  
mammillary peduncle (**mp**) \*  
posterior commissure (**pc**)  
oculomotor nerve (3n)  
superior cerebellar peduncle (**scp**) \*  
medial longitudinal fasciculus (**mlf**)  
trochlear nerve (4n)

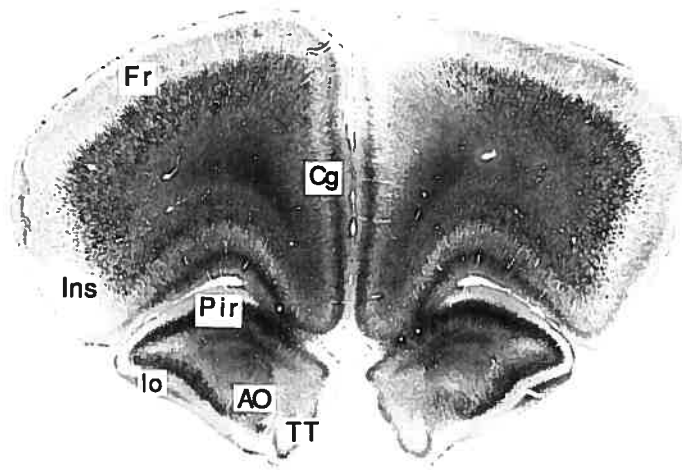
tectospinal tract (ts) \*  
mesencephalic trigeminal tract (me5)  
rubrospinal tract (**rs**) \*  
sensory root trigeminal nerve (s5)  
motor root trigeminal nerve (m5)  
middle cerebellar peduncle (mcp)  
lateral lemniscus (ll)  
ventral spinocerebellar tract (vsc)  
trapezoid body (**tz**) \*  
abducens nerve (6n)  
genu of facial nerve (**g7**)  
facial nerve (7n)  
spinal trigeminal tract (**sp5**)  
inferior cerebellar peduncle (**icp**)  
pyramidal tract (**py**)  
vestibulocochlear nerve (8n)  
solitary tract (sol)  
glossopharyngeal nerve (9n)  
hypoglossal nerve (12n)  
gracile fasciculus (**gr**)  
cuneate fasciculus (**cu**)  
dorsal corticospinal tract (**dcs**)  
lateral funiculus spinal cord (**lfu**)  
ventral funiculus spinal cord (**vfu**)

---

Only major tracts are mentioned. Same conventions as in Table 1 to designate structures visible in Figs. 1-6 and 20. For abbreviations see list.

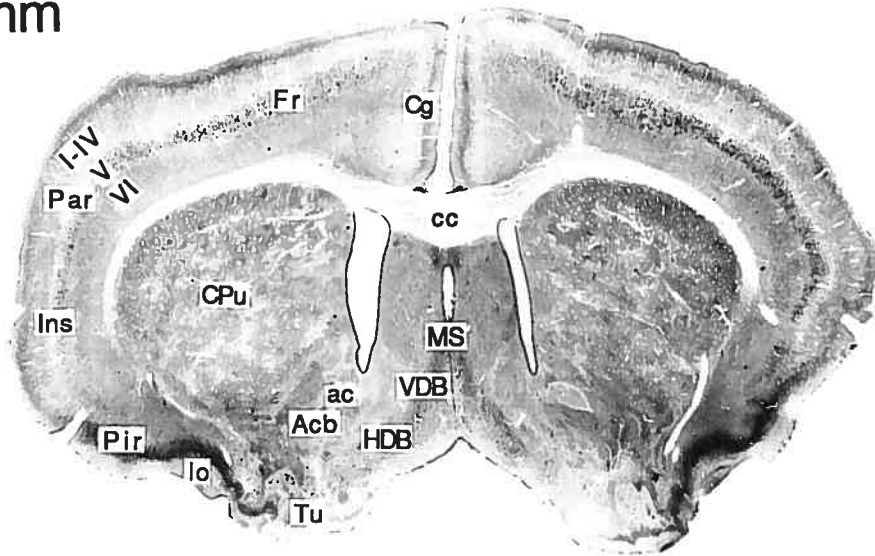


A-12.5 mm



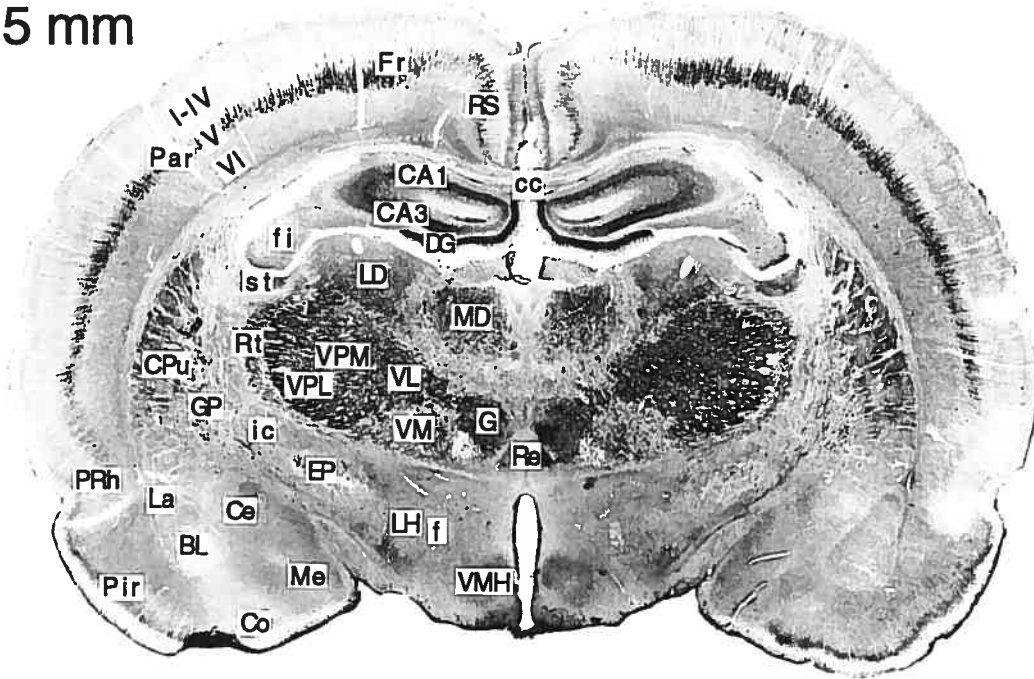
1

A-9.5 mm



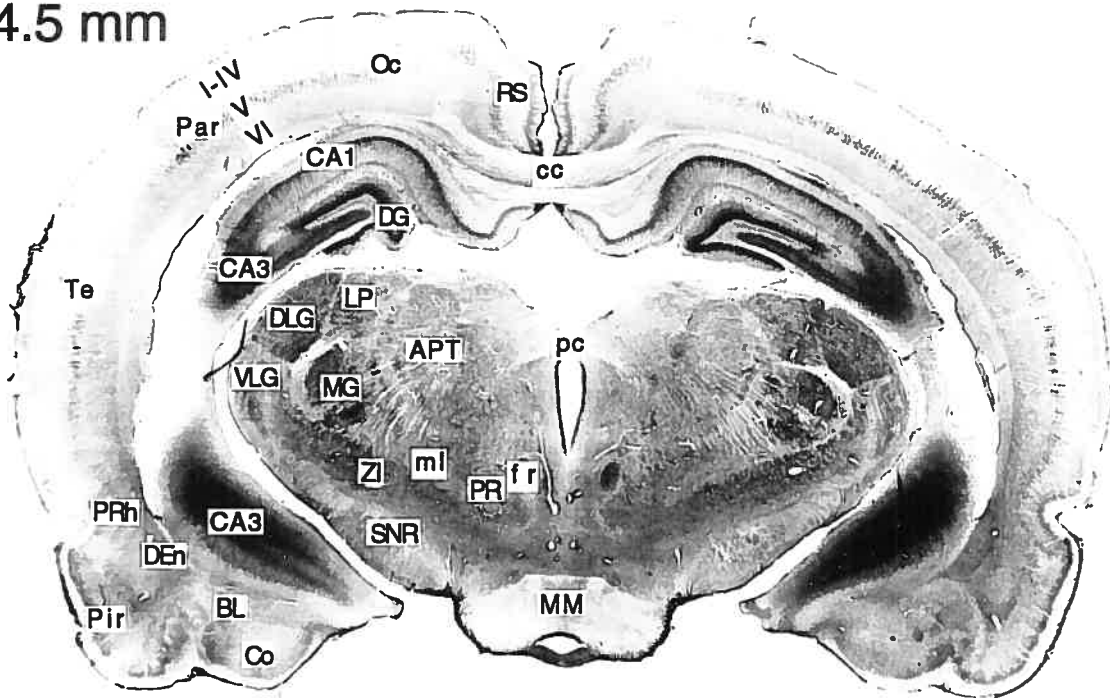
2

A-6.5 mm



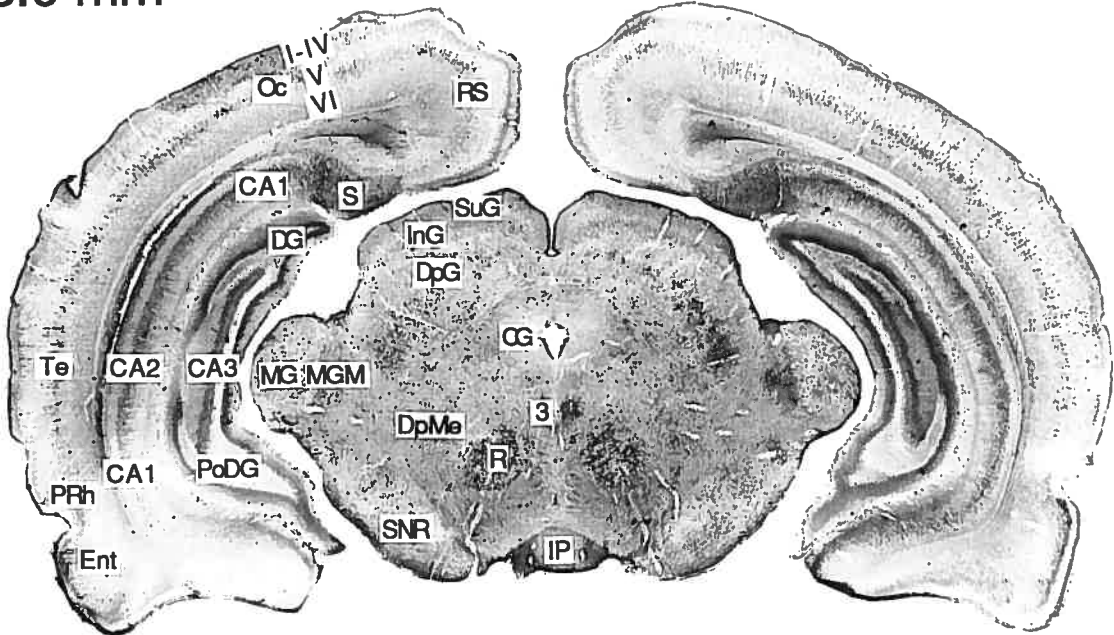
3

A-4.5 mm



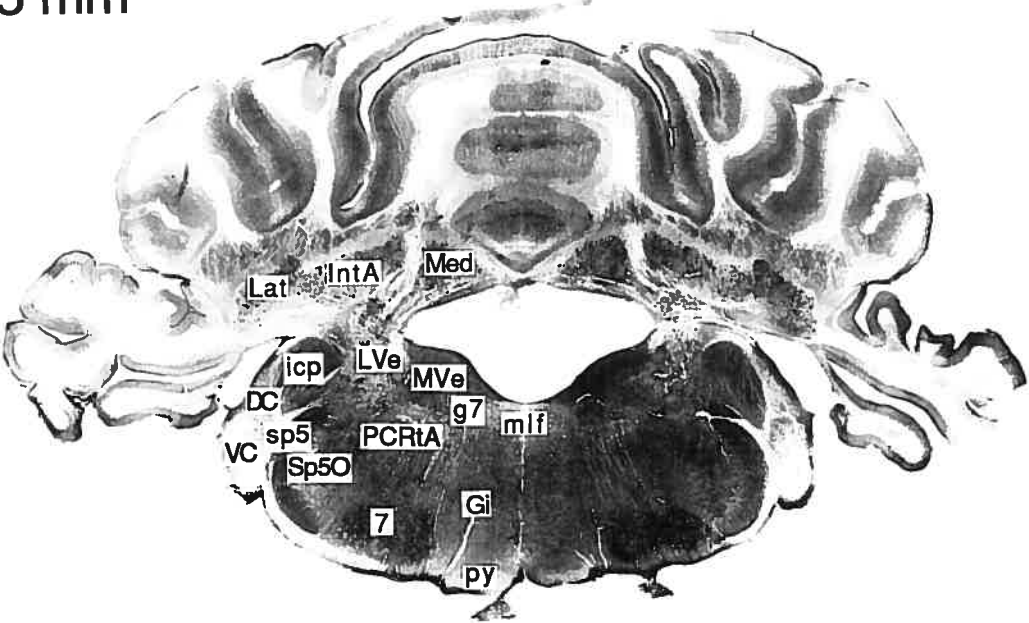
4

A-3.0 mm



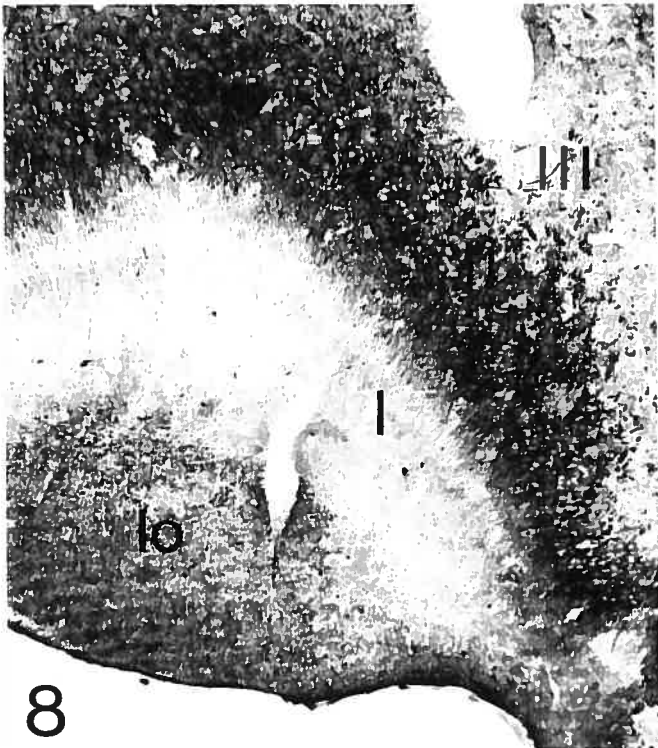
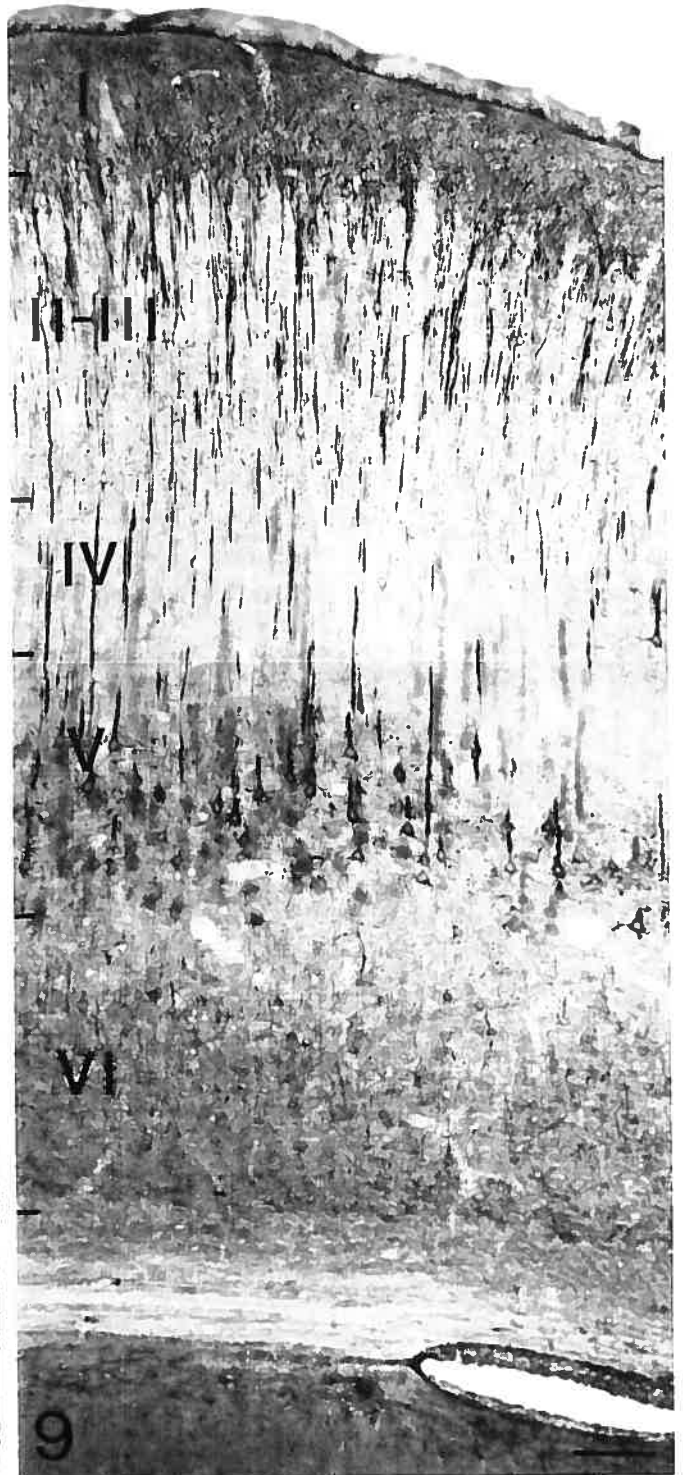
5

P-1.5 mm

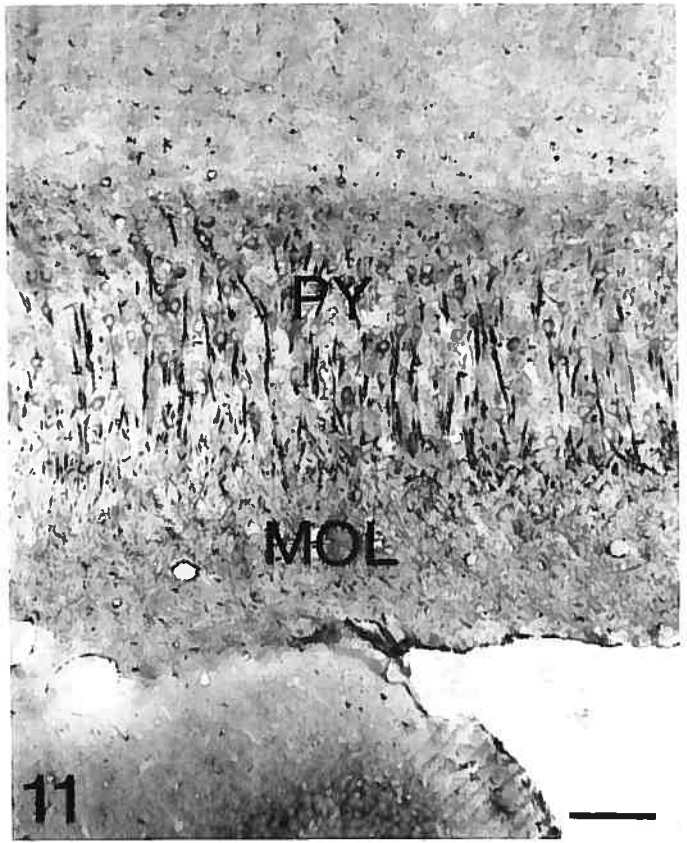
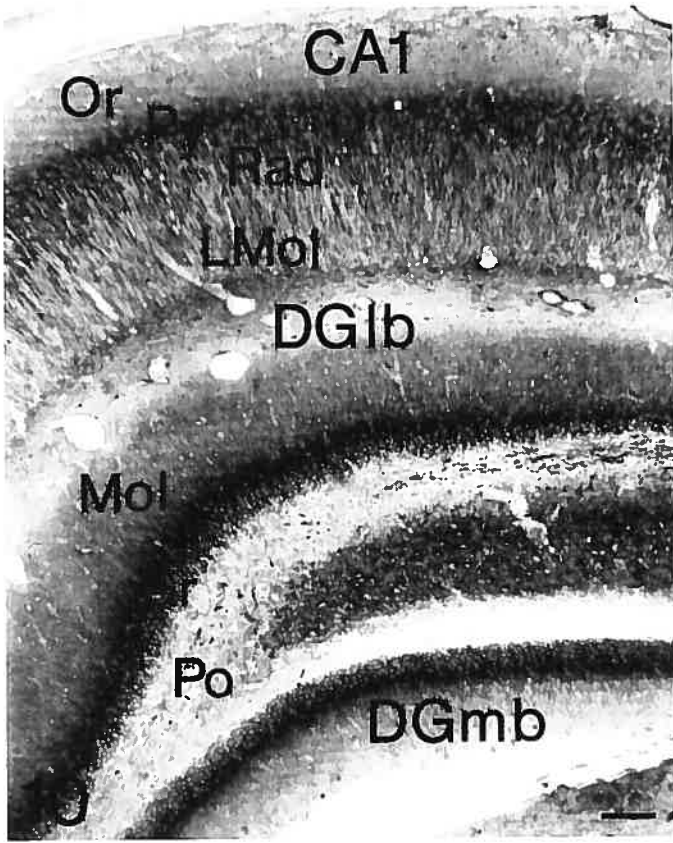


6

**Figs. 1-6 Anatomical distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity (immunoperoxidase-labeled) in a rostrocaudal series of six transverse sections across adult rat brain.** In these macrophotographs the anatomical distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity (immunoperoxidase-labeled) is illustrated in a rostrocaudal series of transverse sections across adult rat brain. The location of each figure is given as the distance (mm) anterior (A-) or posterior (P-) to the interaural line, according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (1986). Major structures displaying somatodendritic and/or axonal immunoreactivity are designated by their abbreviation (see Abbreviations list). See Tables 1 and 2 for other nuclei and fiber tracts displaying 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity and visible or not in these pictures. X 9.3.



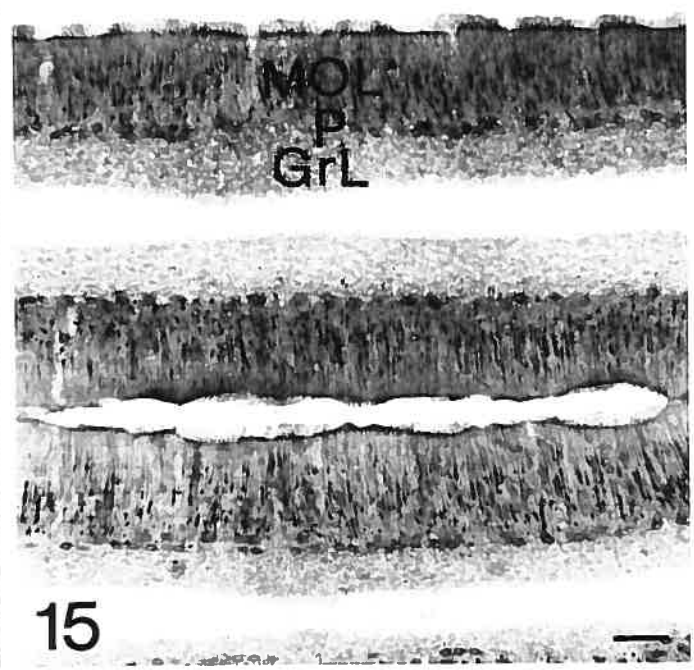
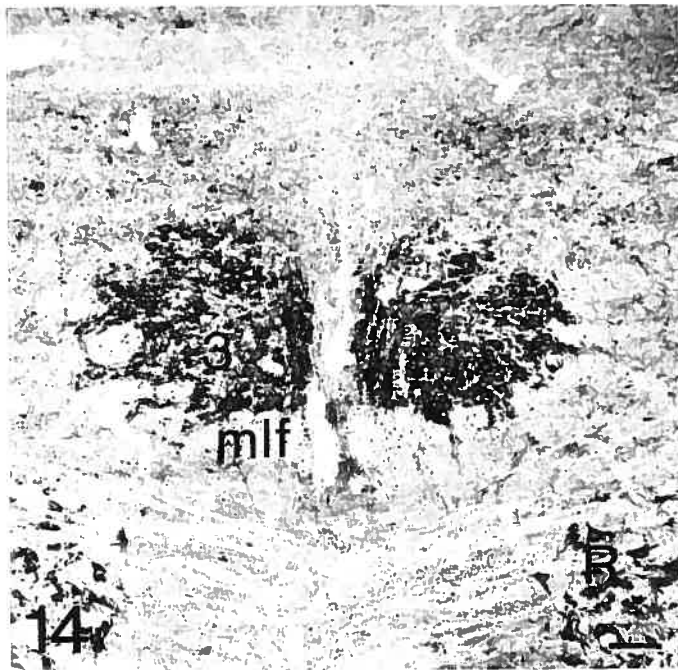
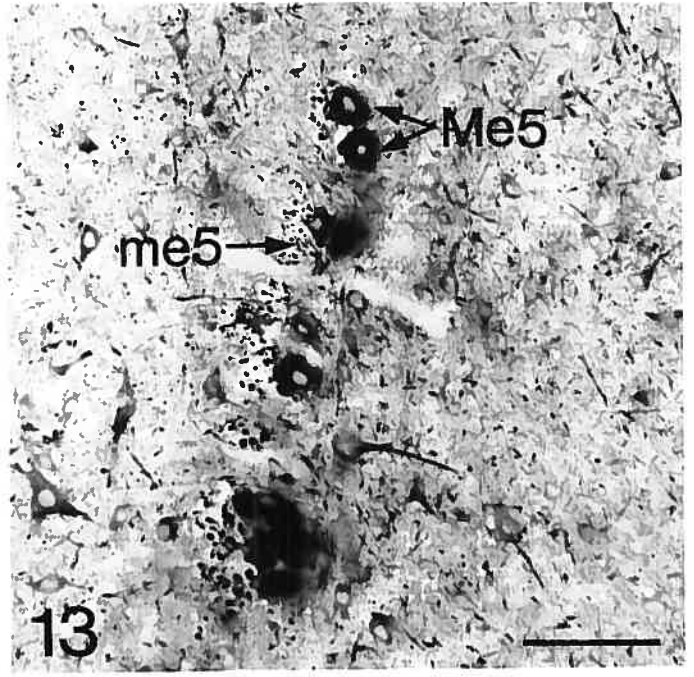
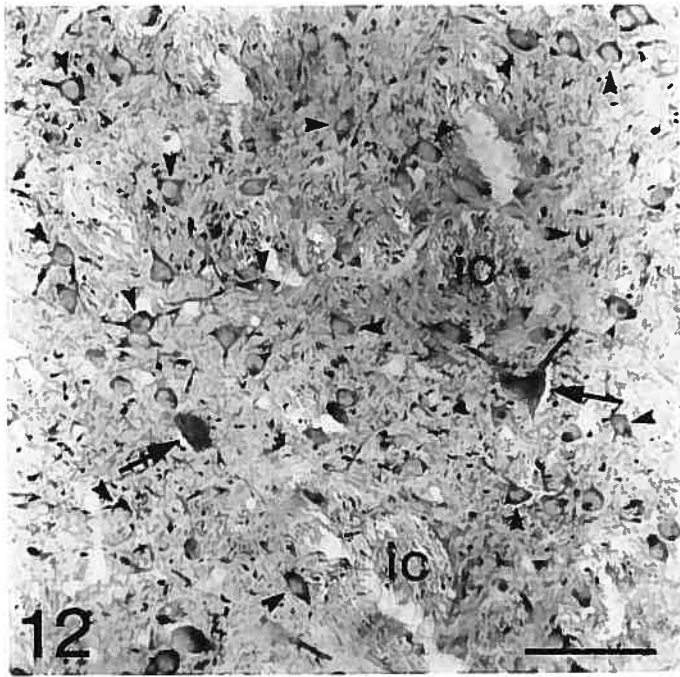
**Figs. 7-9 Cellular distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in three regions of cerebral cortex: anterior cingulate (Fig. 7), piriform (Fig. 8) and parietal (Fig. 9).** In anterior cingulate cortex (Fig. 7), note the strong immunostaining of the large multipolar neurons in layer V and of their long apical dendrites which reach across the upper layers to ramify into layers II and I. In the piriform cortex (Fig. 8), most neurons in the polymorph (III) and pyramidal (II) layers are strongly immunostained and their apical dendrites spread into the plexiform layer (I) overlying the lateral olfactory tract (lo). Within the lo, innumerable minute dots represent as many cross-sectioned immunostained axons (see Fig. 24). In the parietal cortex (Fig. 9), large pyramidal neurons of layer V and their apical dendrites show strong 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity; the appearance of these dendritic branches is smooth even though they are known to bear spines (also see Fig. 16). Numerous smaller and less intensely labeled nerve cell bodies and their proximal dendrites are also visible in layer VI and in the upper layers II and III, but very few in the granular layer IV traversed by the climbing dendrites of layer V neurons. Also note the dense pattern of arborization in upper layer II and layer I, representing the distal dendritic branches of underlying immunoreactive neurons. X 110. Scale bar: 100  $\mu$ m.



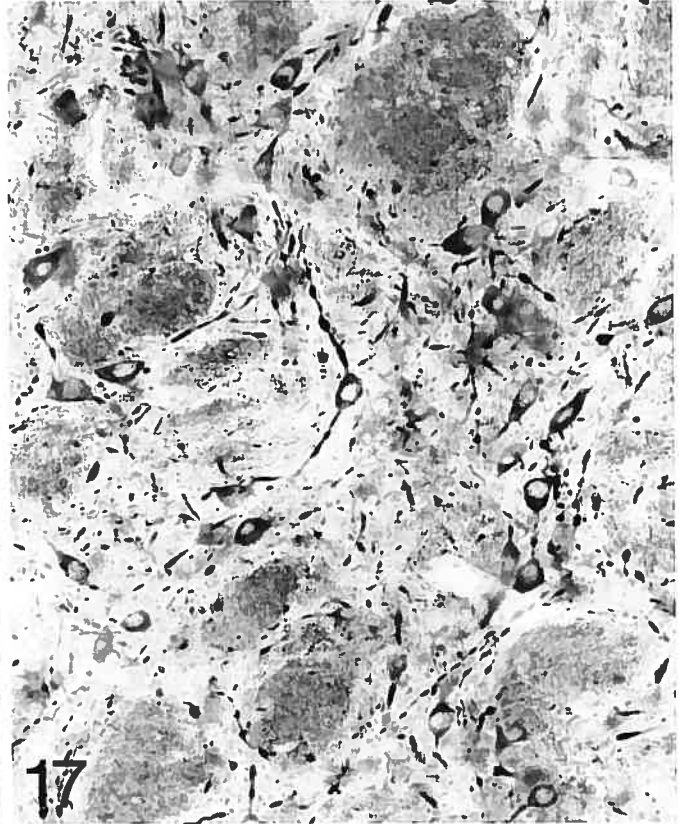
**Figs. 10 and 11 Somatodendritic 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in the hippocampus (Fig. 10) and the subiculum (Fig. 11).**

This sector of dorsal hippocampus (Fig. 10) comprises parts of the lateral (DGlb) and medial (DGmb) blades of dentate gyrus, surrounding a dorsalmost extension of CA3 and, above the hippocampal fissure, part of CA1. Strong 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity is visible in the granule cells of the DG (granular layer, Gr) and the pyramidal cells (pyramidal layer, Py) of CA3 and CA1. Less intensely labeled neurons are also scattered in the polymorph layer of the DG (PoDG) and in the stratum oriens of CA1 (Or). The dendrites of the granule cells account for the immunostaining in the molecular layer of DG (Mol), whereas that of the pyramidal cell dendrites extends across the entire stratum radiatum (Rad) of CA1. Note the lack of punctate staining in the stratum lacunosum moleculare (LMol) as might have been expected from dendritic spines. In the subiculum (Fig. 11), numerous pyramidal neurons and their proximal dendrites exhibit immunostaining in the loosely packed pyramidal layer (PY), and appear to branch profusely in the superficial molecular layer (MOL). X 70 (Fig. 10) and X 110 (Fig. 11). Scale bars: 100  $\mu$ m.



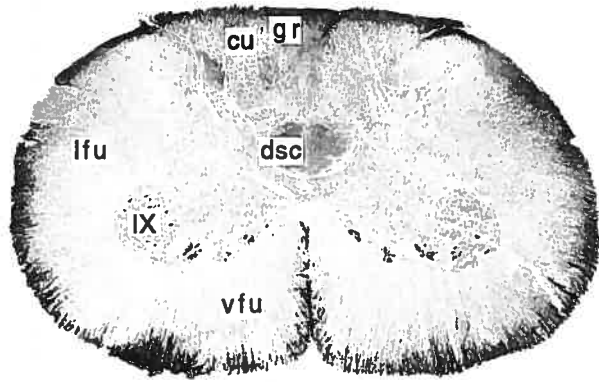


**Figs. 12-15 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity in neostriatum (Fig.12), mesencephalic nucleus of V (Fig. 13), oculomotor nucleus (Fig.14) and cerebellar cortex (Fig. 15).** In neostriatum (Fig. 12; see also Fig. 2), the majority of medium-sized projection neurons display somatodendritic immunostaining (e.g.,-small arrowheads), as well as many of the much less frequent, larger interneurons (arrows). Immunostained axons are visible in the fascicles of the internal capsule (e.g., ic). In the mesencephalic trigeminal nucleus (Fig. 13), the large ganglionic cell bodies (e.g.-Me5) and their axons forming the adjacent tractus (e.g. me5) exhibit strong 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity. The cytoplasmic distribution of the immunostaining is obvious in these large perikarya. Also note the immunopositivity of many soma/dendrites in the adjacent periaqueductal gray (right) and reticular formation (left). The motoneurons in the oculomotor nucleus (3 ; Fig. 14), as all other motoneurons in the brainstem or spinal cord, appear strongly immunostained. Note the equally strong somatodendritic 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity of the large neurons in the underlying red nucleus (R; see also Fig. 18), and the axonal labeling in the medial longitudinal fasciculus (mlf). In cerebellar cortex (Fig. 15; see also Figs. 6 and 19), the immunostaining involves most somata in the Purkinje cell layer (P) and their apical dendrites in the molecular layer (MOL). Occasional large neurons in the granular layer (GrL) also display weak immunostaining. X 180 (Figs. 12 and 13) and X 70 (Figs. 14 and 15). Scale bars: 100  $\mu$ m.

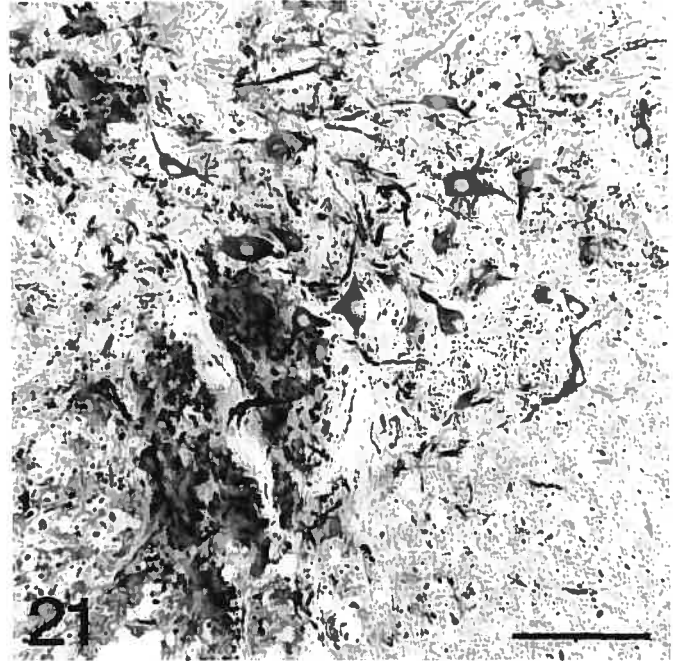


**Figs. 16-19 Higher magnifications of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> immunostaining in cerebral cortex (Fig. 16), globus pallidus (Fig. 17), red nucleus (Fig. 18) and cerebellar cortex (Fig. 19).**

In all these regions, strong somatodendritic immunoreactivity involves the entire perikaryon of immunoreactive cells. Note the smooth appearance of the dendrites of layer V pyramidal neurons in the frontal cortex (Fig. 16) or Purkinje cells in the cerebellar cortex (Fig. 19). In globus pallidus (Fig. 17), the varicose appearance of the immunostained dendrites is highly characteristic. In the red nucleus (Fig. 18) as well as globus pallidus, dot-like axonal labeling is visible in all myelinated axon fascicles traversing these regions. X-280. Scale bar: 100 $\mu$ m (in Fig. 19).

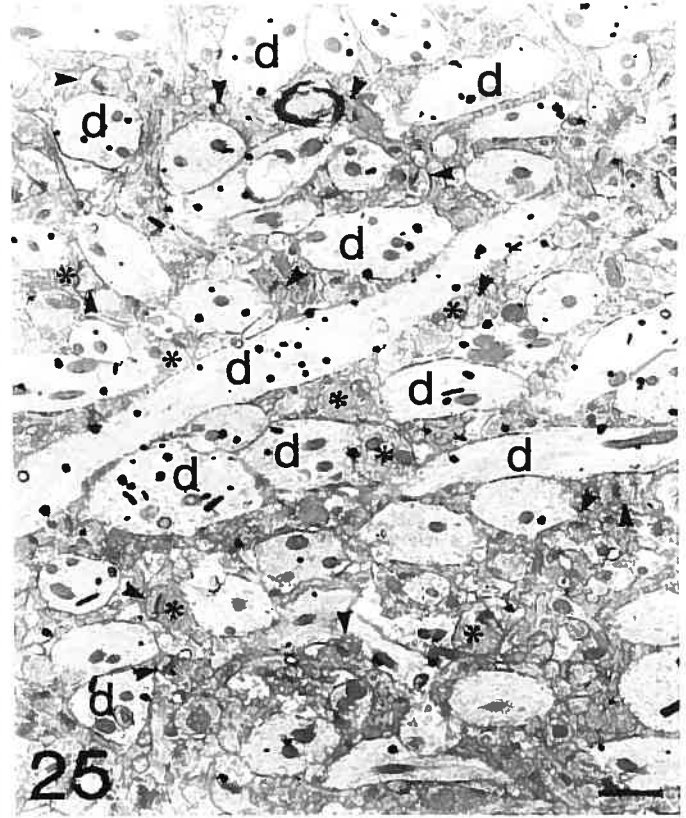
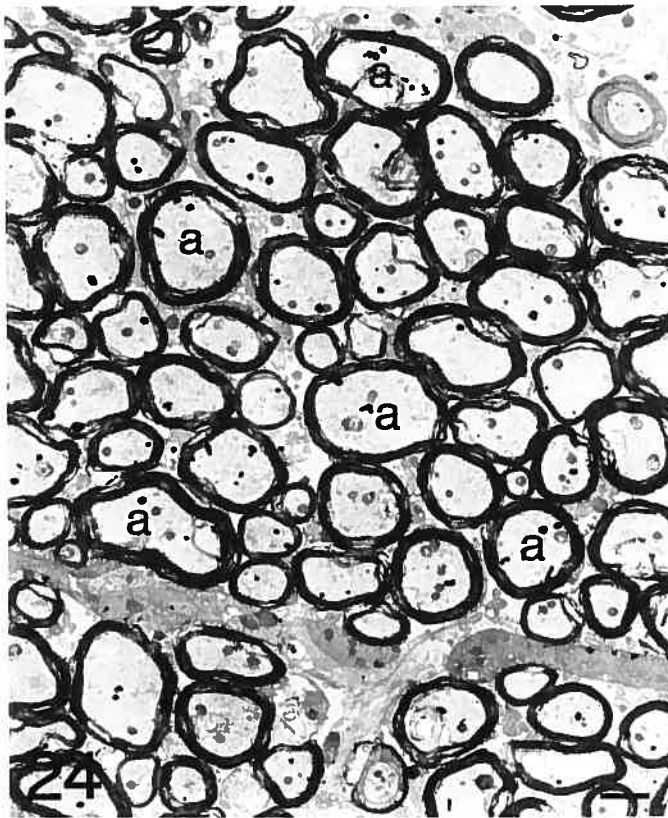
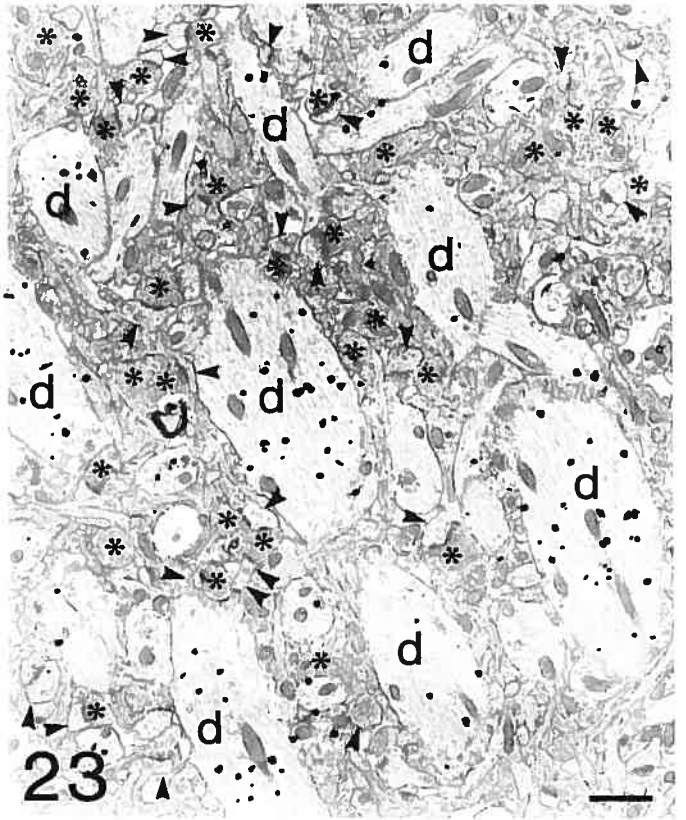


20



21

**Figs. 20 and 21** Macrophotograph of the whole cervical spinal cord (Fig. 20), and higher power view of the 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity of the anterior horn (Fig. 21). In addition to the somatodendritic immunoreactivity of lamina IX motoneurons, there is prominent axonal labeling in the dorsal corticospinal tract (dsc), fasciculus gracilis (gr) and cuneatus (cu), and ventral (vfu) and lateral (lfu) fasciculi (Fig. 20, X 20; scale bar = 1mm). Such labeled axons are also visible in Fig. 21 (X 180; scale bar: 100  $\mu$ m).



**Figs. 22-25. Electron micrographs illustrating the subcellular localization of immunogold-labeled 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the cerebral cortex (Figs. 22 and 23), lateral olfactory tract (Fig. 24) and molecular layer of the piriform cortex (Fig. 25).** In layer V of the parietal cortex, (Fig. 22), a neuronal cell body (N in nucleus) and nearby dendrites (e.g., d) are selectively labeled. Within the cell body, the immunogold particles appear distributed throughout the cytoplasm but spare the mitochondria (e.g., m) and show no predilection for the rough endoplasmic reticulum (er) or the Golgi apparatus (Go). Few particles are located in or near the plasma membrane as opposed to the cytoplasm. In upper cortical layers (Fig. 23), the labeling is exclusively dendritic (e.g., d). Again, most immunogold particles are found within immunoreactive dendrites and few on their membrane. Dendritic spines (arrowheads) as well as axon terminals (asterisks) are immunonegative. In the lateral olfactory tract (Fig. 24), numerous myelinated axons (e.g., a) show axoplasmic immunolabeling. Few immunogold particles are located on or near the axolemma and none are seen over myelin sheaths. In the molecular layer of piriform cortex (Fig. 25), there is no immunolabeling of dendritic spines (e.g.,-arrowheads) or axon terminals (e.g., asterisks) in spite of the relatively strong immunoreactivity in dendritic processes (d). X-7-000 (Fig. 22); X 8 000 (Figs. 23 and 25) and X 6 000 (Fig. 24). Scale bars: 1  $\mu$ m.



**List of abbreviations**

3	oculomotor nucleus
3n	oculomotor nerve
4	trochlear nucleus
4n	trochlear nerve
6	abducens nucleus
6n	abducens nerve
7	facial nucleus
7n	facial nerve
8n	vestibulocochlear nerve
9n	glossopharyngeal nerve
10	dorsal motor nucleus of vagus
12	hypoglossal nucleus
12n	hypoglossal nerve
ac	anterior commissure
Acb	nucleus accumbens
AD	anterodorsal thalamic nucleus
AH	anterior hypothalamic area
alv	alveus hippocampus
AM	anteromedial thalamic nucleus
Amb	ambiguous nucleus
AO	anterior olfactory nucleus
AOB	accessory olfactory bulb
APT	anterior pretectal nucleus
AV	anteroventral thalamic nucleus
BAOT	bed nucleus of accessory olfactory tract
BL	basolateral amygdaloid nucleus

BLA	basolateral amygdaloid nucleus, anterior part
BLP	basolateral amygdaloid nucleus, posterior part
BLV	basolateral amygdaloid nucleus, ventral part
BM	basomedial amygdaloid nucleus
BST	bed nucleus of the stria terminalis
CA1-3	fields CA1-3 of Ammon's horn
cc	corpus callosum
Ce	central amygdaloid nucleus
CG	central gray
Cg	anterior cingulate cortex
cg	cingulum
Cl	claustrum
Co	cortical amygdaloid nucleus
cp	cerebral peduncle, basal
CPu	caudate-putamen
Cu	cuneate nucleus
cu	cuneate fasciculus
DC	dorsal cochlear nucleus
dcs	dorsal corticospinal tract
DEn	dorsal endopiriform nucleus
DG	dentate gyrus
DGl <sub>b</sub>	lateral blade of dentate gyrus
DG <sub>mb</sub>	medial blade of dentate gyrus
Dk	nucleus of Darkschewitsch
DLG	dorsal lateral geniculate nucleus
DpG	deep gray layer of the superior colliculus
DpMe	deep mesencephalic nucleus

DR	dorsal raphe nucleus
DTg	dorsal tegmental nucleus
ec	external capsule
En	endopiriform nucleus
Ent	entorhinal cortex
EP	entopeduncular nucleus
EPI	external plexiform layer
f	fornix
fi	fimbria hippocampus
Fr	frontal cortex
fr	fasciculus retroflexus
G	gelatinosus thalamic nucleus
Gi	gigantocellular reticular field
g7	genu of facial nerve
Gl	glomerular layer
GP	globus pallidus
Gr	gracilis nucleus
gr	gracile fasciculus
GrDG	granular layer of the dentate gyrus
GrL	granular layer of the cerebellar cortex
HDB	nucleus of the horizontal limb of diagonal band of Broca
IC	inferior colliculus
ic	internal capsule
ICj	islands of Calleja
icp	inferior cerebellar peduncle
IG	indusium griseum

IGr	internal granular layer
IML	intermediolateral cell column
IMLF	interstitial nucleus of the mlf
InG	intermediate gray layer of the superior colliculus
Ins	insular cortex
Int	interposed cerebellar nucleus
IO	inferior olive
IP	interpeduncular nucleus
IPC	interpeduncular nucleus, caudal subnucleus
IPL	interpeduncular nucleus, lateral subnucleus
IPl	internal plexiform layer
IPR	interpeduncular nucleus, rostral subnucleus
IRt	intermediate reticular field
La	lateral amygdaloid nucleus
Lat	lateral (dentate) cerebellar nucleus
LC	locus coeruleus
LD	laterodorsal thalamic nucleus
LDTg	laterodorsal tegmental nucleus
lfu	lateral funiculus spinal cord
LH	lateral hypothalamic area
LHb	lateral habenular nucleus
ll	lateral lemniscus
LM	lateral mammillary nucleus
LMol	lacunosum moleculare layer of the hippocampus
lo	lateral olfactory tract
LOT	nucleus of lateral olfactory tract
LP	lateral posterior thalamic nucleus

LPO	lateral preoptic area
LRt	lateral reticular nucleus
LS	lateral septal nucleus
LSO	lateral superior olive
LVe	lateral vestibular nucleus
m5	motor root trigeminal nerve
MCLH	magnocellular nucleus of the lateral hypothalamus
mcp	middle cerebellar peduncle
MCPC	magnocellular nucleus of the posterior commissure
MCPO	magnocellular preoptic nucleus
MD	mediodorsal thalamic nucleus
Mi	mitral cell layer
Me	medial amygdaloid nucleus
Me5	mesencephalic trigeminal nucleus
me5	mesencephalic trigeminal tract
Med	medial (fastigial) cerebellar nucleus
mfb	medial forebrain bundle
MG	medial geniculate nucleus
MGM	medial geniculate nucleus, medial
MHb	medial habenular nucleus
ml	medial lemniscus
mlf	medial longitudinal fasciculus
MM	medial mammillary nucleus
Mo5	motor trigeminal nucleus
MOL	molecular layer of the cerebellar cortex or of the subiculum
Mol	molecular layer of the dentate gyrus

mp	mammillary peduncle
MPO	medial preoptic nucleus
MnR	median raphe nucleus
MS	medial septal nucleus
MVe	medial vestibular nucleus
Oc	occipital cortex
opt	optic tract
Or	oriens layer of the hippocampus
ox	optic chiasm
P	Purkinje cell layer
Pa	paraventricular hypothalamic nucleus
Par	parietal cortex
PaS	parasubiculum
pc	posterior commissure
PCRt	parvocellular reticular field
PF	parafascicular thalamic nucleus
Pir	piriform cortex
PoDG	polymorph layer of the dentate gyrus
Pn	pontine nuclei
PnR	pontine reticular nucleus
Pr5	principal sensory trigeminal nucleus
PRh	perirhinal cortex
PrH	prepositus hypoglossal nucleus
PrS	presubiculum
PS	parastrial nucleus
PT	paratenial thalamic nucleus
Py	pyramidal cell layer of the hippocampus

PY	pyramidal layer of the subiculum
py	pyramidal tract
R	red nucleus
Rad	stratum radiatum of the hippocampus
Re	reuniens
RS	retrosplenial cortex
rs	rubrospinal tract
Rt	reticular thalamic nucleus
S	subiculum
s5	sensory root trigeminal nerve
scp	superior cerebellar peduncle
SI	substantia innominata
SMT	submammillothalamic nucleus
SNC	substantia nigra, compact part
SNL	substantia nigra, lateral part
SNR	substantia nigra, reticular part
Sol	nucleus of the solitary tract
sol	solitary tract
Sp5	spinal trigeminal nucleus
Sp5O	spinal trigeminal nucleus, oralis
sp5	spinal trigeminal tract
SpVe	spinal vestibular nucleus
st	stria terminalis
STh	subthalamic nucleus
str	superior thalamic radiation
SuG	superficial gray layer of the superior colliculus
SuM	supramammillary nucleus

SuVe	superior vestibular nucleus
Te	temporal cortex
TS	triangular septal nucleus
ts	tectospinal tract
TT	tenia tecta
Tu	olfactory tubercle
tz	trapezoid body
VC	ventral cochlear nucleus
VDB	nucleus of the vertical limb of the diagonal band of Broca
vfu	ventral funiculus spinal cord
VL	ventrolateral thalamic nucleus
VLG	ventral lateral geniculate nucleus
VM	ventromedial thalamic nucleus
VMH	ventromedial hypothalamic nucleus
VP	ventral pallidum
VPL	ventral posterolateral thalamic nucleus
VPM	ventral posteromedial thalamic nucleus
vsc	ventral spinocerebellar tract
VTA	ventral tegmental area of Tsai
VTg	ventral tegmental nucleus (Gudden)
ZI	zona incerta



**Chapitre 3 : Distribution ultrastructurale analogue  
du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> de la sérotonine  
et de la protéine MAP1A dans les  
dendrites corticales**

Virginia CORNEA-HÉBERT, Kenneth C. WATKINS, Bryan L. ROTH,  
Wesley K. KROEZE, Pierrette GAUDREAU, Nicole LECLERC and  
Laurent DESCARRIES (2002) *Similar ultrastructural distribution  
of the 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor and microtubule-associated  
protein MAP1A in cortical dendrites of adult rat. Neuroscience  
113 : 23-35.*

**Résumé : Distribution ultrastructurale analogue du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> de la sérotonine et de la protéine associée aux microtubules MAP1A dans les dendrites corticales.**

Telle que visualisée par immunocytochimie en microscopie photonique et électronique, la distribution du récepteur neuronal 5-HT<sub>2A</sub> de la sérotonine apparaît principalement intracellulaire dans toutes les régions du système nerveux central du rat adulte. Cette localisation est particulièrement frappante dans les cellules pyramidales du cortex cérébral, dont les dendrites sont fortement immunoréactives, mais sans marquage de leurs épines. En vue de résultats biomoléculaires et biochimiques récents suggérant une association des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> à la protéine des microtubules MAP1A, nous avons comparé les distributions subcellulaires respectives du récepteur et de cette protéine dans les dendrites du cortex fronto-pariétal du rat adulte. Après marquage à l'or en pré-enrobage avec trois anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> différents, le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> a été retrouvé en plus forte densité dans les petites que dans les grandes dendrites et strictement réparti en fonction de la surface respective de deux compartiments, l'un représentant la membrane plasmique, l'autre intracytoplasmique. Le marquage à l'or de la protéine MAP1A s'est également avéré plus intense dans les petites dendrites, comparativement aux grandes, mais en proportion légèrement plus faible dans le compartiment membranaire par rapport au compartiment intracytoplasmique. Par suite de double marquage

immunocytochimique, nous avons pu observer la co-localisation du récepteur et de la protéine cytosquelettique dans les mêmes dendrites.

Ces données confirment la localisation intracellulaire prédominante du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les corps cellulaires et dendrites neuronales du cortex cérébral, révèlent son existence en plus forte concentration dans les portions distales que proximales des dendrites, et suggèrent son association au cytosquelette dans les neurones du cortex cérébral *in vivo*.

Une telle distribution du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> renforce notre hypothèse voulant que ce récepteur participe à un processus de signalisation intra-neuronale impliquant le cytosquelette. Elle soulève aussi la possibilité que l'activation de ce processus par la sérotonine dépende elle-même de celle d'un autre récepteur sérotoninergique, co-localisé aux mêmes neurones mais situé sur la membrane plasmique.

**SIMILAR ULTRASTRUCTURAL DISTRIBUTION OF THE 5-HT<sub>2A</sub>  
SEROTONIN RECEPTOR AND MICROTUBULE-ASSOCIATED  
PROTEIN MAP1A IN CORTICAL DENDRITES OF ADULT RAT**

Virginia CORNEA-HÉBERT <sup>1</sup>, Kenneth C. WATKINS <sup>1</sup>, Bryan L. ROTH <sup>2</sup>,  
Wesley K. KROEZE <sup>2</sup>, Pierrette GAUDREAU <sup>3</sup>, Nicole LECLERC <sup>1</sup> and  
Laurent DESCARRIES <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Départements de pathologie et biologie cellulaire et de physiologie, and  
Centre de recherche en sciences neurologiques, Faculté de médecine,  
Université de Montréal, Montreal, Québec, Canada; <sup>2</sup> Departments of  
Biochemistry, Psychiatry and Neurosciences, Case Western Reserve  
University, Cleveland, Ohio 44106; <sup>3</sup> Laboratoire de neuroendocrinologie  
du vieillissement, Centre de recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame,  
Montreal, Québec, Canada

Abbreviated title: **Co-localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptor and MAP1A**

**KEYWORDS:** immunoreactivity, subcellular distribution, cytoskeleton

This work was supported by a studentship from the Groupe de recherche  
sur le système nerveux central (FCAR) to V.C.-H., Grant MT-3544 from  
the Medical Research Council of Canada (now NRF 3544 from CIHR) to  
L.D., and Grants RO1MH 61887 and KO2MH 01366 from NIH to B.L.R.

### **Abbreviations**

5-HT, 5-hydroxytryptamine; 5-HT<sub>2A</sub>, serotonin-2A receptor; ANOVA, analysis of variance; BSA, bovine serum albumin; DAB,-3,3'-diaminobenzidine; MAP1A, microtubule associated protein 1A; NGS, normal goat serum; TBS, Tris-buffered saline.

**Abstract** - As visualized by light and electron microscopic immunocytochemistry, the distribution of the neuronal serotonin-2A (5-HT<sub>2A</sub>) receptor is mainly intracellular throughout adult rat brain. This localization is particularly striking in the pyramidal cells of cerebral cortex, the dendrites of which are intensely immunoreactive, but without any labeling of their spines. In view of recent yeast two-hybrid and biochemical results suggesting an association of 5-HT<sub>2A</sub> receptors with the cytoskeletal microtubule-associated protein MAP1A, the respective subcellular distributions of the receptors and of MAP1A were compared by quantitative electron microscopic immunocytochemistry in dendrites of adult rat fronto-parietal cortex. Counts of silver-intensified immunogold particles revealed a higher density of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in smaller rather than larger dendrites, and an apportionment between pre-defined compartments representing the plasma membrane and the cytoplasm that was proportional to the relative surface area of these compartments. MAP1A immunoreactivity also predominated in smaller versus larger dendrites, but with a slightly lower proportion of labeling in the plasma membrane versus cytoplasmic compartment. The colocalization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors and MAP1A protein in the same dendrites could be demonstrated in double immunolabeling experiments. These results confirmed the predominantly somato-dendritic, intracellular localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in cerebral cortex, showed their higher concentration in distal as opposed to proximal dendrites, and suggested their potential association to the cytoskeleton in cortical neurons *in vivo*.

Such a distribution of 5-HT<sub>2A</sub> receptors reinforces our earlier hypothesis that 5-HT<sub>2A</sub> receptors participate in intraneuronal signaling processes involving the cytoskeleton, and raises the possibility that their activation could be dependent upon that of another co-localized, plasma membrane-bound, 5-HT receptor.

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 2A (5-HT<sub>2A</sub>) receptors are widely distributed in the CNS (e.g., Pazos et al., 1985; Pompeiano et al., 1994; Cornea-Hébert et al., 1999a). Their neuronal localization is of particular interest in the cerebral cortex (Willins et al., 1997; Jakab and Goldman-Rakic, 1998), where they constitute a major target for hallucinogens (Aghajanian and Marek, 1999, 2000; Nelson et al., 1999), some antidepressants (Roth et al., 1998a) and atypical antipsychotics (Fatemi et al., 1996; Meltzer, 1999). In a previous immunocytochemical study at light and electron microscopic levels, we described the cellular and subcellular distribution of these receptors throughout adult rat CNS, including the cerebral cortex (Cornea-Hébert et al., 1999a). It was then demonstrated that 5-HT<sub>2A</sub> receptors are located in the somata, dendrites and axons of cortical neurons, being mostly intracellular as opposed to plasma membrane-bound, and absent from dendritic spines or axon terminals.

The mode of action of 5-HT<sub>2A</sub> receptors has received considerable attention in view of the relatively low affinity of these receptors for their endogenous ligand (Peroutka and Snyder, 1979; Almaula et al., 1996), their ability to mediate changes in expression of numerous genes (Rydelek-Fitzgerald et al., 1993; Tilakaratne and Friedman, 1996; Guillet-Deniau et al., 1997; Vaidya et al., 1997; Goppelt-Struebe and Stroebel, 1998; Mijster et al., 1998; Pei et al., 2000), and their unique regulatory properties in response to agonists and antagonists (Roth et al., 1998a,b; Bhatnagar et al., 2001). The third intracellular (i3) loop of these seven trans-membrane domain receptors has been demonstrated to interact



with G- $\alpha$ q (Oksenberg et al., 1995) and arrestins (Gelber et al., 1999). Additionally, an initial yeast two-hybrid study of a human cDNA library, using the i3 loop as bait, has identified many additional interacting proteins, including several that are associated with the cytoskeleton (Kroeze et al., 1999). Further preliminary two-hybrid results have indicated that this interaction involves the light chain 2 domain of the microtubule-associated protein MAP1A (Kroeze and Roth, 2000), while parallel western blotting experiments have revealed the presence of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in microtubule extracts from homogenates of young mice or adult rat brain (Cornea-Hébert et al., 2000).

In this context, we have pursued the investigation of the subcellular distribution of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in dendrites of adult rat neocortex, using a quantitative electron microscopic approach after pre-embedding immunogold labeling with three distinct primary antibodies directed against distinct portions of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor sequence. Moreover, in order to compare the subcellular distribution of the receptors and of MAP1A, a similar analysis was carried out after labeling with an antibody against the MAP1A protein, as well as double immunolabeling experiments. Some of these results have been reported in abstract form (Cornea-Hébert et al., 1999b, 2000).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### 5-HT<sub>2A</sub> and MAP1A antibodies

Three 5-HT<sub>2A</sub> receptor antibodies were used. (1) A monoclonal antibody commercially available at Pharmingen (San Diego, CA, USA). This antibody was produced and characterized by Wu et al. (1998), using a GST fusion protein antigen containing the entire N-terminal domain (1-76) of the cloned human 5-HT<sub>2A</sub> receptor sequence. The targeted epitope is the sequence comprised between residues 64 and 76 (TCLSILHLQEKNW; C. Wu, personal communication). (2) A polyclonal antibody directed against a peptide corresponding to the predicted sequence 22-41 (GDGPRLYHNDNFNSRDANTSE) in the N-terminal domain of the cloned rat 5-HT<sub>2A</sub> receptor. This antibody was produced using keyhole limpet hemocyanin as a carrier protein. Its specificity has been demonstrated in cell lines transfected with 5-HT<sub>2A</sub> receptors (Roth et al., 1995; Berry et al., 1996). (3) A polyclonal antibody raised against the sequence 433-444 (ENCTDNIETVNF) in the C-terminal portion of the cloned rat 5-HT<sub>2A</sub> receptor. This antibody was produced by adsorption of the synthetic peptide onto methylated bovine serum albumin (BSA) as a carrier protein, according to Benoit et al., 1990. It was characterized by immunoblotting in rat brain preparations (Cornea-Hébert et al., unpublished) and yielded similar light microscopic immunocytochemical results in brain tissue fixed with 4% paraformaldehyde or 1.75% glutaraldehyde or with a mixture of 0.01 periodate, 0.075 M lysine and 2% paraformaldehyde in phosphate buffered saline, or else with a mixture of

1% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in cacodylate buffer. No labeling was then observed when primary antibody was omitted, and only background when the antiserum was preincubated with the homologous peptide or when using the pre-immune rabbit serum.

The MAP1A monoclonal antibody was from Chemicon (Temecula, CA, USA). It was prepared using a third-cycle microtubules MAP fraction as antigen, and characterized by its low electrophoretic migration rate (Huber and Matus, 1984).

### **Immunocytochemistry**

These experiments abided by the policies and guidelines of the Canadian Council on Animal Care and regulations of the Animal Care Committee at the Université de Montréal. All efforts were made to minimize animal suffering and number. Seven adult rats (Sprague-Dawley males,  $250 \pm 50$  g) were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (Somnotol: 65 mg/kg, i.p.) and perfused through the aortic arch with either 1.75% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer ( $n = 1$ ), or 1% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer ( $n = 6$ ). After postfixation of the brain in the same fixative at 4°C overnight, transverse 50- $\mu$ m-thick vibratome sections were cut from the region between the transverse planes A 9.2 mm and A 10.0 mm interaural in the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (1986). Free floating sections were treated for 30 min with 0.5% sodium borohydride in Tris-buffered saline (TBS) to saturate free aldehyde bonds, washed in TBS, and preincubated in blocking buffer (10 % normal goat serum (NGS),

1% BSA and 0.1% sodium azide in TBS), for 2 h at room temperature. After washes in TBS, incubation with one of the primary 5-HT<sub>2A</sub> antibodies was as follows: monoclonal N-terminal 5-HT<sub>2A</sub> antibody, diluted 1:300 in incubation buffer (2% NGS, 1% BSA and 0.1% sodium azide in TBS); polyclonal N-terminal 5-HT<sub>2A</sub> antibody, diluted 1:1000 in incubation buffer, or polyclonal C-terminal 5-HT<sub>2A</sub> antibody, diluted 1:1000 in incubation buffer, for 48 h at 4°C. Monoclonal MAP1A antibody was diluted 1:1000 in incubation buffer, for 24 h at 4°C.

For single immunoperoxidase labeling (light microscopy), the sections were further incubated with biotinylated horse anti-mouse IgGs (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluted 1:200 in incubation buffer, or with biotinylated goat anti-rabbit IgGs (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), diluted 1:1000 in incubation buffer, for 2 h at room temperature. This was followed by incubation in avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector), and the labeling was revealed with a 0.05% solution of 3,3'-diaminobenzidine (DAB) in TBS to which 0.005% hydrogen peroxide was added (2-3 min).

For single immunogold labeling (electron microscopy), secondary antibodies consisted of goat anti-mouse or anti-rabbit IgGs conjugated to 1-nm colloidal gold particles (AuroProbe™One, Amersham, Arlington Heights, IL, USA), diluted 1:50 in TBS containing 0.4% gelatin, for 2 h. This was followed by silver enhancement (IntenSE™, Amersham) for 7-13 min at room temperature. In this protocol, all rinses were in TBS, except before and after silver enhancement when citrate buffer 0.2 M

(pH 7.4) was used. Further processing of sections for electron microscopy was as previously described (Cornea-Hébert et al., 1999a).

For the double immunolabeling of 5-HT<sub>2A</sub> receptor and MAP1A protein (electron microscopy), immunoperoxidase-DAB labeling of 5-HT<sub>2A</sub> receptor with the polyclonal N-terminal 5-HT<sub>2A</sub> receptor antibody was followed by immunogold labeling of the MAP1A protein using the available monoclonal antibody. In this protocol, 0.05% Triton X-100 was added to the blocking buffer and incubation buffer, the incubation of the polyclonal N-terminal 5-HT<sub>2A</sub> antibody lasted 72 h, the MAP1A antibody was diluted 1:2000, and the duration of the DAB reaction and silver enhancement was restricted to a minimum (2 and 7 min, respectively). Controls consisted of omitting one or the other primary antibodies, or both.

### **Electron microscopic analysis**

The material subjected to electron microscopic examination was either singly immunostained with one of the 5-HT<sub>2A</sub> antibodies (monoclonal N-terminal, two rats; polyclonal N-terminal, four rats; polyclonal C-terminal, one rat) and the MAP1A antibody (three rats), or doubly immunostained with the polyclonal N-terminal 5-HT<sub>2A</sub> and the monoclonal MAP1A antibody (two rats). Thin sections were obtained from the upper (I-IV) and the lower layers (V-VI) of primary frontal and parietal cortex (forelimb area) after single 5-HT<sub>2A</sub> labeling, or from their middle layers (II/III and IV) after single MAP1A or double 5-HT<sub>2A</sub> and MAP1A labeling. More than 1300 pictures of singly (1254) or doubly

(120) immunolabeled cortical dendrites were taken at original magnifications from X 3 900 to X 11 500.

To quantify the subcellular distribution of 5-HT<sub>2A</sub> receptors or MAP1A protein in dendrites, counts of the silver-intensified immunogold particles were obtained from 932 of the above electron micrographs (nine rats > 100 per rat), printed at a uniform final magnification of X 17 000, from material singly labeled with the monoclonal (two rats) and the polyclonal (four rats) N-terminal 5-HT<sub>2A</sub> antibodies, or with the monoclonal MAP1A antibody (three rats). A total of 2314 transversely or longitudinally sectioned dendrites were analyzed, which were considered immunoreactive if they bore more than three silver-intensified gold grains per section profile. The number of grains was visually counted in two compartments: a plasma membrane compartment, defined as a narrow zone, 60-nm thick (average diameter of the silver-intensified particles in these experiments) underneath the plasma membrane, and a cytoplasmic compartment comprising the residual internal zone. The diameter and perimeter of the labeled profiles were measured with the aid of a computerized image analysis system (NIH Image 1.60), and the results were expressed as labeling density (number of particles per unit of surface) and relative number of grains or relative surface area (% of total) in each compartment. The data were compiled separately for small (< 1  $\mu\text{m}$  in diameter; n = 703) and large ( $\geq$  1  $\mu\text{m}$ ; n = 1297) dendrites from the upper (I-IV) and lower (V-VI) cortical layers and compared by a one-way analysis of variance (ANOVA) conducted with Microsoft Excel

98 software for Macintosh. A *P* value less than 0.05 was considered significant.

## RESULTS

### **Subcellular distribution of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in cortical dendrites**

At the light microscopic level, the regional distribution of the immunoreactivity after labeling with every one of the three 5-HT<sub>2A</sub> receptor antibodies was the same as previously described in detail following immunostaining with the monoclonal N-terminal antibody (Cornea-Hébert et al., 1999a). In the frontoparietal cortex, a laminar pattern was observed. In layer V strong labeling of pyramidal neuronal somata and of their apical dendrites, spanning across the upper layers and branching profusely in layer I was observed (Fig. 1A). These dendrites have smooth contours underlying a lack of dendritic spine labeling. In layers II and III numerous smaller neurons and their dendrites were labeled and in layer VI some multipolar neurons exhibiting somatodendritic labeling were also observed.

At the electron microscopic level, identical distribution patterns of the immunogold labeling were found for each of the three 5-HT<sub>2A</sub> receptor antibodies (Figs. 2A-C and 4A). In small or large dendrites from the upper and lower cortical layers, most of the silver-intensified gold particles were located in the cytoplasm, and very few (~ 10%) in the proximity or immediately underneath the plasma membrane (Figs. 2A-C and 4A). Dendritic spines, abundant in the surrounding neuropil and frequently

observed as emerging from labeled dendrites (Fig. 2A, B) were never seen to be labeled (Figs. 2A-C, 3 and 4A). Within dendrites, the immunogold particles were distributed over or between microtubules. There were no vesicular or endosome-like structures around the particles. No particles were seen on mitochondria. Occasional observations of labeled neuronal somata (Fig. 3) after labeling with any one of the three 5-HT<sub>2A</sub> antibodies showed no preferential association of the immunogold particles with rough endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus, mitochondria or lysosomal bodies.

The quantitative data on the subcellular distribution of 5-HT<sub>2A</sub> immunogold labeling in cortical dendrites are summarized in Table 1. Two-by-two comparisons of the results showed no statistically significant differences between data obtained from material processed with the monoclonal N-terminal and the polyclonal N-terminal antibody. These results (not shown) were therefore pooled for presentation. Similar values were obtained after labeling with the C-terminal antibody (not shown), but these data were not included as they were obtained from a single animal. In both upper and lower cortical layers, the total density of 5-HT<sub>2A</sub> labeling in small dendrites was double that in large dendrites ( $P < 0.05$  by ANOVA). In small dendrites, about 20% of the total number of immunogold particles were found in the plasma membrane compartment, and approximately 9% in the large ones. In both groups, these percentages were equivalent to the respective percent surface area of the plasma membrane compartment, i.e. 21% and 10%. Accordingly, the cytoplasmic compartment accounted for 80% of the 5-HT<sub>2A</sub> labeling in



small dendrites (79% of the surface), and 91% in the large ones (90% of the surface). No significant difference was found between dendrites of the same size originating from upper or lower cortical layers.

### **Subcellular distribution of MAP1A protein in cortical dendrites**

The light and electron microscopic distribution of the MAP1A immunoreactivity was similar to that for 5-HT<sub>2A</sub> receptors (Figs. 1A, B and 4A, B), but the number of labeled dendritic profiles and intensity of immunostaining appeared to be greater after MAP1A compared to 5-HT<sub>2A</sub> labeling (Fig. 1A, B). In both smaller and larger dendrites from the upper or lower cortical layers, immunogold particles were found over and between neurotubules, rarely near the plasma membrane, and never on mitochondria or within dendritic spines (Fig. 4B). Again, there was no labeling of axon terminals.

The subcellular distribution of this immunoreactivity is quantified in Table 2. The labeling density was again higher in smaller than larger dendrites ( $P < 0.05$ ) but with a lower ratio (1.3 :1) than for the receptors. The proportion of immunogold particles in the membrane compartment was lower than for 5-HT<sub>2A</sub> receptors (9.0% in small and 3.1% in large dendrites), and significantly lower than the percent surface area measured for that compartment (25.9% and 9.8%, respectively). Again, the ratio percent labeling/percent surface was similar for large and small dendrites.

### **Co-localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors and MAP1A protein in cortical dendrites**

After the double labeling of 5-HT<sub>2A</sub> receptors (immunoperoxidase) and MAP1A protein (immunogold), many cortical dendrites, both small and large, displayed both labels (Fig. 4C). As commonly observed with this diffusible label, the peroxidase immunoprecipitate tended to line neurotubules, the outer membrane of mitochondria and the plasma membrane. The immunogold labeling was as described above. Dendritic spines were unlabeled with either marker.

### **DISCUSSION**

The present immunoelectron microscopic study confirmed the prominent intracellular localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in dendrites of the cerebral cortex. After immunogold labeling with two antibodies against their N-terminal portion, and a third against their C-terminal portion, the apportionment of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in a plasma membrane and an intracellular compartment was equivalent to the relative surface area of these compartments, excluding any significant enrichment of the plasma membrane. The overall density of 5-HT<sub>2A</sub> receptors was higher in smaller than larger dendrites throughout the cortex, but dendritic spines were always free of labeling. MAP1A protein was similarly distributed, but observed in slightly lower proportion in the plasma membrane versus cytoplasmic compartment. Both 5-HT<sub>2A</sub> and MAP1A immunoreactivities could be visualized in the same dendrites after dual labeling.

### **Methodological considerations**

The two antibodies directed against epitopes in the N-terminal portion of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor sequence have been characterized previously (Roth et al., 1995; Berry et al., 1996; Wu et al., 1998). Both have been used extensively for light microscopic immunocytochemistry, and the monoclonal for electron microscopy in rat or monkey brain tissue (Willins et al., 1997, 1998, 1999; Jakab and Goldman-Rakic, 1998, 2000; Wu et al., 1998; Cornea-Hébert et al., 1999a; Rodríguez et al., 1999, 2000; Mäckowiak et al., 1999; Moyer and Kennaway, 1999; Doherty and Pickel, 2000; Xu and Pandey, 2000; Bubser et al., 2001; Jansson et al., 2001). The newly generated C-terminal 5-HT<sub>2A</sub> antibody displayed a similar anatomical and subcellular distribution, in keeping with earlier results of Willins et al. (1997) obtained with a different C-terminal 5-HT<sub>2A</sub> antibody. Such convergent observations with four different antibodies directed against distinct epitopes essentially rule out the remote possibility of an unknown protein, other than 5-HT<sub>2A</sub> receptor, being labeled.

### **5-HT<sub>2A</sub> receptors are enriched in the intracellular compartment of pyramidal neurons**

The quantitative analysis of the immunogold labeling revealed a low proportion of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the plasma membrane of small as well as large dendrites in all cortical layers. The close correspondence between the amount of 5-HT<sub>2A</sub> labeling measured in the plasma membrane compartment and the relative surface area of this compartment in both small and large dendrites suggested a uniform

distribution of the receptors across dendritic sections. Admittedly, the thickness assigned to the plasma membrane compartment for the purpose of this analysis (60 nm) was considerably greater than that of the plasma membrane itself, which is about 8 nm (Peters et al., 1991). Consequently, the percentage of grains in the membrane compartment did not necessarily reflect the true proportion of receptors in the membrane. If all particles in this compartment did represent membrane-bound receptors, the actual concentration in the membrane might in fact be higher. In any event, such a concentration in the plasma membrane compartment would remain relatively low compared with that in the intracellular compartment. Moreover, enrichment of the plasma membrane in receptor-like immunoreactivity has been readily documented by a similar quantitative method in the case of the 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor subtypes (Riad et al., 2000, 2001).

The present results are in agreement with those of earlier immunoelectron microscopic studies (Hamada et al., 1998; Jakab and Goldman-Rakic, 1998, 2000; Rodríguez et al., 1999, 2000; Doherty and Pickel, 2000), which also failed to provide convincing evidence for a predominant plasma membrane localization of neuronal 5-HT<sub>2A</sub> receptors in brain tissue. Localization of 5-HT<sub>2A</sub> immunoreactivity to the plasma membrane was then reported only after labeling with DAB, a diffusible immunoprecipitate known for its tendency to adhere to many types of neuronal membranes (Novikoff et al., 1972; Leranth and Pickel, 1989). In two of these studies in which gold immunolabeling was achieved (Rodríguez et al., 1999, 2000; Doherty and Pickel, 2000), the prominent

intracellular localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors was noted in somata, dendrites or axons from rat motor and limbic striatum and ventral tegmental area. In the present study, however, there were no indications of a preferential association of 5-HT<sub>2A</sub> receptors with membranous intracytoplasmic organelles. In fact, the rarity of immunogold particles over rough endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, multivesicular bodies or endosome-like vesicles in labeled somata was rather suggestive of a localization to other cytoplasmic constituents. Within dendrites, where the immunolabeling was even more intense and fewer organelles are present, the observed distribution was compatible with an association with the cytoskeleton. The limited resolution of the present pre-embedding technique could not discriminate between a direct association with the microtubules themselves or their cross-bridges versus interposed dendroplasm. However, the yeast two-hybrid results suggest that the interaction between 5-HT<sub>2A</sub> receptors and MAP1A may be direct.

**5-HT<sub>2A</sub> receptors are more concentrated in small- than large-caliber dendrites, and absent from dendritic spines**

The present quantitative analysis also revealed a greater density of 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactivity in smaller as compared with larger dendrites, irrespective of their intracortical location, indicating that these receptors are more concentrated in distal than proximal cortical dendrites. This was in striking contrast with the impression gained from light microscopic sections, in which the thick dendritic trunks always appeared more densely immunostained than their thin distal branches.

It is likely that a similar situation prevails in the monkey cortex, where it has been assumed that the proximal segments of apical dendrites of pyramidal cells contained more 5-HT<sub>2A</sub> receptors and thus represented hot spots for 5-HT<sub>2A</sub> receptor function (Jakab and Goldman-Rakic, 1998). Interestingly, in rat brain slices, the frequency of excitatory postsynaptic currents evoked by activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors has been reported to be greater at apical than basilar dendrites of neocortical layer V pyramidal cells (Aghajanian and Marek, 1997; Marek and Aghajanian, 1998, 1999). This has been viewed as evidence that the ability of serotonin to influence layer V pyramidal cells may occur by actions on elements in the superficial cortical layers (see Scruggs et al., 2000). It must also be emphasized that, in addition to the distal dendritic arborization of layer V pyramidal neurons, dendrites from other neuronal types in layers II/III and VI of all cortical areas have been shown to bear 5-HT<sub>2A</sub> receptors, in rat as well as monkey (Cornea-Hébert et al., 1999a; Jakab and Goldman-Rakic, 2000).

In our previous study, we had noted the lower density of 5-HT<sub>2A</sub> labeling in somata when compared with the dendrites of cortical neurons (Cornea-Hébert et al., 1999a). Together with the present results, this suggests that 5-HT<sub>2A</sub> receptors are distributed along an increasing gradient of concentration from the somata to the dendritic extremities of these neurons. This is consistent with the transition from the sparse microtubule content in neuronal somata to their more densely packed arrays in dendrites (Bernhardt and Matus, 1984; Peters et al., 1991).

The lack of 5-HT<sub>2A</sub> receptors within cortical dendritic spines was particularly striking in view of their higher concentration in distal than proximal dendrites. It coincided with the known absence of microtubules and, notably, of MAP1A protein within dendritic spines (Huber and Matus, 1984; Shiomura and Hirokawa, 1987a). This finding has already been interpreted to suggest a mode of functioning having little dependence on synaptic input (Cornea-Hébert et al., 1999a; Jansson et al., 2001), in keeping with the relatively low frequency of synaptic contacts made by cortical 5-HT terminals (Séguéla et al., 1989; Smiley and Goldman-Rakic, 1996). Alternatively, it might be indicative of an indirect rather than a direct mode of activation by 5-HT.

#### **Similar distribution of MAP1A protein and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in cortical dendrites**

This study is the first to demonstrate that, much like 5-HT<sub>2A</sub> receptors, MAP1A is more concentrated in smaller versus larger cortical dendrites in addition to being absent from dendritic spines. This particular distribution and their co-localization in the same dendrites further suggest a possible interaction between 5-HT<sub>2A</sub> receptors and MAP1A protein. The relative amount of other microtubule-associated proteins, such as MAP2 and MAP1B, throughout the dendritic arbor remains to be determined. However, in contrast to 5-HT<sub>2A</sub> receptors (Jakab and Goldman-Rakic 1998; Cornea-Hébert et al., 1999a,b; Rodriguez et al., 1999, 2000; Doherty and Pickel 2000) and MAP1A (Matus et al., 1983; Bloom et al., 1984; Huber and Matus 1984), MAP2 is only found in

dendrites and is absent from axons (Matus et al., 1983; Bernhardt and Matus, 1984; De Camilli et al., 1984). As for MAP1B, which was actually shown to interact with ionotropic GABA<sub>A</sub> receptors in axon terminals of adult rat retina (Hanley et al., 1999; Billups et al., 2000; Pattnaik et al., 2000), it is mainly expressed during development and much less abundant in adult neurons (Müller et al., 1994). Several other proteins, such as PSD-95 (Hunt et al., 1996; Aoki et al., 2001) or  $\alpha 5$ -integrin (Bi et al., 2001), have also been shown to be enriched in cortical dendrites. A possible interaction between 5-HT<sub>2A</sub> receptors and PSD-95 has been suspected because of the existence of a tSXV motif in the receptor sequence, which is proposed to be the binding site for the PDZ domains in the PSD-95 protein (Kornau et al., 1995; Hamada et al., 1998). However, in cerebral cortex, the PSD-95 protein has been shown to be predominantly associated with postsynaptic axo-spinous densities (Aoki et al., 2001), while there are no data on the intradendritic distribution of  $\alpha 5$ -integrin.

Assuming that microtubules are apportioned to the numerous branches of dendrites (Peters et al., 1991), and that MAP1A protein cross-links microtubules to one another or to other cytoskeletal components (Shiomura and Hirokawa, 1987a,b), its slightly higher concentration in smaller dendrites was compatible with its proposed role in the stabilization of mature dendrites (Müller et al., 1994). The smaller MAP1A concentration ratio between larger and smaller dendrites than for 5-HT<sub>2A</sub> receptors could reflect the possible interaction of MAP1A with several other proteins, such as cytoskeletal proteins (Pedrotti et al., 1994)



or a variety of proteins implicated in neuronal signal transduction (Fujii et al., 1996; Brenman et al., 1998). The lower proportion of MAP1A protein compared to 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the plasma membrane compartment of cortical dendrites could be due to a non uniform distribution of microtubules in the immediate vicinity of the plasma membrane. Alternatively, it could reflect the actual lack of MAP1A in the plasma membrane, while it may be assumed that a fraction, albeit small, of 5-HT<sub>2A</sub> receptors is indeed present in this location.

### **Functional implications**

5-HT<sub>2A</sub> receptors do not appear to be mainly targeted to the usual sites of action of neuronal, G protein-coupled receptors, i.e. the plasma membrane of neuronal somata, dendrites, dendritic spines and/or axon terminals. In cortical neurons, they appear to be mostly distributed inside dendritic shafts. As previously suggested, in such a localization, 5-HT<sub>2A</sub> receptors might contribute to intracellular signaling pathways activated by 5-HT (see Cornea-Hébert et al., 1999a), and particularly those in which microtubules also appear to be implicated (reviewed by Gundersen and Cook, 1999). Alternatively, the intracellular pool of 5-HT<sub>2A</sub> receptors could represent receptors which could be mobilized to the plasma membrane following neuronal stimulation. Indeed, preliminary studies utilizing cultured rat cortical pyramidal neurons (Z.-X. Xia S. Hufesein and B.L. Roth, unpublished observations) suggest a dynamic association between intracellular and plasma membrane-localized 5-HT<sub>2A</sub> receptors which can be modulated by neuronal activity.

Interestingly, G- $\alpha_q$  proteins and phospholipase C, which are activated by 5-HT<sub>2A</sub> receptors (Conn and Sanders-Bush, 1984; Roth et al., 1984, 1986; de Chaffoy de Courcelles et al., 1985; Sanders-Bush and Conn, 1986), have been shown to interact with microtubules (Popova et al., 1997). In vascular smooth muscle cells and mesangial cells, 5-HT<sub>2A</sub> receptors have been demonstrated to mediate a 5-HT activation of extracellular signal-related kinase pathways, one of the mitogen-activated protein kinases classically involved in cell growth and which interact with microtubules (Florian and Watts, 1998; Goppelt-Struebe and Stroebel, 1998; Watts 1998; Goppelt-Struebe et al., 1999; Grewal et al., 1999; Greene et al., 2000). Through such mechanisms, 5-HT<sub>2A</sub> receptors could mediate 5-HT effects on neuronal development and dendritic plasticity already known to involve MAP1A, such as the shaping, maintenance and/or stabilization of dendritic architecture (Matus 1988,1990; Oblinger and Kost, 1994; Vaillant and Brown, 1995; Pedrotti et al., 1996; Vaillant et al., 1998). During plasticity events, the dynamic instability of microtubules is increased, which could result in a transitory release of the receptor from the microtubules and its insertion in the plasma membrane.

The question arises as to how intracellular 5-HT<sub>2A</sub> receptors might be activated by 5-HT, at least as heteroreceptors. A possible answer might reside in functional interactions between co-localized 5-HT receptor subtypes, as already evidenced by electrophysiological, *in situ* hybridization and behavioral studies (Backus et al., 1990; Darmani et al., 1990; Araneda and Andrade, 1991; Ashby et al., 1994; Pompeiano et al.,

1994; Burnet et al., 1995; Wright et al., 1995; Willins and Meltzer 1997). 5-HT<sub>2A</sub> receptors could be activated upon internalization of one or another of these co-localized, high affinity, membrane-bound 5-HT receptors, or even by 5-HT internalized together with these receptors. In this context, it is noteworthy that two distinct and temporally shifted effects have already been recorded from pyramidal cells, in slices of rat neocortex exposed to 5-HT: an initial hyperpolarizing response, pharmacologically defined as activated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors, followed by a depolarization due to the activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors (Araneda and Andrade, 1991). In this regard, recent studies have also demonstrated co-localization of intracellular 5-HT<sub>2A</sub> and plasma membrane-bound 5-HT<sub>1A</sub> receptors in individual prefrontal cortical neurons (Martín-Ruiz et al., 2001). Thus, although the precise function of the intracellular 5-HT<sub>2A</sub> receptors is unknown, their close proximity to 5-HT<sub>1A</sub> receptors is in keeping with a dual modulatory role for 5-HT in regulating the activity of cortical pyramidal neurons.

**Acknowledgements.** The authors are indebted to Chun Wu and Sujay K. Singh for their generous gift of the Pharmingen 5-HT<sub>2A</sub> antibody. They also thank Gaston Lambert and Jean Léveillé for expert photographic work.

**REFERENCES**

- Aghajanian, G.K., Marek, G.J., 1997. Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. *Neuropharmacology* 36, 589-599.
- Aghajanian, G.K., Marek, G.J., 1999. Serotonin and hallucinogens. *Neuropsychopharmacology* 21, 16S-23S.
- Aghajanian, G.K., Marek, G.J., 2000. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res. Rev.* 31, 302-312.
- Almoula, N., Ebersole, B.J., Ballesteros, J.A., Weinstein, H., Sealfon, S.C., 1996. Contribution of a helix 5 locus to selectivity of hallucinogenic and nonhallucinogenic ligands for the human 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptors: direct and indirect effects on ligand affinity mediated by the same locus. *Molecular Pharmacology* 50, 34-42.
- Aoki, C., Miko, I., Oviedo, H., Mikeladze-Dvali, T., Alexandre, L., Sweeney, N., Brecht, D.S., 2001. Electron microscopic immunocytochemical detection of PSD-95, PSD-93, SAP-102, and SAP-97 at postsynaptic, presynaptic, and nonsynaptic sites of adult and neonatal rat visual cortex. *Synapse* 40, 239-254.
- Araneda, R., Andrade, R., 1991. 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40, 399-412.

- Ashby, C.R. Jr., Edwards, E., Wang, R.Y., 1994. Electrophysiological evidence for a functional interaction between 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat medial prefrontal cortex: an iontophoretic study. *Synapse* 17, 173-181.
- Backus, L.I., Sharp, T., Grahame-Smith, D.G., 1990. Behavioural evidence for a functional interaction between central 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.* 100, 793-799.
- Benoit, R., Liu, Y., Laveille, S., 1990. The use of bovine serum albumin in the production of antibodies to peptides: application to the tachykinin family. In: Rivier, J.E., Marshall, G.R. (Eds.), *Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Proceedings of the Eleventh American Peptide Symposium*. ESCOM, Leiden, pp. 736-737.
- Bernhardt, R., Matus, A., 1984. Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J. Comp. Neurol.* 226, 203-221.
- Berry, S.A., Shah, M.C., Khan, N., Roth, B.L., 1996. Rapid agonist-induced internalization of the 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor occurs via the endosome pathway in vitro. *Mol. Pharmacol.* 50, 306-313.
- Bhatnagar, A., Willins, D.L., Gray, J.A., Woods, J., Benovic, J.L., Roth, B.L., 2001. The dynamin-dependent, arrestin-independent internalization of 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT<sub>2A</sub>) serotonin receptors reveals differential sorting of arrestins and 5-HT<sub>2A</sub> receptors during endocytosis. *J. Biol. Chem.* 276, 8269-8277.

- Bi, X., Lynch, G., Zhou, J., Gall, C.M., 2001. Polarized distribution of  $\alpha 5$  integrin in dendrites of hippocampal and cortical neurons. *J. Comp. Neurol.* 435, 184-193.
- Billups, D., Hanley, J.G., Orme, M., Attwell, D., Moss, S.J., 2000. GABA<sub>A</sub> receptor sensitivity is modulated by interaction with MAP1B. *J. Neurosci.* 20, 8643-8650.
- Bloom, G.S., Shoenfeld, T.A., Vallee, R.B., 1984. Widespread distribution of the major polypeptide component of MAP1 (microtubule-associated protein 1) in the nervous system. *J. Cell Biol.* 98, 320-330.
- Brenman, J.E., Topinka, J.R., Cooper, E.C., McGee, A.W., Rosen, J., Milroy, T., Ralston, H.J., Brecht, D.S., 1998. Localization of postsynaptic density-93 to dendritic microtubules and interaction with microtubule-associated protein 1A. *J. Neurosci.* 18, 8805-8813.
- Bubser, M., Backstrom, J.R., Sanders-Bush, E., Roth, B.L., Deutch, A.Y., 2001. Distribution of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in afferents of the rat striatum. *Synapse* 39, 297-304.
- Burnet, P.W.J., Eastwood, S.L., Lacey, K., Harrison, P.J., 1995. The distribution of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA in human brain. *Brain Res.* 676, 157-168.
- Conn, P.J., Sanders-Bush, E., 1984. Selective 5HT-2 antagonists inhibit serotonin stimulated phosphatidylinositol metabolism in cerebral cortex. *Neuropharmacology* 23, 993-996.
- Cornea-Hébert, V., Riad, M., Wu, C., Singh, S.K., Descarries, L., 1999a. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub>

- receptor in the central nervous system of adult rat. *J. Comp. Neurol.* 409, 187-209.
- Cornea-Hébert, V., Watkins, K.C., Bélanger, D., Abi Farah, C., Leclerc, N., Descarries, L., 2000. Association of 5-HT<sub>2A</sub> receptor to the microtubule protein MAP1A in cortical dendrites of adult rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* 26, 1428.
- Cornea-Hébert, V., Watkins, K.C., Willins, D.L., Roth, B.L., Descarries, L., 1999b. Intracellular distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor in rat cortical neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25, 1204.
- Darmani, N.A., Martin, B.R., Pandey, U., Glennon, R.A., 1990. Do functional relationships exist between 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36, 901-906.
- De Camilli, P., Miller, P.E., Navone, F., Theurkauf, W.E., Vallee, R.B., 1984. Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience* 11, 819-846.
- de Chaffoy de Courcelles, D., Leysen, J.E., De Clerck, F., Van Belle, H., Janssen, P.A., 1985. Evidence that phospholipid turnover is the signal transducing system coupled to serotonin-S<sub>2</sub> receptor sites. *J. Biol. Chem.* 260, 7603-7608.
- Doherty, M.D., Pickel, V.M., 2000. Ultrastructural localization of the serotonin 2A receptor in dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res.* 864, 176-185.
- Fatemi, H.S., Meltzer, H.I., Roth, B.L., 1996. Atypical antipsychotic drugs: clinical and preclinical studies. *Handb. Exp. Pharmacol.* 120, 77-115.

- Florian, J.A., Watts, S.W., 1998. Integration of mitogen-activated protein kinase kinase activation in vascular 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor signal transduction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 346-355.
- Fujii, T., Watanabe, M., Nakamura, A., 1996. Characterization of microtubule-associated protein 1-associated protein kinases from rat brain. *Neurochem. Int.* 28, 535-544.
- Gelber, E.I., Kroeze, W.K., Willins, D.L., Gray, J.A., Sinar, C.A., Hyde, E.G., Gurevich, V., Benovic, J., Roth, B.L., 1999. Structure and function of the third intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor: the third intracellular loop is  $\alpha$ -helical and binds purified arrestins. *J. Neurochem.* 72, 2206-2214.
- Goppelt-Struebe, M., Hahn, A., Stroebel, M., Reiser, C.O.A., 1999. Independent regulation of cyclo-oxygenase 2 expression by p42/44 mitogen-activated protein kinases and C2+/calmodulin-dependent kinase. *Biochem. J.* 339, 329-334.
- Goppelt-Struebe, M., Stroebel, M., 1998. Signaling pathways mediating induction of the early response genes prostaglandin G/H synthase-2 and egr-1 by serotonin via 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *J. Cell. Physiol.* 175, 341-347.
- Greene, E.L., Houghton, O., Collinsworth, G., Garnovskaya, M.N., Nagai, T., Sajjad, T., Bheemanathini, V., Grewal, J.S., Paul, R.V., Raymond, J.R., 2000. 5-HT<sub>2A</sub> receptors stimulate mitogen-activated protein kinase via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in rat renal mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 278, F650-F658.



- Grewal, J.S., Mukhin, Y.V., Garnovskaya, M.N., Raymond, J.R., Greene, E.L., 1999. Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor induces TGF- $\beta$ 1 expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 276, F922-F930.
- Guillet-Deniau, I., Burnol, A.-F., Girard, J., 1997. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 14825-14829.
- Gundersen, G.G., Cook, T.A., 1999. Microtubules and signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 81-94.
- Hamada, S., Senzaki, K., Hamaguchi-Hamada, K., Tabuchi, K., Yamamoto, H., Yamamoto, T., Yoshikawa, S., Okano, H., Okado, N., 1998. Localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptor in rat cerebral cortex and olfactory system revealed by immunohistochemistry using two antibodies raised in rabbit and chicken. *Mol. Brain Res.* 54, 199-211.
- Hanley, J.G., Koulen, P., Bedford, F., Gordon-Weeks, P.R., Moss S.J., 1999. The protein MAP-1B links GABA<sub>A</sub> receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature* 397, 66-69.
- Huber, G., Matus, A., 1984. Differences in the cellular distributions of two microtubule-associated proteins, MAP1 and MAP2, in rat brain. *J. Neurosci.* 4, 151-160.
- Hunt, C.A., Schenker, L.J., Kennedy, M.B., 1996. PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses. *J. Neurosci.* 16, 1380-1388.
- Jakab, R.L., Goldman-Rakic, P.S., 1998. 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> serotonin receptors in the primate cerebral cortex: Possible site of

- action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 735-740.
- Jakab, R.L., Goldman-Rakic, P.S., 2000. Segregation of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in inhibitory circuits of the primate cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 417, 337-348.
- Jansson, A., Tinner, B., Bancila, M., Vergé, D., Steinbusch, H.W.M., Agnati, L.F., Fuxe, K., 2001. Relationships of 5-hydroxytryptamine immunoreactive terminal-like varicosities to 5-hydroxytryptamine-2A receptor-immunoreactive neuronal processes in the rat forebrain. *J. Chem. Neuroanat.* 22, 185-203.
- Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., Seeburg, P.H., 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737-1740.
- Kroeze, W.K., Willins, D.L., Roth, B.L., 1999. Proteins interacting with the third intracellular loop of human 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptors identified by yeast two-hybrid screening. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25, 1201.
- Kroeze, W.K., Roth, B.L., 2000. Interaction of the third intracellular loop of the human 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor with microtubule-associated protein 1A (MAP-1A). *Soc. Neurosci. Abstr.* 26, 1426.
- Leranth, C., Pickel, V.M., 1989. Electron microscopic preembedding double-immunostaining methods. In: Heimer, L., Záborszky, L. (Eds.), *Neuroanatomical Tract-tracing Methods 2, Recent Progress*. Plenum, New York, pp 129-172.

- Mackowiak, M., Chocyk, A., Fijal, K., Czyrak, A., Wedzony, K., 1999. c-Fos proteins, induced by the serotonin receptor agonist DOI, are not expressed in 5-HT<sub>2A</sub> positive cortical neurons. *Mol. Brain Res.* 71, 358-363.
- Marek, G.J., Aghajanian, G.K., 1998. 5-hydroxytryptamine-induced excitatory postsynaptic currents in neocortical layer V pyramidal cells: suppression by  $\mu$ -opiate receptor activation. *Neuroscience* 86, 485-497.
- Marek, G.J., Aghajanian, G.K., 1999. 5-HT<sub>2A</sub> receptor or  $\alpha$ 1-adrenoceptor activation induces excitatory postsynaptic currents in layer V pyramidal cells of the medial prefrontal cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 367, 197-206.
- Martín-Ruiz, R., Puig, M.V., Celada, P., Shapiro, D.A., Roth, B.L., Mengod, G., Artigas, F., 2001. Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by 5-HT<sub>2A</sub> receptors through a glutamate-dependent mechanism. *J. Neurosci.* 21, 9856-9866.
- Matus, A., 1988. Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Ann. Rev. Neurosci.* 11, 29-44.
- Matus, A., 1990. Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J. Physiol. Paris* 84, 134-137.
- Matus, A., Huber, G., Bernhardt, R., 1983. Neuronal microdifferentiation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 48, 775-782.
- Meltzer, H.Y., 1999. The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* 21, 106S-115S.

- Mijnster, M.J., Galis-de Graaf, Y., Voorn, P., 1998. Serotonergic regulation of neuropeptide and glutamic acid decarboxylase mRNA levels in the rat striatum and globus pallidus: studies with fluoxetine and DOI. *Mol. Brain Res.* 54, 64-73.
- Moyer, R.W., Kennaway, D.J., 1999. Immunohistochemical localization of serotonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* 271, 147-150.
- Müller, R., Kindler, S., Garner, C.C., 1994. The MAP1 family. In: Hyams, J.S., Lloyd, C.W. (Eds.) *Modern Cell Biology, Volume 13, Microtubules.* Wiley-Liss, New York, pp. 141-154..
- Nelson, D.L., Lucaites, V.L., Wainscott, D.B., Glennon, R.A., 1999. Comparisons of hallucinogenic phenylisopropylamine binding affinities at cloned human 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 359, 1-6.
- Novikoff, A.B., Novikoff, P.M., Quintana, N., Davis, C., 1972. Diffusion artifacts in 3,3'-diaminobenzidine cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 20, 745-749.
- Oblinger, M.M., Kost, S.A., 1994. Coordinate regulation of tubulin and microtubule associated protein genes during development of hamster brain. *Dev. Brain Res.* 77, 45-54.
- Oksenberg, D., Havlik, S., Peroutka, S.J., Ashkenazi, A., 1995. The third intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor determines effector coupling specificity. *J. Neurochem.* 64, 1440-1447.

- Pattnaik, B., Jellali, A., Sahel, J., Dreyfus, H., Picaud, S., 2000. GABA<sub>A</sub> receptors are localized with microtubule-associated protein 1B in mammalian cone photoreceptors. *J. Neurosci.* 20, 6789-6796.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic, London.
- Pazos, A., Cortéz, R., Palacios, J.M., 1985. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res.* 346, 231-249.
- Pedrotti, B., Colombo, R., Islam, K., 1994. Microtubule associated protein MAP1A is an actin-binding and crosslinking protein. *Cell Motil. Cytoskeleton* 29, 110-116.
- Pedrotti, B., Francolini, M., Cotelli, F., Islam, K., 1996. Modulation of microtubule shape in vitro by high molecular weight microtubule associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2. *FEBS Lett.* 384, 147-150.
- Pei, Q., Lewis, L., Sprakes, M.E., Jones, E.J., Grahame-Smith, D.G., Zetterström, T.S.C., 2000. Serotonergic regulation of mRNA expression of Arc, an immediate early gene selectively localized at neuronal dendrites. *Neuropharmacology* 39, 463-470.
- Peroutka, S.J., Snyder, S.H., 1979. Multiple serotonin receptors: differential binding of [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine, [<sup>3</sup>H]lysergic acid diethylamide and [<sup>3</sup>H]spiroperidol. *Mol. Pharmacol.* 16, 687-699.
- Peters, A., Palay, S.L., Webster, H. DeF., 1991. *The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and Their Supporting Cells*, 3rd edn. Oxford University, New York.

- Pompeiano, M., Palacios, J.M., Mengod, G., 1994. Distribution of the serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor family mRNAs: comparison between 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Mol. Brain Res.* 23, 163-178.
- Popova, S.J., Garrison, J.C., Rhee, S.G., Rasenick, M.M., 1997. Tubulin, G<sub>q</sub>, and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate interact to regulate phospholipase C $\beta$ 1 signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 6760-6765.
- Riad, M., Garcia, S., Watkins, K.C., Jodoin, N., Doucet, E., Langlois, X., El Mestikawy, S., Hamon, M., Descarries, L., 2000. Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 417, 181-194.
- Riad, M., Watkins, K.C., Doucet, E., Hamon, M., Descarries, L., 2001. Agonist-induced internalization of serotonin-1A receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J. Neurosci.* 21, 8378-8386.
- Rodríguez, J.J., Doherty, M.D., Pickel, V.M., 2000. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the ventral tegmental area: subcellular distribution and colocalization with 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptors. *J. Neurosci. Res.* 60, 202-211.
- Rodríguez, J.J., Garcia, D.R., Pickel, V.M., 1999. Subcellular distribution of 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> and N-methyl-D-aspartate receptors within single neurons in rat motor and limbic striatum. *J. Comp. Neurol.* 413, 219-231.
- Roth, B.L., Berry, S.A., Kroeze, W.K., Willins, D.L., Kristiansen, K., 1998a. Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors: Molecular Biology and Mechanisms of Regulation. *Crit. Rev. Neurobiol.* 12, 319-338.

- Roth, B.L., Nakaki, T., Chuang, D.M., Costa, E., 1984. Aortic recognition sites for serotonin (5-HT) are coupled to phospholipase C and modulate phosphatidylinositol turnover. *Neuropharmacology* 23, 1223-1225.
- Roth, B.L., Nakaki, T., Chuang, D.M., Costa E., 1986. 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptors coupled to phospholipase C in rat aorta: modulation of phosphoinositide turnover by phorbol ester. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238, 480-485.
- Roth, B.L., Palvimaki, E.-P., Berry, S., Khan, N., Sachs, N., Uluer, A., Choudhary, M.S., 1995. 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> (5-HT<sub>2A</sub>) receptor desensitization can occur without down-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 1638-1646.
- Roth, B.L., Willins, D.L., Kristiansen, K., Kroeze, W.K., 1998b. 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub>-family receptors (5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub>, 5-hydroxytryptamine<sub>2B</sub>, 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub>): where structure meets function. *Pharmacol. Ther.* 79, 231-257.
- Rydelek-Fitzgerald, L., Wilcox, B.D., Teitler, M., Jeffrey, J.J., 1993. Serotonin-dependent collagenase induction in rat myometrial smooth muscle cells: mediation by the 5-HT<sub>2</sub> receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 91, 67-74.
- Sanders-Bush, E., Conn, P.J., 1986. Effector systems coupled to serotonin receptors in brain: serotonin stimulated phosphoinositide hydrolysis. *Psychopharmacol. Bull.* 22, 829-836.

- Scruggs, J.L., Patel, S., Bubser, M., Deuch, A.Y., 2000. DOI-induced activation of the cortex: dependence on 5-HT<sub>2A</sub> heteroceptors on thalamocortical glutamatergic neurons. *J. Neurosci.* 20, 8846-8852.
- Séguéla, P., Watkins, K.C., Descarries, L., 1989. Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 289, 129-142.
- Shiomura, Y., Hirokawa, N., 1987a. The molecular structure of microtubule-associated protein 1A (MAP1A) *in vivo* and *in vitro*. An immunoelectron microscopy and quick-freeze, deep-etch study. *J. Neurosci.* 7, 1461-1469.
- Shiomura, Y., Hirokawa, N., 1987b. Colocalization of microtubule-associated protein 1A and microtubule-associated protein 2 on neuronal microtubules *in situ* revealed with double-label immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* 104, 1575-1578.
- Smiley, J.F., Goldman-Rakic, P.S., 1996. Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* 367, 431-443.
- Tilakaratne, N., Friedman, E., 1996. Genomic responses to 5-HT<sub>1A</sub> or 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor activation is differentially regulated in four regions of rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 307, 211-217.
- Vaidya, V.A., Marek, G.H., Aghajanian, G.K., Duman, R.S., 1997. 5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J. Neurosci.* 17, 2785-2795.



- Vaillant, A.R., Brown, D.L., 1995. Accumulation of microtubule-associated protein 1A (MAP1A) in differentiating P19 embryonal carcinoma cells. *Biochem. Cell. Biol.* 73, 695-702.
- Vaillant, A.R., Müller, R., Langkopf, A., Brown, D.L., 1998. Characterization of the microtubule-binding domain of microtubule-associated protein 1A and its effects on microtubule dynamics. *J. Biol. Chem.* 273, 13973-13981.
- Watts, S.W., 1998. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway *via* the 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 861, 162-168.
- Willins, D.L., Alsayegh, L., Berry, S.A., Backstrom, J.R., Sanders-Bush, E., Friedman, L., Khan, N., Roth, B.L., 1998. Serotonergic antagonist effects on trafficking of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors *in vitro* and *in vivo*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 861, 121-127.
- Willins, D.L., Berry, S.A., Alsayegh, L., Backstrom, J.R., Sanders-Bush, E., Friedman, L., Roth, B.L., 1999. Clozapine and other 5-hydroxytryptamine-2A receptor antagonists alter the subcellular distribution of 5-hydroxytryptamine-2A receptors *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience* 91, 599-606.
- Willins, D.L., Deutch, A.Y., Roth, B.L., 1997. Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. *Synapse* 27, 79-82.
- Willins, D.L., Meltzer, H.Y., 1997. Direct injection of 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonist into the medial prefrontal cortex produces a head-twitch response in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 699-706.

- Wright, D.E., Seroogy, K.B., Lundgren, K.H., Davis, B.M., Jennes, L., 1995. Comparative localization of serotonin 1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 351, 357-373.
- Wu, C., Yoder, E.J., Shih, J., Chen, K., Dias, P., Shi, L., Ji, X.-D., Wei, J., Conner, J.M., Kumar, S., Ellisman, M.H., Singh S.K. 1998. Development and characterization of monoclonal antibodies specific to the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *J. Histochem. Cytochem.* 46, 811-824.
- Xu, T., Pandey, S.C., 2000. Cellular localization of serotonin<sub>2A</sub> (5-HT<sub>2A</sub>) receptors in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 51, 499-505.

Table 1

DISTRIBUTION OF DENDRITIC 5-HT<sub>2A</sub> IMMUNOGOLD LABELING  
IN ADULT RAT FRONTOPARIETAL CORTEX

---

	SMALL		LARGE	
	I-IV	V-VI	I-IV	V-VI
DENSITY (grains/ $\mu\text{m}^2$ )	2.8 $\pm$ 0.74	3.3 $\pm$ 0.95	1.4 $\pm$ 0.58	1.5 $\pm$ 0.45
PLASMA MEMBRANE				
grains (% of total)	20.3 $\pm$ 3.3	19.5 $\pm$ 4.9	9.4 $\pm$ 3.1	8.9 $\pm$ 3.3
surface (% of total)	21.8 $\pm$ 6.3	20.8 $\pm$ 6.2	11.5 $\pm$ 3.2	9.3 $\pm$ 2.9
CYTOPLASM				
grains (% of total)	79.7 $\pm$ 3.3	80.5 $\pm$ 4.9	90.6 $\pm$ 3.1	91.1 $\pm$ 3.3
surface (% of total)	78.2 $\pm$ 6.3	79.2 $\pm$ 6.2	88.5 $\pm$ 3.2	90.7 $\pm$ 2.9

---

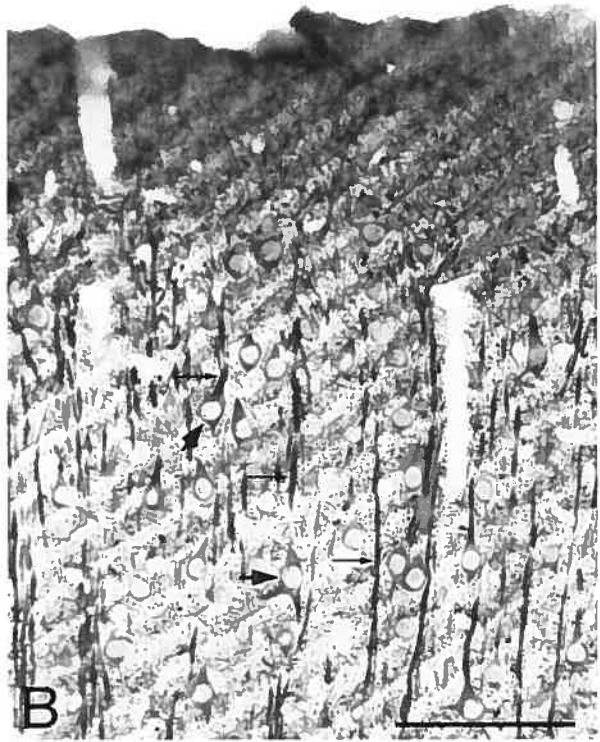
Means  $\pm$  S.E.M. from 6 rats processed for immunocytochemistry with monoclonal 1-76 (n = 2) or polyclonal 22-41 (n = 4), N-terminal 5-HT<sub>2A</sub> antibodies. A total of 14 350 grains were counted in 2000 immunolabeled dendrites of small (< 1  $\mu\text{m}$ ) or large ( $\geq$  1  $\mu\text{m}$ ) diameter, and from the upper (I-IV) or lower (V-VI) cortical layers. Density refers to the number of grains per  $\mu\text{m}^2$  of dendritic section. The percentages under 'Plasma membrane' and 'Cytoplasm' refer to the number of grains and the relative surfaces of these two compartments, as defined in Experimental procedures.

Table 2

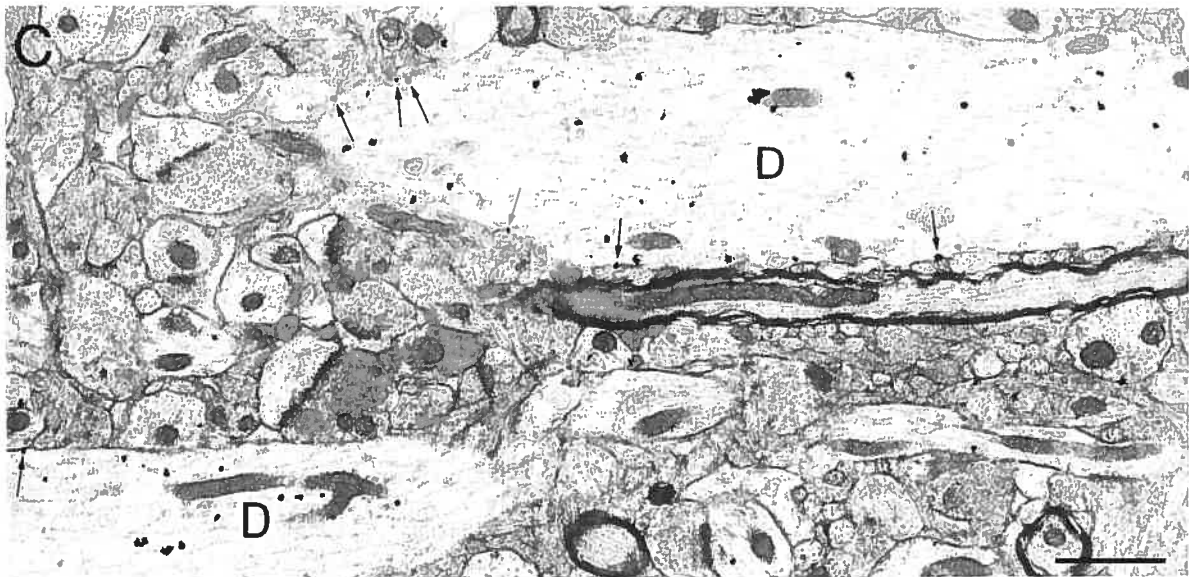
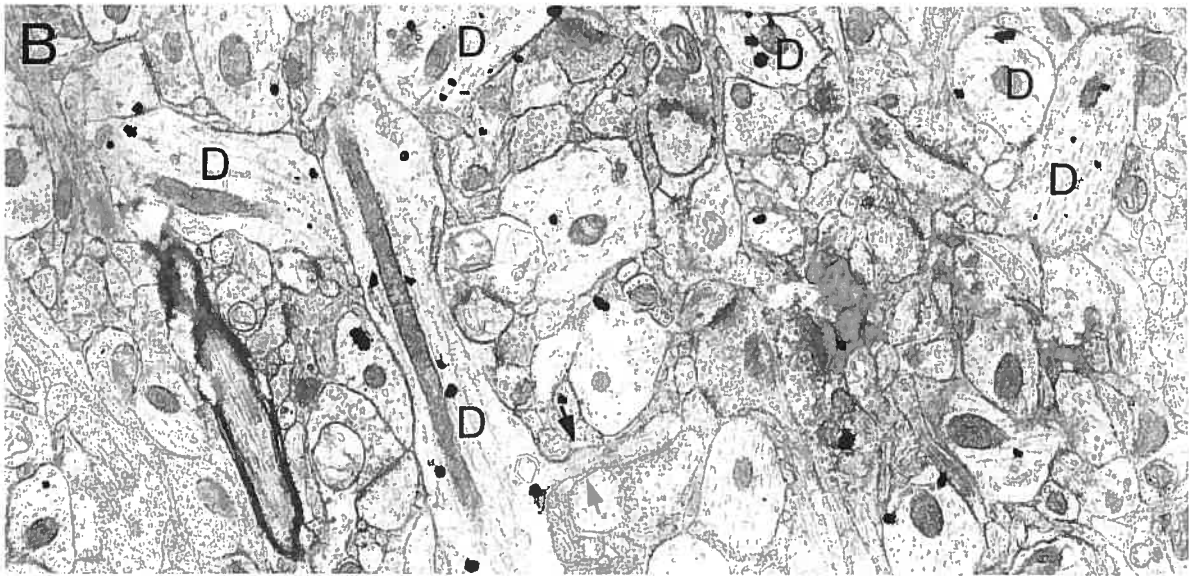
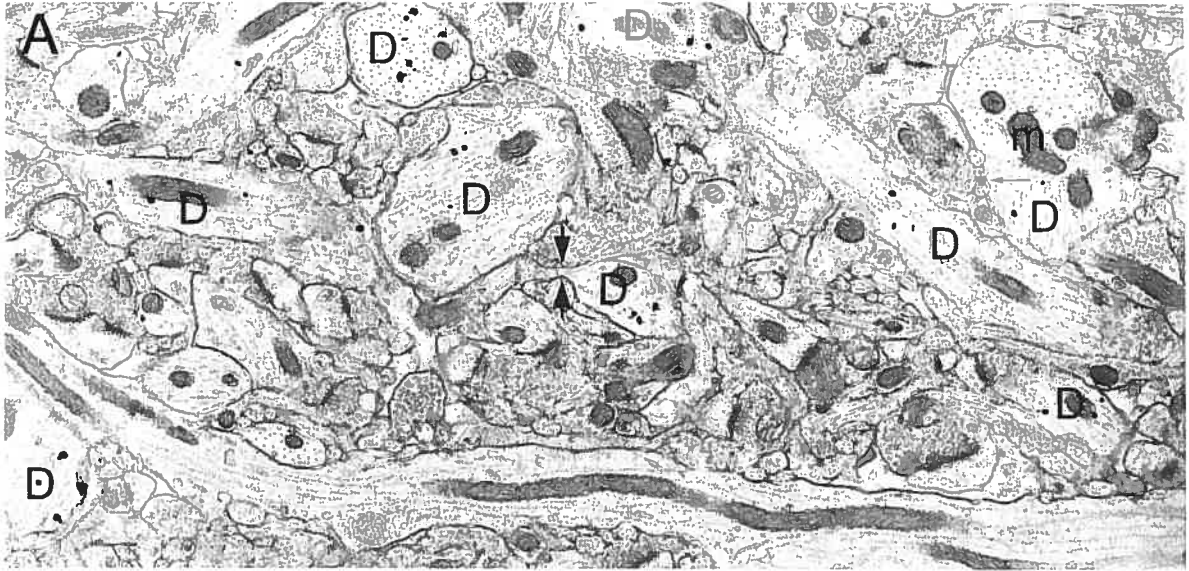
DISTRIBUTION OF DENDRITIC MAP1A IMMUNOGOLD LABELING  
IN ADULT RAT FRONTOPARIETAL CORTEX

	SMALL	LARGE
DENSITY (grains/ $\mu\text{m}^2$ )	8.7 $\pm$ 0.97	6.6 $\pm$ 0.69
PLASMA MEMBRANE		
grains (% of total)	9.0 $\pm$ 1.6	3.1 $\pm$ 0.64
surface (% of total)	25.9 $\pm$ 0.58	9.8 $\pm$ 1.7
CYTOPLASM		
grains (% of total)	91.0 $\pm$ 1.6	96.9 $\pm$ 0.64
surface (% of total)	74.1 $\pm$ 0.58	90.2 $\pm$ 1.7

Means  $\pm$  S.E.M. from three rats processed for immunocytochemistry with monoclonal MAP1A antibody (middle cortical layers). A total of 10 627 grains were counted in 458 immunolabeled dendrites of small ( $< 1 \mu\text{m}$ ) or large ( $\geq 1 \mu\text{m}$ ) diameter. As in Table 1, density refers to the number of grains per  $\mu\text{m}^2$  of dendritic section, and the percentages under 'Plasma membrane' and 'Cytoplasm' to the number of grains and relative surfaces in these two compartments.

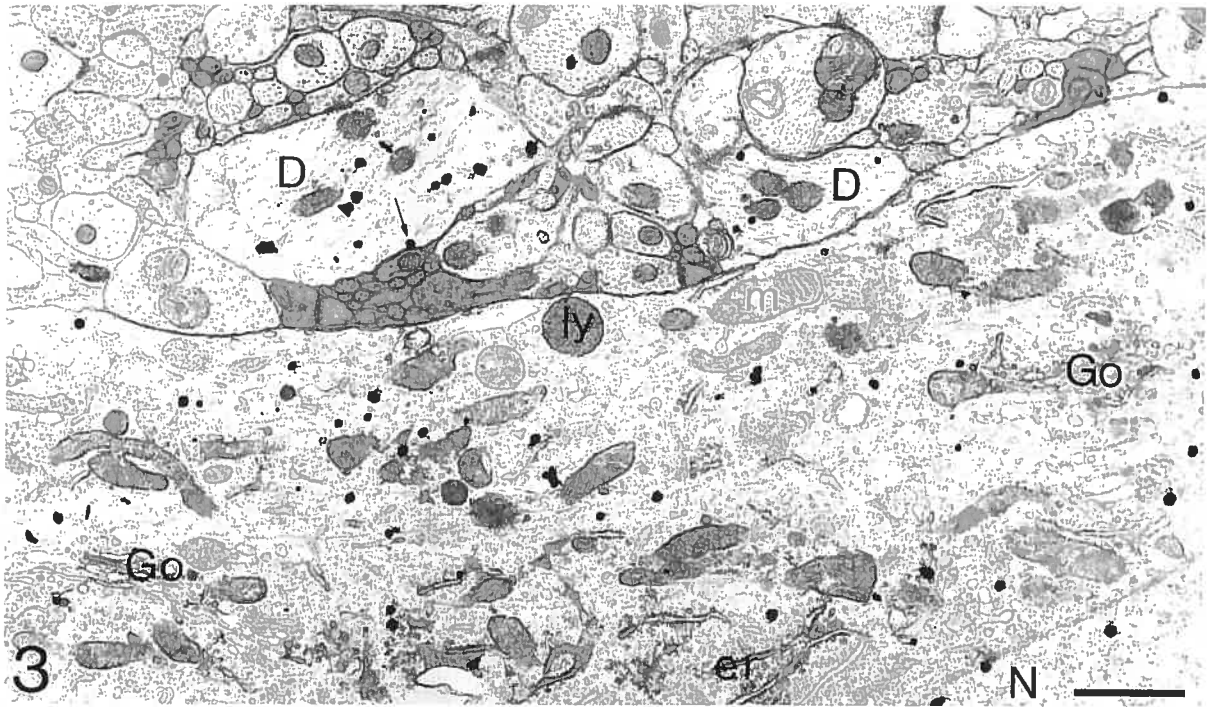


**Figure 1 : Light microscopic immunocytochemical visualization of (A) 5-HT<sub>2A</sub> receptor (N-terminal polyclonal antibody) and (B) MAP1A protein (monoclonal antibody), in the upper layers of adult rat parietal cortex.** DAB immunolabeling in transverse, 50- $\mu$ m-thick, vibratome sections. With both antibodies, note the relatively weak immunoreactivity of neuronal perikarya (e.g. arrowheads) and denser immunolabeling of cortical dendrites (e.g. thin arrows), including their distal ramifications in superficial layer I. The number of dendrites immunoreactive for MAP1A protein appears much greater than for 5-HT<sub>2A</sub> receptor. In both instances, note the total absence of punctate staining suggestive of dendritic spines. X 250. Scale bar: 100  $\mu$ m.

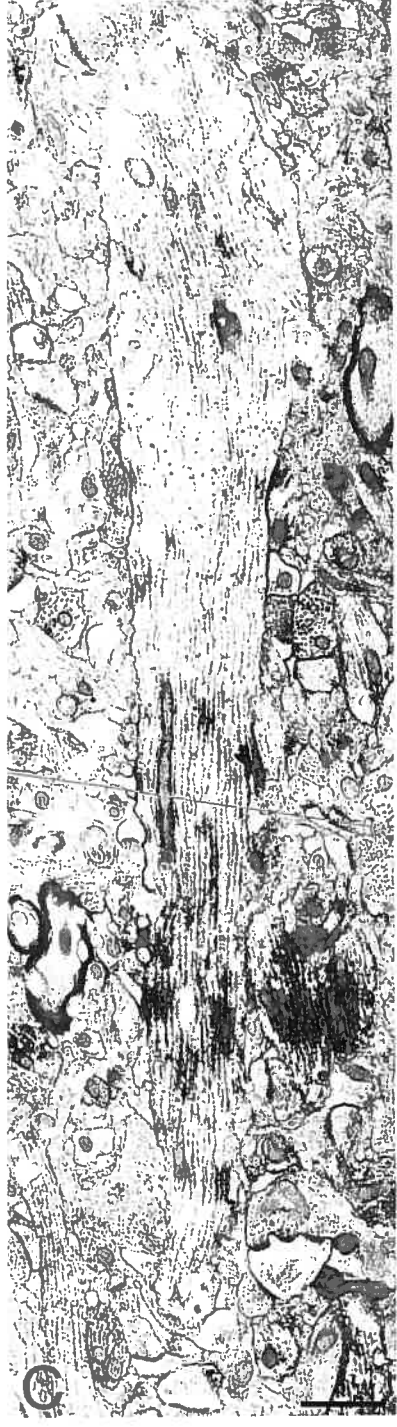
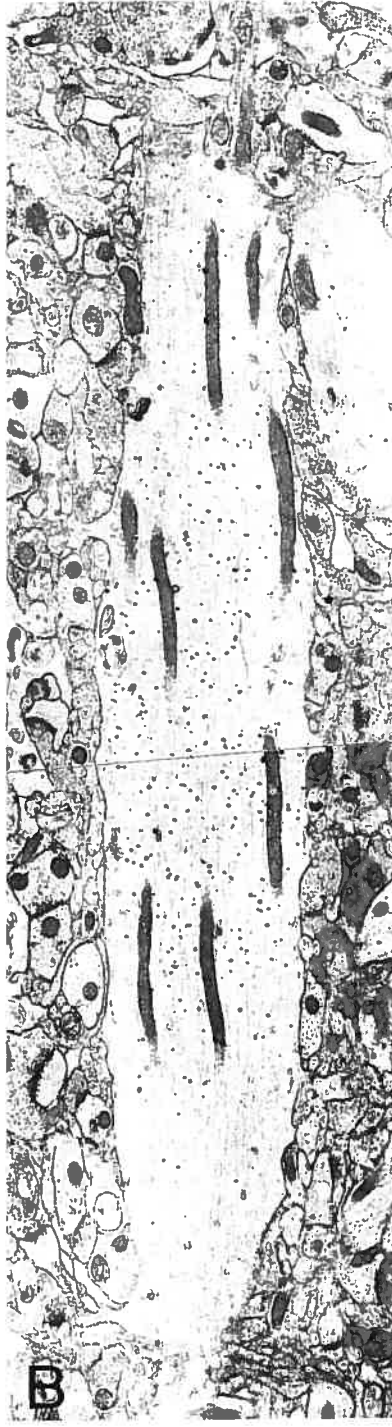


**Figure 2 : 5-HT<sub>2A</sub> receptors in cortical (frontoparietal) dendrites, as visualized by pre-embedding immunogold labeling with three different primary antibodies: (A) N-terminal polyclonal; (B) N-terminal monoclonal, and (C) C-terminal polyclonal.** All three antibodies reveal a similar subcellular distribution. In **A** (upper cortical layers), note the selectivity of the dendritic localization. Within labeled dendrites (**D**), immunogold particles are found over and between neurotubules, but never on mitochondria (e.g., **m**). They are rarely found on dendritic membrane (thin arrow at upper right) as opposed to cytoplasm. In the center, between arrowheads, the dendritic spine arising from an immunoreactive dendrite is entirely free of label. In **B** (upper cortical layers), note the similar pattern of subcellular distribution. Between arrowheads, another dendritic spine emerging from an immunoreactive dendritic branch is entirely free of label; this spine is synaptically contacted by an axon terminal. In **C** (lower cortical layers), two longitudinal sections of larger dendrites display numerous gold particles mostly distributed in the cytoplasm (a few particles associated with the plasma membrane are indicated by thin arrows). No 5-HT<sub>2A</sub> receptors are detected on axon terminals. Uniform magnification: X 15 000. Scale bar: 1  $\mu$ m.





**Figure 3 : Part of an immunoreactive nerve cell body from the lower cortical layers, illustrating the predominantly intracytoplasmic localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors.** Labeling with N-terminal monoclonal primary antibody. In the perikaryon (N in nucleus), note the rarity of immunogold particles over rough endoplasmic reticulum (er), Golgi apparatus (Go), lysosomal bodies (ly) and mitochondria (e.g., m), as well as on the plasma membrane. A single particle (thin arrow) is associated with the plasma membrane in the larger of two nearby immunoreactive dendrites (D). Magnification: X 15 000. Scale bar: 1  $\mu$ m.



**Figure 4 : Large cortical dendrites singly immunogold-labeled for (A) 5-HT<sub>2A</sub> receptors and (B) MAP1A protein, or (C) doubly labeled for 5-HT<sub>2A</sub> receptors (immunoperoxidase) and MAP1A protein (immunogold).** The receptors were labeled with the N-terminal polyclonal antibody (A and C). In spite of differences in the number and size of silver-intensified immunogold particles in these three experiments, note the similar subcellular distribution of the receptors (A) and MAP1A protein (B, C). In C (see also B), the uneven density of the immunogold labeling (MAP1A protein) along the longitudinally cut dendrite presumably reflects the limited penetration of reagents during immunocytochemical processing. The immunoperoxidase precipitate (5-HT<sub>2A</sub> receptors) is found along the entire length (17  $\mu$ m) of this dendritic section. Where most prominent, it is aggregated in patches along microtubules, the outer membrane of mitochondria and the plasma membrane (see also the numerous, transversely cut, immunoperoxidase-labeled dendritic profiles in the surrounding neuropil). Magnification: X 11 000. Scale bar : 1  $\mu$ m.

## **Chapitre 4 : DONNÉES COMPLÉMENTAIRES**

## 4.1 Introduction

Dans les deux chapitres précédents, nous avons décrit et analysé les marquages immunocytochimiques obtenus à l'aide de trois anticorps reconnaissant des portions différentes de la séquence du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Ceci nous a permis de préciser la localisation cellulaire et subcellulaire de ce récepteur dans le système nerveux central du rat adulte.

Dans ce chapitre, nous allons présenter les données de deux études préliminaires visant à mieux comprendre deux propriétés du récepteur révélées par nos travaux. La première étude, immunocytochimique, a exploré la relation entre la topographie subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et la disponibilité de la sérotonine endogène (section 4.2). La deuxième étude, biochimique, voulait comprendre la signification du marquage intracellulaire majoritaire de ce récepteur (section 4.3).

## 4.2 Localisation immunocytochimique et expression du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> par suite de déplétion de la sérotonine

Une caractéristique de la distribution du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, telle que mise en évidence au chapitre 2 (voir aussi Janssen et al., 1998, 2000, 2001), est le manque de concordance entre sa densité régionale de localisation et celle de l'innervation à sérotonine. La signification fonctionnelle d'un tel mésappariement (*mismatch*) reste à établir. Elle soulève cependant des questions intéressantes quant à la relation entre le sous-type récepteuriel 5-HT<sub>2A</sub> et son ligand naturel. À cet égard, une étude effectuée pour un autre RCPG, le

récepteur ss2 de la somatostatine (Durnaude et al., 1998) s'est avérée particulièrement instructive. Ces auteurs ont démontré que la localisation du récepteur ss2 est surtout intracellulaire dans les régions cérébrales d'innervation somatostatinergerique dense, et surtout membranaire là où cette innervation est de faible densité (Durnaude et al., 1998).

Par analogie à ces travaux, nous avons cherché à éliminer la sérotonine du milieu ambiant en vue de déterminer si le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> se concentrerait alors sur la membrane plasmique. À cette fin, nous avons effectué des expériences immunocytochimiques en microscopie photonique et électronique par suite de déplétion de la sérotonine avec la neurotoxine *para*-chlorophenylalanine (PCPA). La PCPA inactive de manière irréversible l'enzyme tryptophane hydroxylase, laquelle contrôle la réaction d'hydroxylation du tryptophane, étape limitante de la biosynthèse de la sérotonine *in vivo* (Koe et Weissman 1966; Jéquier et al., 1967; MacDonald et Sirviö 1993). Le traitement que nous avons appliquée entraîne une chute de ~ 95 % du contenu en sérotonine du cortex cérébral chez le rat (Koe et Weissman 1966; Ferron et al., 1981; Dewar et al., 1992), suivie après ~4 jours d'un retour progressif à des concentrations normales atteintes ~15 jours plus tard (Koe et Weissman 1966; Jéquier et al., 1967).

L'immunocytochimie du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> en microscopie optique a été examinée deux heures après la fin du traitement, ainsi qu'à des temps plus éloignés de quatre, sept, quatorze et vingt-huit

jours. Deux heures après la fin du traitement, alors que la déplétion de la sérotonine cérébrale est très profonde, nous avons également étudié l'expression du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> par hybridation *in situ* (expériences effectuées avec la collaboration du laboratoire du Dr Jean-Jacques Soghomonian; Université Laval; Québec) et effectué un examen préliminaire de sa distribution subcellulaire en microscopie électronique.

#### **4.2.1 Matériel et méthodes**

##### **4.2.1.1 Anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> et anti-5-HT**

Deux anticorps anti-récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, le monoclonal en N-terminal (Wu et al., 1998) et le polyclonal en N-terminal (Roth et al., 1995; Berry et al., 1996; Willins et al., 1997), ont été utilisés pour ces expériences, de même qu'un anticorps commercial anti-5-HT polyclonal (Incstar).

##### **4.2.1.2 Traitement à la PCPA et préparation du tissu cérébral**

Quarante rats mâles adultes (250 ± 50 g), de souche Sprague-Dawley (St. Constant, Québec), ont servi à cette étude. La moitié des animaux a subi un traitement à la PCPA, par injection intrapéritoneale quotidienne de 400 mg du produit durant 3 jours consécutifs, tandis que l'autre moitié a reçu un volume équivalent de solution saline. Deux heures (n=18), quatre jours (n=6), sept jours (n=10), quatorze jours (n=4) ou vingt-huit jours (n=2) après la fin du traitement, les rats ont été anesthésiés au pentobarbital de sodium (Somnotol : 65 mg/kg, i.p.) et sacrifiés par perfusion trans-aortique



d'une solution de paraformaldéhyde 4 % (n=36) ou glutaraldéhyde, 1.75 % (n=4) dans le tampon phosphate (0.2 M pH 7.4). La région du cerveau comprise entre les niveaux anatomiques 8.1 et 6.7 mm devant le plan interaural (atlas de Paxinos et Watson, 1986) a été débitée au vibratome, en coupes transversales de 50  $\mu$ m d'épaisseur.

#### **4.2.1.3 Immunocytochimie en microscopie optique**

Les expériences ont toutes été effectuées sur des paires de rats, de manière à ce que les coupes provenant de rats traités avec la PCPA et de rats témoins, soigneusement sélectionnées pour correspondre à un même niveau anatomique, soient toujours soumises simultanément (dans les mêmes tubes) aux différentes étapes de l'immunomarquage. La visualisation immunocytochimique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> en microscopie photonique (révélation à la 3,3-diaminobenzidine) a été effectuée avec les anticorps anti 5-HT<sub>2A</sub> monoclonal N-terminal (n=36) ou polyclonal N-terminal (n=4), tel que décrit en détails au chapitre précédent. L'immunocytochimie de la 5-HT a été effectuée selon un protocole similaire.

#### **4.2.1.4 Immunocytochimie en microscopie électronique**

Des coupes provenant de deux paires de rats (2 traités et 2 témoins) sacrifiés deux heures après la fin du traitement ont été soumises à l'immunocytochimie 5-HT<sub>2A</sub> avec l'un des deux anticorps utilisés en microscopie optique. Elles ont été préparées pour la microscopie électronique après marquage à l'or en pré-enrobage tel que décrit en détail au chapitre précédent. L'examen a porté sur des

dendrites du cortex fronto-pariétal et 28 microphotographies ont été utilisées pour la quantification de la distribution de l'immunoréactivité.

#### **4.2.1.5 Hybridation *in situ***

Douze rats (6 traités et 6 témoins) ont été sacrifiés par décapitation deux heures après la fin du traitement. Leur cerveau a été rapidement prélevé, congelé dans l'isopentane et entreposé à -80 °C. Des coupes transverses de 20 µm d'épaisseur, provenant de la région comprise entre les niveaux anatomiques 7.7 et 6.7 mm devant le plan interaural (atlas de Paxinos et Watson, 1986) ont été préparées au cryostat (-18 °C) et recueillies sur lames gélatinées. L'hybridation *in situ* a été effectuée à l'aide d'une sonde d'ARNm radioactive (<sup>14</sup>C), produite à partir d'un ADNc encodant pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (Laprade et al., 1996). Les niveaux d'ARNm ont été mesurés dans le cortex pariétal et le striatum (trois coupes par rat) par densitométrie automatisée.

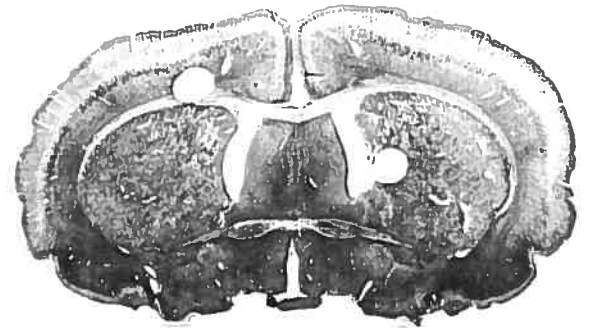
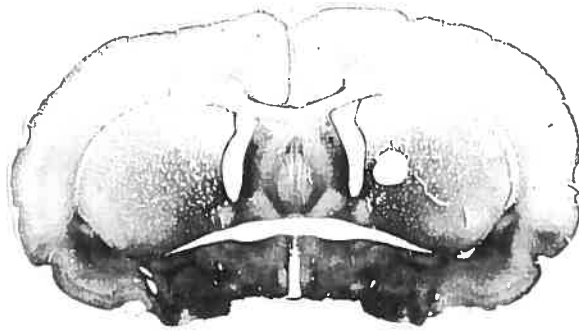
### **4.2.2 Résultats**

#### **4.2.2.1 Immunoréactivité de la 5-HT et du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> à différents temps après la fin du traitement à la PCPA (microscopie optique)**

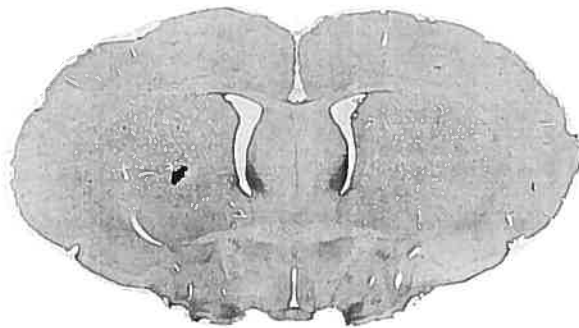
L'immunocytochimie 5-HT effectuée sur des coupes du cerveau fixé deux heures après la fin du traitement montre une forte baisse d'immunoréactivité chez tous les animaux traités, confirmant ainsi la déplétion profonde de 5-HT provoquée par le traitement (Figures 1

**5-HT**

**5-HT2A**



**TÉMOIN**



**PCPA**

**Figure 1 :** Immunoréactivité de la sérotonine et du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, sur des coupes adjacentes, deux heures après la fin du traitement à la PCPA. Grossissement 8.5 X.

et 2, et Tableau 1). Les coupes adjacentes soumises à l'immunocytochimie du récepteur montrent une forte baisse de l'immunoréactivité 5-HT<sub>2A</sub> comparativement aux témoins, dans toutes les régions du cerveau de tous les animaux traités comparativement aux témoins (Figures 1 et 2, et Tableau 1). À plus fort grossissement, on peut constater que cette diminution d'immunoréactivité intéresse aussi bien les corps cellulaires que les dendrites, de même que les axones des voies de projection lorsqu'ils sont regroupés en faisceaux (non illustré).

Les animaux ayant récupéré pendant quatre jours après la fin du traitement présentent encore une immunoréactivité 5-HT beaucoup plus faible que celle des témoins (Figure 2 et Tableau 1). Il en est de même, à un moindre degré, de l'immunoréactivité du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> chez deux des trois animaux traités comparativement à leurs témoins (Figure 2 et Tableau 1). Dans une des trois paires, cependant, nous n'avons pas décelé de baisse de l'immunoréactivité du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> chez l'animal traité (Tableau 1).

Les animaux ayant récupéré pendant sept jours après la fin du traitement montrent une immunoréactivité 5-HT légèrement abaissée ou inchangée chez les traités par rapport aux témoins (Figure 2 et Tableau 1). L'immunoréactivité du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> examinée chez trois paires de rats, apparaît ici légèrement plus faible, inchangée, ou même légèrement augmentée par rapport aux témoins (Figure 2 et Tableau 1).

## 5-HT

## 5-HT<sub>2A</sub>



2 HEURES



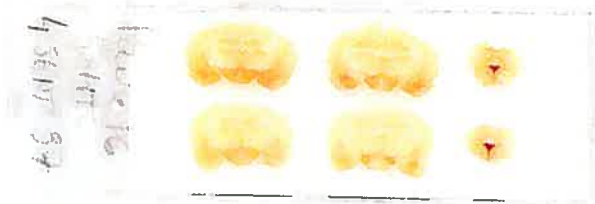
2 HEURES



4 JOURS



4 JOURS



7 JOURS



7 JOURS



14 JOURS



14 JOURS

**Figure 2:** Immunoréactivité de la sérotonine et du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, à différents temps après la fin du traitement à la PCPA. Les coupes trouées, placées en haut sur les lames, proviennent de rats témoins. Les coupes provenant de rats traités sont celles du bas sur chaque lame. Images obtenues par photocopie des lames histologiques.

**Tableau 1. Intensité de l'immunoréactivité 5-HT et 5-HT2A à différents temps après la fin du traitement à la PCPA**

Traités versus témoins	2h		4 jours		7 jours		14 jours		28 jours	
	5-HT	5-HT2A	5-HT	5-HT2A	5-HT	5-HT2A	5-HT	5-HT2A	5-HT	5-HT2A
Paire # 1	n.e.	↓↓								
Paire # 2	n.e.	↓								
Paire # 3	↓↓	↓↓								
Paire # 4	↓↓↓	↓↓↓								
Paire # 5	↓↓	↓↓								
Paire # 6	↓↓↓	↓↓↓								
Paire # 7	n.e.	↓								
Paire # 8	↓↓↓	↓↓↓								
Paire # 9	↓↓	↓								
Paire # 10			↓	=						
Paire # 11			↓	↓						
Paire # 12			↓	↓						
Paire # 13					=	↑↑				
Paire # 14					↓	↓				
Paire # 15					↓	=				
Paire # 16					n.e.	↓				
Paire # 17					n.e.	↑				
Paire # 18							= ou ↑	↑↑		
Paire # 19							n.e.	=		
Paire # 20									n.e.	↑↑

Les coupes d'une paire d'animaux (un traité avec la PCPA et l'autre avec du salin) ont été incubées ensemble pour l'immunocytochimie 5-HT ou 5-HT<sub>2A</sub>. Les flèches indiquent une différence d'intensité du marquage entre les coupes provenant du rat traité et celles provenant du rat témoin. Le nombre de flèches indique l'importance de la différence sur une échelle de trois (faible, moyenne, forte). Le signe = indique l'absence de différence et n.e. signifie que l'immunocytochimie 5-HT n'a pas été effectuée.

Chez deux paires d'animaux ayant survécu quatorze jours après le traitement, l'immunoréactivité 5-HT est apparue inchangée sinon légèrement plus forte que chez les témoins (Figure 2 et Tableau 1). De même, l'immunoréactivité du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> a semblé inchangée dans une paire et légèrement augmentée dans l'autre (Figure 2 et Tableau 1).

Chez une seule paire d'animaux étudiée vingt-huit jours après la fin du traitement, l'immunoréactivité 5-HT n'a pas été examinée, mais l'immunoréactivité du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> du rat traité s'est avérée nettement plus intense que celle du rat témoin (Tableau 1).

#### **4.2.2.2 Expression du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, deux heures après la fin du traitement à la PCPA (hybridation *in situ*)**

Deux heures après la fin du traitement à la PCPA, la quantité d'ARNm du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> chez les animaux traités était augmentée de façon significative par rapport aux animaux témoins (Tableau 2). Les valeurs mesurées chez les traités étaient supérieures aux témoins de 30 %, en moyenne, dans le cortex pariétal et de 60 % dans le striatum.



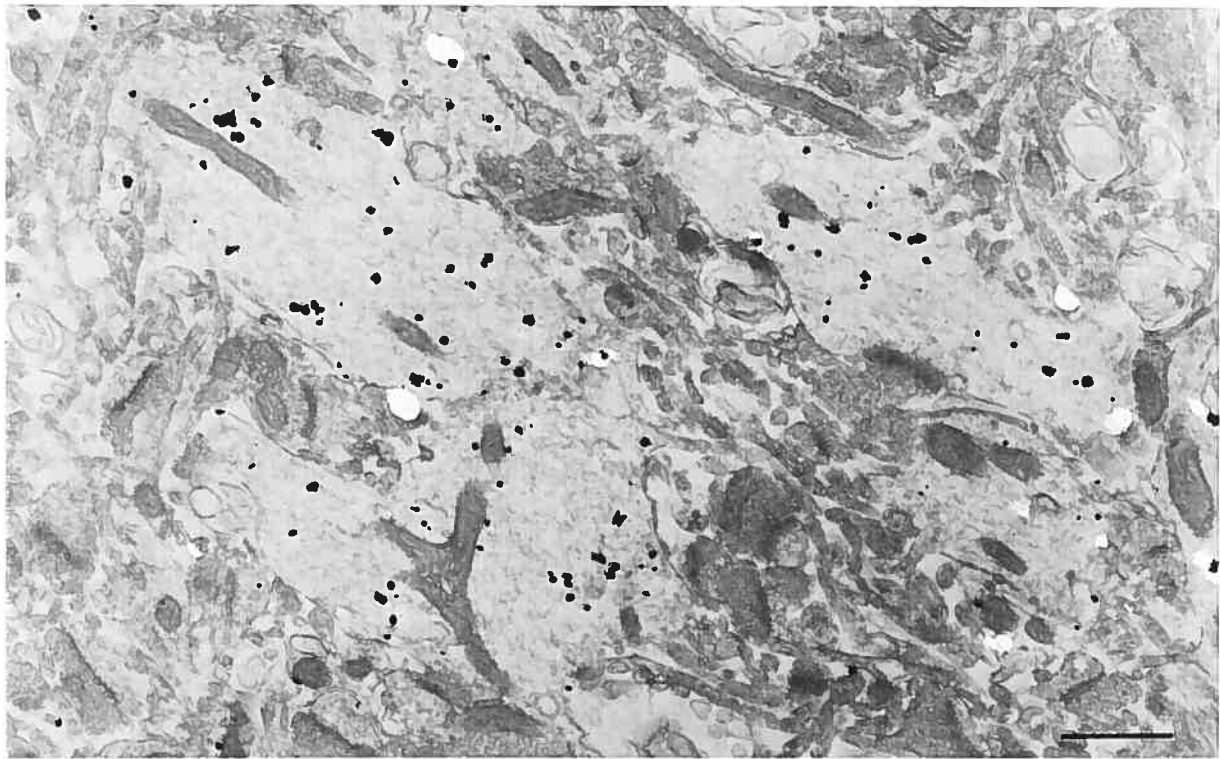
**Tableau 2. Densité de l'ARNm du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le cortex pariétal et le striatum, deux heures après la fin du traitement à la PCPA**

	STRIATUM	CORTEX PARIÉTAL (toutes couches confondues)
Témoins	142 ±22	89 ±12
PCPA	229 ±25	118 ±9
Différence %	↑ 61 % ***	↑ 32 % **

\*\* p<0.05 et \*\*\* p<0.005 par le test U non paramétrique Mann-Whitney.

#### **4.2.2.3 Localisation subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, deux heures après la fin du traitement à la PCPA (microscopie électronique)**

Deux heures après la fin du traitement à la PCPA, la distribution subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les dendrites du cortex fronto-pariétal, telle qu'observée en microscopie électronique, n'est pas apparue significativement différente entre les animaux traités et les témoins (Figure 3). Une quantification sommaire effectuée sur l'échantillon dendritique en provenance des couches superficielles du cortex de l'un des deux rats traités a montré des proportions de 10 % et 20 % du marquage du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le compartiment membranaire des grandes et petites dendrites,



**Figure 3:** Distribution subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les dendrites du cortex fronto-pariétal, deux heures après la fin du traitement à la PCPA. Echelle : 1 $\mu$ m.

respectivement (Tableau 3), soit des pourcentages équivalents à ceux des surfaces respectives de ces compartiments (Tableau 3) et très semblables à ceux précédemment mesurés chez le rat normal (Chapitre 3). La densité du marquage du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> chez l'animal traité était de 4.1 grains/ $\mu\text{m}^2$  dans les grandes dendrites et de 4.9 grains/ $\mu\text{m}^2$  dans les petites dendrites (Tableau 3), indiquant, comme chez le rat normal, un gradient proximo-distal de concentration croissante, toutefois moins prononcé que chez le rat normal (voir Chapitre 3).

**Tableau 3. Distribution subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les dendrites des couches supérieures du cortex fronto-pariétal du rat adulte, deux heures après la fin du traitement à la PCPA**

	PETITES	GRANDES
DENSITÉ (grains/ $\mu\text{m}^2$ )	4.9	4.1
MEMBRANE PLASMIQUE		
grains (% du total)	22.5	10.3
surface (% du total)	23.3	10.2
CYTOPLASME		
grains (% du total)	77.5	89.7
surface (% du total)	76.7	89.8

Immunocytochimie avec l'anticorps polyclonal N-terminal. Un total de 678 grains d'or a été dénombré dans un échantillon de 31 dendrites marquées, de petit (< 1 $\mu\text{m}$ ) ou grand (>1 $\mu\text{m}$ ) diamètre. La densité (grains/ $\mu\text{m}^2$ ) représente le nombre de grains d'or par  $\mu\text{m}^2$  de surface dendritique. Les pourcentages 'membrane plasmique' et 'cytoplasme' correspondent respectivement au nombre de grains d'or et à la surface des compartiments de comptage.

### 4.2.3 Interprétation

Nous avons pu documenter une forte diminution de l'immunoréactivité du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, associée à une augmentation significative de l'expression de son ARNm, par suite d'une déplétion sévère et prolongée de la sérotonine dans l'ensemble du cerveau de rat. Dans toutes les régions cérébrales visualisées, le décours temporel de cet effet du PCPA a montré une évolution quasi-parallèle de la quantité de protéine 5-HT<sub>2A</sub> (immunoréactive) et de la teneur en sérotonine. Ces résultats suggèrent que l'expression et la quantité du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> produite par les neurones du cerveau sont fonction de la concentration en sérotonine endogène et donc possiblement régulées par celle-ci.

Il faut noter que la PCPA entraîne aussi une baisse modérée de la teneur en catécholamines, secondaire soit à la baisse de sérotonine soit à une inhibition par la PCPA de la synthèse des protéines en général (Reader et al., 1986 ; Vanderwolf et al., 1990). Bien qu'aucune étude n'ait indiqué une action directe de la PCPA sur la synthèse du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, la spécificité du résultat obtenu dans les conditions particulières de nos expériences devra être vérifiée. On pourrait chercher à savoir, notamment, si l'effet du traitement à la PCPA sur l'immunoréactivité et l'expression du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> peut être contré par un traitement préalable avec l'antagoniste 5-HT<sub>2A</sub> kétanserine, ou par l'administration du précurseur 5-hydroxytryptophane, laquelle restaure la concentration de

sérotonine malgré l'inhibition de la tryptophane hydroxylase (Manrique et al., 1994 ; Sprague et al., 1994).

D'autres auteurs avaient précédemment examiné la densité de liaison au récepteur 5-HT<sub>2A</sub> par suite de traitements avec la PCPA. Après 4 jours de traitement (200 mg/kg/jour, i.p.) Conn et Sanders-Bush (1986) n'ont pas trouvé de changement significatif de la densité de radioliasion de la [<sup>3</sup>H]kétansérine dans le cortex cérébral du rat, deux jours après la fin du traitement. De même, Compan et al., (1998b) n'ont pas rapporté de changement de la densité de radioliasion du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le cortex cérébral, telle que mesurée avec le [<sup>125</sup>I]DOI, par suite d'un traitement de 5 jours (300 mg/kg/jour, i.p.) et mesure un jour après la fin du traitement. Par contre, un traitement chronique de 18 jours (300 mg/kg/jour, i.p. pendant 3 jours, puis 100 mg/kg/jour tous les deux jours pendant 15 jours) a produit une augmentation de 70% des sites de liaison de la [<sup>3</sup>H]kétansérine, au récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, dans le striatum (Roth et al., 1987). Parce que ces études ont eu recours à des régimes de traitement différents du nôtre, toute comparaison avec nos propres résultats est difficile. De plus, la durée du traitement est susceptible d'augmenter l'importance des effets secondaires de la drogue. Des expériences effectuées dans les mêmes conditions expérimentales seront nécessaires pour établir la relation entre des résultats immunocytochimiques, qui visualisent en principe la protéine réceptrielle où qu'elle soit, et des résultats de radioliasion

qui ne mesurent que la fraction dite « fonctionnelle » du récepteur, celle à laquelle se lient les ligands (voir Beaudet et al., 1998).

Par ailleurs, la microscopie électronique nous a montré que la diminution d'immunoréactivité 5-HT<sub>2A</sub>, observée deux heures après les trois jours de déplétion de la sérotonine, n'était pas accompagnée de redistribution subcellulaire du récepteur entre les compartiments membranaire et cytoplasmique. Ce résultat va à l'encontre de la possibilité d'une internalisation quasi permanente du récepteur à l'état physiologique et conforte plutôt l'hypothèse d'un mode de fonctionnement particulier, tel que suggéré aux Chapitres 2 et 3.

### **4.3 Association physique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> au cytosquelette**

Une autre caractéristique de la distribution du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est sa localisation majoritairement intracellulaire dans les corps cellulaires et dendrites des neurones de toutes les régions cérébrales que nous avons examinées (cortex fronto-pariétal, cortex piriforme ou striatum). De plus, dans ces régions, aucun marquage significatif n'a été décelé sur les épines dendritiques ou les terminaisons axonales. La quantification du marquage des dendrites du cortex cérébral a révélé que la quantité de récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans un compartiment représentant la membrane plasmique était faible par rapport à celle du cytoplasme (10 à 20 %) et strictement proportionnelle à la surface de ce compartiment tout au long de l'arbre dendritique. Par contre, la densité totale du marquage 5-HT<sub>2A</sub> s'est avérée deux fois plus forte dans les petites que dans les grandes dendrites. Nous avons conclu de ce tableau que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> avait probablement une fonction intracellulaire et avancé l'hypothèse qu'il puisse faire partie d'un système de signalisation intracellulaire rétrograde.

La prédominance intracellulaire du marquage immunocytochimique d'un RCPG soulève cependant plusieurs interrogations quant à sa signification fonctionnelle. À l'aide d'anticorps, la protéine constituant le récepteur est en principe détectée dans tous les lieux où elle est présente et non seulement là où le récepteur est accessible à des ligands. À l'intérieur des corps

cellulaires et dendrites, le marquage du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (peu importe l'anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> utilisé) ne paraissait toutefois pas montrer de préférence envers un organe particulier, comme on s'y serait attendu d'un marquage des sites de synthèse et/ou de dégradation. Malgré l'utilisation d'un marqueur non diffusible (particules d'or intensifiées à l'argent) le marquage est au contraire apparu distribué au hasard dans le cytoplasme. Dans les dendrites, on le retrouvait aussi bien sur les microtubules qu'entre ceux-ci, sans association apparente à de quelconques structures vésiculaires. Évidemment, notre technique produisait des particules opaques aux électrons d'une taille moyenne de 60 nm, limitant ainsi la résolution à des structures de dimension inférieure à cette taille. La distribution observée laissait donc place à deux interprétations.

Une première était que le récepteur soit associé à des vésicules minuscules, cachées par les particules d'or. Bien que cette éventualité n'ait pu être formellement exclue, nous ne l'avons pas retenue puisqu'il était raisonnable de supposer que de telles vésicules auraient dû être retrouvées en plus grand nombre dans les grandes dendrites que les petites, alors que la densité du marquage 5-HT<sub>2A</sub> était précisément l'inverse.

L'interprétation que nous avons retenue est celle d'une liaison du récepteur à une molécule du cytoplasme ou du cytosquelette. Une telle liaison a déjà été postulée dans le cas des récepteurs ionotropes GABA<sub>c</sub>, dont il a été montré qu'ils sont physiquement associés à la protéine MAP1B dans la rétine du rat (Hanley et al., 1999). De même



le récepteur GABAA se lie avec la protéine GABARAP, une autre protéine associée aux microtubules (Wang et al., 1999). Nous avons donc concentré nos efforts sur une possible association du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> à une protéine associée aux microtubules, en raison de la ressemblance de son marquage subcellulaire à un marquage aux microtubules (Cornea-Hébert et al., 1999ab, 2000, 2002), ainsi que des résultats d'une étude en double hybride, effectuée en parallèle par des collaborateurs américains (laboratoire du Dr. Bryan Roth, Case Western University, Cleveland OH ; Kroeze et al., 1999; Kroeze et Roth, 2000), suggérant que la protéine MAP1A puisse interagir avec le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>

En vue de tester cette hypothèse, nous avons procédé à des expériences d'immunobuvardage sur des homogénats ou des extraits de microtubules de cerveau du rat, effectuées avec la collaboration du laboratoire du Dr Nicole Leclerc (Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal).

#### **4.3.1 Matériel et méthodes**

##### **4.3.1.1 Anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> et anti-MAP1A**

Trois anticorps anti-récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, un monoclonal en N-terminal (Wu et al., 1998), un polyclonal en N-terminal (Roth et al., 1995; Berry et al., 1996 ; Willins et al., 1997) et un polyclonal en C-terminal (Cornea-Hébert et al., non publié), ainsi qu'un anticorps monoclonal anti-MAP1A commercial (Chemicon) ont été utilisés. Les détails concernant l'origine respective, la production et la

caractérisation de ces anticorps apparaissent déjà dans les chapitres précédents (voir aussi Figure 3 du Chapitre 1).

#### **4.3.1.2 Homogénat de cerveau entier**

Des rats mâles adultes (Sprague-Dawley,  $250 \pm 50$  g) ont été anesthésiés au pentobarbital de sodium (Somnotol: 65 mg/kg, i.p.), puis sacrifiés par décapitation. Leur cerveau a été rapidement prélevé, puis homogénéisé dans 2.5 ml/g de tissu de tampon de lyse constitué de 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0.5 % deoxycholate de sodium, 0.2 % dodécylsulfate de sodium (SDS) et d'une tablette d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete™ EDTA-free, Roche Diagnostic) par 25 ml. Une centrifugation à 9 900 g pendant 7 min à 4 °C a été ensuite effectuée pour séparer les débris cellulaires de l'homogénat proprement dit.

#### **4.3.1.3. Purification des microtubules**

La purification des microtubules à partir de cerveau de rat adulte normal a été effectuée en utilisant le taxol comme inducteur d'assemblage des microtubules, selon la méthode décrite par R. Vallee (1986). Le cerveau d'un rat adulte a été homogénéisé dans 1.5 ml/g de tissu, dans un tampon PEM constitué de 0.1 M PIPES-NaOH, pH 6.6, 1 mM EGTA et 1 mM MgSO<sub>4</sub>, auquel 1 tablette d'inhibiteurs de protéase Complete™ EDTA-free/25 ml a été ajouté. L'homogénat a été centrifugé à 30 000 g pendant 15 min à 2°C. Le surnageant a été récupéré puis centrifugé à 180 000 g pendant 90 min à 2°C, afin de clarifier la fraction cytosolique de toute membrane microsomale résiduelle (voir aussi Petäjä-Repo et al., 2001). Au

surnageant obtenu, du taxol et du GTP ont été ajoutés, à des concentrations finales respectives de 20  $\mu\text{M}$  et 1 mM, et la solution a été chauffée dans un bain-marie à 37°C pendant 15 min, afin d'accroître l'assemblage des microtubules. La solution a été ensuite centrifugée sur coussin de sucrose préchauffé (1/3 du volume final) à 30 000 g pendant 30 min, à une température de 37°C. Le culot, constitué de microtubules assemblés et de leurs protéines associées, a ensuite été lavé délicatement avec le tampon PEM, afin d'éliminer les traces de protéines cytosoliques solubles pouvant adhérer aux parois du tube, puis resuspendu dans du tampon PEM (1/5 du volume de l'extrait cytosolique de départ), auquel 20  $\mu\text{M}$  de taxol et 1 mM de GTP ont été ajoutés. Cet extrait de microtubules a été aliquoté, congelé dans l'azote liquide et stocké à -80°C.

#### **4.3.1.4 Mesure de la concentration des protéines**

La concentration des protéines dans les différentes préparations a été déterminée en utilisant la trousse DC Protein Assay de Bio-Rad et l'albumine bovine sérique comme standard.

#### **4.3.1.5 Immunobuvardage**

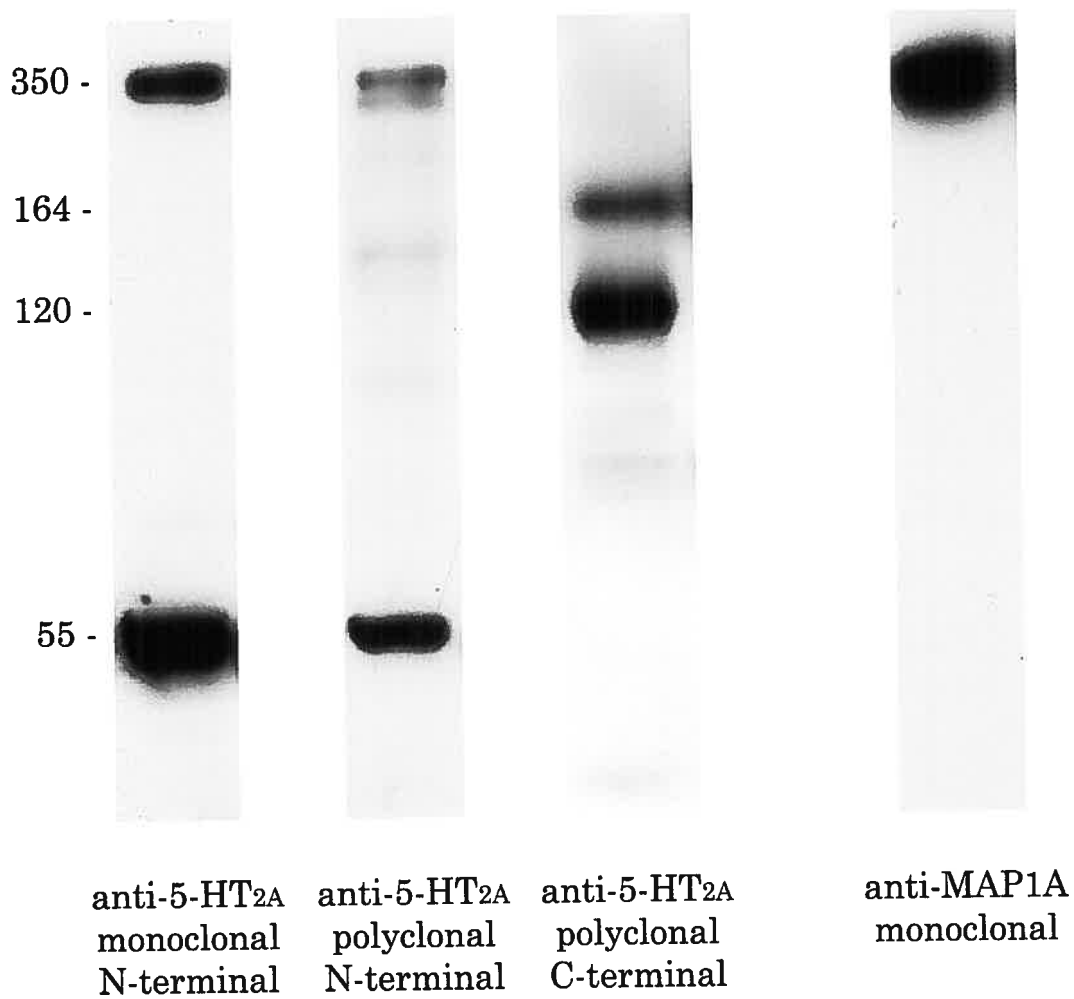
L'immunobuvardage a été effectué sur mini-gel (ProtéanII, Bio Rad), à partir d'échantillons d'homogénat (40  $\mu\text{l}$  par puits contenant 100  $\mu\text{g}$  de protéines) ou d'extraits de microtubules (10  $\mu\text{l}$  par puits contenant 6.5  $\mu\text{g}$  de protéines), chauffés à 95°C pendant 5 min dans du tampon de Laemmli (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 20 % glycérol, 3 % SDS, 3 %  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0.1 % bleu de bromophénol). Dans le cas des extraits de microtubules, certains échantillons ont été

préparés dans du tampon de Laemmli sans  $\beta$ -mercaptoéthanol, et d'autres en présence de 6% ou 9% au lieu de 3% de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Des standards pré-colorés (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad) ont été utilisés sans dilution, à 5  $\mu$ l par puits.

Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Laemmli 1970), en utilisant une concentration de 5% dans le gel de concentration et de 7.5% dans le gel de résolution. Elles ont été ensuite transposées sur membrane de nitrocellulose par transfert électrophorétique (Mini-Trans Blot, Bio Rad). Après une pré-incubation de 10 min dans un tampon TBS contenant 5% de lait, pour éliminer le bruit de fond, les membranes ont été incubées durant douze heures, à 4°C, en présence des anticorps primaires anti-5-HT<sub>2A</sub> (dilution 1/1000) ou anti-MAP1A (dilution 1/2000). Des anticorps secondaires conjugués avec la peroxydase (Jackson ImmunoResearch Laboratories) et la réaction de chemoluminescence (Roche) ont été utilisés pour révéler les bandes réactives.

### **4.3.2 Résultats**

Après révélation avec l'anticorps anti-récepteur 5-HT<sub>2A</sub> monoclonal en N-terminal ou avec l'anticorps polyclonal en N-terminal, l'immunobuvardage de l'homogénat de cerveau montre, en plus d'une bande à 55 kD, une autre bande de faible mobilité électrophorétique, à 350 kD (Figure 4). L'anticorps anti-récepteur



**Figure 4 :** Immunobuvardage d'homogénat de cerveau révélé avec les trois anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> disponibles, et l'anticorps MAP1A. Les produits de la réaction ont été détachés de la membrane à l'aide d'un tampon de "stripping" et la membrane réutilisée pour la révélation de l'anticorps suivant. Résultat représentatif de trois expériences.

5-HT<sub>2A</sub> polyclonal en C-terminal révèle uniquement des bandes à 120 kD et 165 kD (Figure 4), suggérant, comme dans le cas d'autres RCPG (Hebert et al., 1996 ; Jordan et Devi 1999 ; Salahpour et al., 2003 ; Terrillon et Bouvier 2004), la reconnaissance de formes multimériques ou ubiquitinées du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Ces possibilités restent toutefois à confirmer expérimentalement.

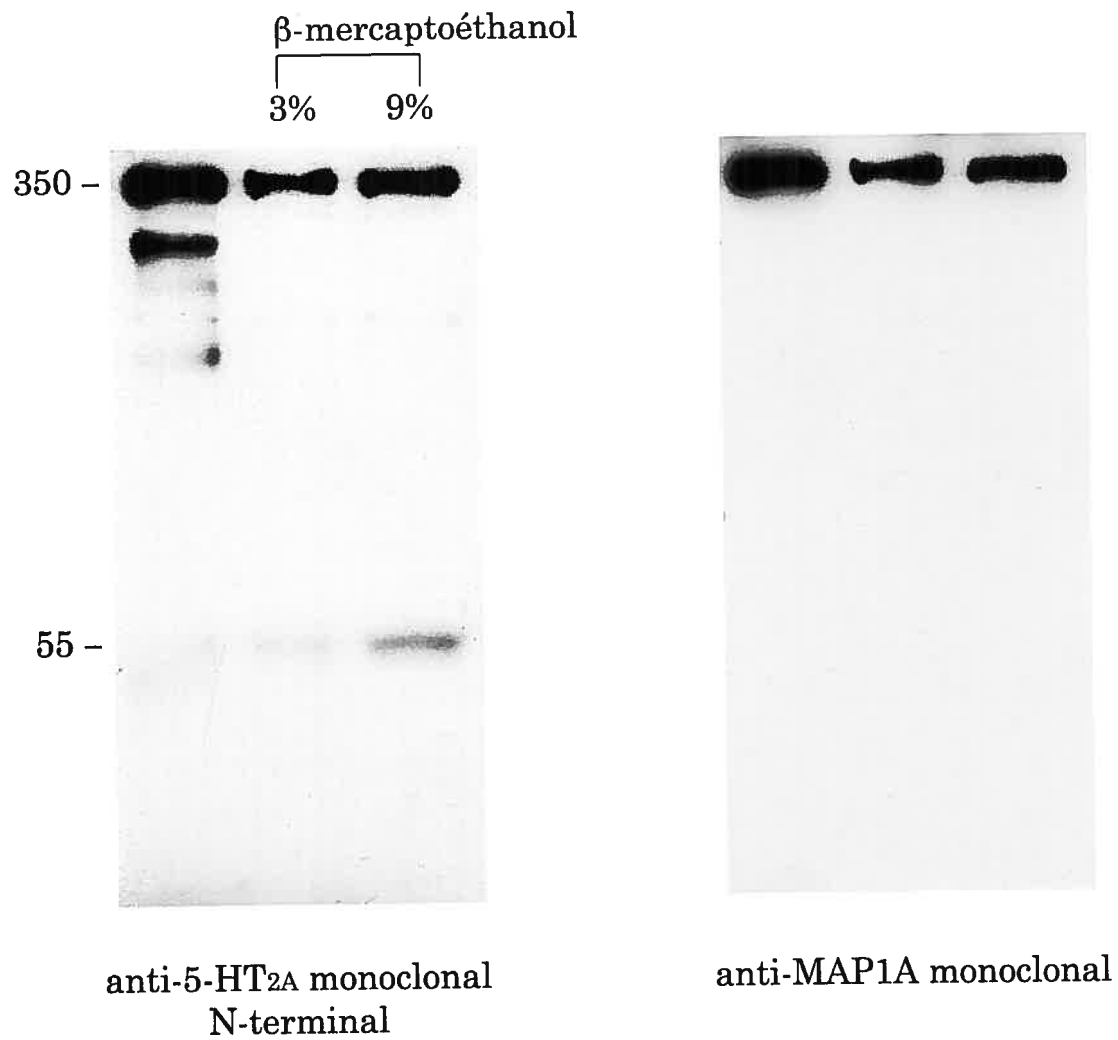
La bande à 55 kD a déjà été décrite et caractérisée par Wu et al. (1998), utilisant l'anticorps anti-récepteur 5-HT<sub>2A</sub> monoclonal en N-terminal; elle représente le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>.

La bande à 350 kD, révélée avec deux des anticorps anti-récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, est détectée pour la première fois (Figure 4). Cette bande est également réactive à l'anticorps anti-MAP1A (Figure 4), mais pas à des anticorps reconnaissant d'autres protéines associées aux microtubules, comme MAP1B ou MAP2 (résultats non montrés). La signification de l'immunoréactivité de cette bande nous a particulièrement intrigué.

Une première possibilité était que cette bande à 350 kD soit artéfactuelle et qu'elle corresponde à la reconnaissance non spécifique, par réaction croisée, de la protéine MAP1A. Ceci semble néanmoins peu probable étant donné qu'aucune homologie de séquence avec la protéine MAP1A n'a été détectée lors d'une recherche récemment effectuée dans la base de données BLAST (Altschul et al., 1997), à partir de la séquence du segment utilisé pour produire l'anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> polyclonal en N-terminal (résidus 22-41 de la séquence du rat;

GDGPRLYHNDNFNSRDANTSE), de même que celle de l'épitope de lecture de l'anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> monoclonal en N-terminal (résidus 64-76 de la séquence humaine ; TCLSILHLQEKNW). De plus, une étude récente, effectuée sur l'intestin de souris dont le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> a été invalidé, n'a montré aucun marquage immunocytochimique musculaire ou neuronal avec l'anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> monoclonal (Fiorica-Howells et al., 2002).

Une autre possibilité était que cette bande de haut poids moléculaire corresponde à un agrégat non spécifique de protéines de l'homogénat en haut du gel. Il est connu que certains RCPG ont tendance à former des agrégats par suite de dénaturation par la chaleur et/ou par la formation de liaisons di-sulfures non spécifiques survenant au cours de la lyse cellulaire (Salahpour et al., 2003). Plusieurs conditions dans la préparation des échantillons de l'homogénat ont été testées ; incluant le non-chauffage des échantillons, la présence ou l'absence d'agents réducteurs comme le  $\beta$ -mercaptoéthanol (3%, 6% ou 9%) ou le dithiothréitol (DTT ; 50 mM ; résultats non illustrés). Dans toutes ces conditions, la bande à 350 kD a été retrouvée ; la chaleur ne changeait pas du tout son aspect, tandis que les agents réducteurs atténuaient sensiblement son intensité, mais seulement à des concentrations de  $\beta$ -mercaptoéthanol très élevées (voir plus loin). L'utilisation de l'agent réducteur N-ethylmaleimide (NEM), actuellement considéré comme agent réducteur de choix (Riordan et Vallee 1972 ; Salahpour et al., 2003), pourra éventuellement être envisagée pour exclure



**Figure 5** : Immubuvardage d'un extrait de microtubules en absence ou présence de concentrations croissantes de β-mercaptoéthanol dans le tampon de dissolution de l'échantillon. Révélations successives avec l'anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> monoclonal en N-terminal et l'anticorps anti-MAP1A. Résultat représentatif de deux expériences.



formellement la possibilité d'agrégats. Il faut toutefois noter qu'une bande non spécifique, constituée de protéines non séparées en haut du gel, aurait dû être visualisée avec l'anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> en C-terminal, ce qui n'a pas été le cas. La possibilité d'un agrégat apparaît cependant faible.

L'hypothèse que cette bande de haut poids moléculaire corresponde à un complexe protéique contenant du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et de la protéine MAP1A est la plus raisonnable, de telle sorte qu'on pouvait s'attendre à retrouver un tel complexe dans une préparation de microtubules purifiés. L'immunobuvardage effectué à partir des extraits de microtubules a montré la même bande à 350 kD après révélation avec l'anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> monoclonal en N-terminal, ainsi qu'avec l'anticorps anti-MAP1A (Figure 5). Le profil obtenu était à nouveau le même pour des échantillons non bouillis ou en présence de DTT (50mM ; résultat non illustré). De plus, une bande à 55 kD, correspondant vraisemblablement au récepteur 5-HT<sub>2A</sub> « libre », a été détectée (Figure 5, piste 2). La présence de bandes 5-HT<sub>2A</sub> immunoréactives dans des échantillons préparés par sédimentation après polymérisation des microtubules est hautement suggestive d'une association physique de ce récepteur aux microtubules ou aux protéines qui leurs sont associées (Wang et al., 1999).

Certains complexes entre protéines peuvent être déstabilisés par des agents réducteurs comme le  $\beta$ -mercaptoéthanol (Jordan et Devi 1999 ; Salahpour et al., 2003). Nous avons donc voulu tester si

nous pouvions déstabiliser le complexe observé avec des concentrations croissantes de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Figure 5). Sans  $\beta$ -mercaptoéthanol dans le tampon de dissolution de l'échantillon (Figure 5 : piste 1), seule la bande de haut poids moléculaire est visible et apparaît de forte intensité. Avec l'ajout de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Figure 5 : piste 2 et 3), la bande à 55 kD est retrouvée après révélation avec l'anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub>, et devient encore plus intense à une concentration de 9 %  $\beta$ -mercaptoéthanol, tandis que la bande à 350 kD semble plus mince et de plus faible intensité en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, comme sous l'effet d'une dissociation (Figure 5). Ces derniers résultats laissent supposer que la bande détectée à 350 kD est un complexe contenant le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et la protéine MAP1A, lequel complexe se dissocie partiellement en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol.

### 4.3.3 Interprétation

Nos résultats, bien que préliminaires, suggèrent la présence d'un complexe entre le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et la protéine associée au cytosquelette MAP1A dans du tissu neuronal. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus *in vitro* par Kroeze et Roth (2000), qui ont montré par la méthode de double hybride que la troisième boucle « intracellulaire » du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> interagit avec le domaine LC2 de la protéine MAP1A (Kroeze et Roth 2000). La co-localisation des deux protéines a aussi été démontrée après

co-transfection du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et d'une protéine fusion-LC2 dans les cellules HEK-293 (Kroeze et Roth 2000).

Les tentatives de co-immunoprécipitation de ce complexe, à partir de l'homogénat de cerveau ou de l'extrait de microtubules, se sont avérées non concluantes. Nos collaborateurs américains nous ont fait part des mêmes difficultés (Wes Kroeze, communication personnelle). Il se peut qu'un problème provenant de la stoechiométrie même du complexe soit à l'origine de cette difficulté. La MAP1A est une grosse protéine constituée de chaînes lourdes et légères (Langkopf et al., 1992 ; Mann et Hammarback 1994) et naturellement associée à plusieurs autres protéines (tubuline par exemple). Le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, par analogie aux autres RCPG, se trouverait en concentration relativement faible dans les tissus (Terrillon et Bouvier 2004), amenuisant d'autant les possibilités d'une immunoprécipitation du complexe avec les anticorps anti-récepteur. L'utilisation d'une approche biophysique *in vitro*, telle que le BRET (bioluminescence resonance energy transfer) ou le FRET (fluorescence resonance energy transfer ; Angers et al., 2000 ; Overton et Blumer 2000 ; Bouvier, 2001 ; Cornea et al., 2001) pourrait s'avérer plus concluante à cet égard.

L'ensemble des résultats de ces études biochimiques ainsi que les études moléculaires (Kroeze et Roth 2000), préliminaires apparaît compatible avec nos données immunocytochimiques sur la localisation subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le SNC et

hautement suggestif d'une association du récepteur avec le cytosquelette neuronal (Cornea-Hébert et al., 1999b, 2000, 2002).

## **Chapitre 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE**

Dans la discussion qui suit, nous aborderons les données de l'immunocytochimie aux trois niveaux d'organisation morphologique qu'elle permet d'analyser : régional, cellulaire et subcellulaire. À chaque niveau, nous ne reprendrons pas le détail des interprétations fonctionnelles attachées à chacune des observations, mais chercherons plutôt à dégager la signification générale et la portée des données par rapport aux connaissances antérieures sur le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>.

## **5.1 Topographie régionale**

### **5.1.1 Les apports de l'immunocytochimie**

La cartographie détaillée, en microscopie photonique, de la distribution anatomique du marquage immunocytochimique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans toutes les régions du système nerveux central du rat (Cornea-Hébert et al., 1996, 1999a), effectuée à l'aide de l'anticorps monoclonal en N-terminal produit par Wu (Wu et al., 1995, 1998), peut être considérée comme une contribution majeure à la connaissance de ce récepteur.

Dans toutes les régions identifiées auparavant comme contenant du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> par suite de l'autoradiographie de divers radioligands 5-HT<sub>2A</sub> (Pazos et al., 1985; Fichette et al., 1987; Appel et al., 1990; Lopez-Gimenez et al., 1997; Preece et al., 2004) et/ou de l'hybridation *in situ* de son ARNm (Mengod et al., 1990; Pompeiano et al., 1994; Wright et al. 1995; Cyr et al., 2000; Martin-Ruiz et al., 2001) nous avons visualisé le marquage immunocytochimique 5-HT<sub>2A</sub>

(Cornea-Hébert et al., 1996, 1999a), confirmant ainsi, *in situ*, la spécificité de l'anticorps utilisé.

Dans quelques régions, le marquage immunocytochimique a été beaucoup plus fort que l'on pouvait s'y attendre par suite des études d'autoradiographie des ligands et/ou d'hybridation *in situ*. C'est le cas du globus pallidus, du noyau entopedonculaire, de certains noyaux thalamiques et amygdaliens et du cortex cérébelleux. Une affinité relativement faible du récepteur et/ou une faible stabilité de son ARNm dans ces régions, voire même la dispersion des cellules qui en sont munies, pourraient rendre compte du faible signal obtenu en autoradiographie et en hybridation *in situ*.

Dans le cas du globus pallidus, nos résultats sont en accord avec une autre étude immunocytochimique subséquente utilisant deux autres anticorps anti-5HT<sub>2A</sub> (Bubser et al., 2001). Des études fonctionnelles impliquant le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans cette région restent à venir. Dans le thalamus et dans l'amygdale, des études électrophysiologiques avait déjà signalé la présence du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (Lakoski et Aghajanian 1985; Jakala et al., 1995; Wada et al., 1997) ce que corrobore nos résultats. En ce qui concerne le cortex cérébelleux, nos résultats ont été confirmés par deux études immunocytochimiques subséquentes, effectuées chez le rat, une utilisant le même anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> que nous (Geurts et al., 2002) et une autre, un anticorps anti-5-HT<sub>2A</sub> différent (Maeshima et al., 1998b). La présence du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le cortex cérébelleux a été également rapportée chez l'humain, par suite d'études de

radioliation, de PCR (*reverse-transcriptase polymerase chain reaction*) et d'immunocytochimie (Eastwood et al., 2001). Ce résultat est important pour les études de biodistribution du récepteur *in vivo* chez l'humain. Selon les premières études d'autoradiographie, le cervelet pouvait être considéré comme contenant des quantités négligeables de ce récepteur et donc comme une région de référence zéro (voir par exemple Peremans et al., 2002; Pinborg et al., 2003). Cependant, la présence significative du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le cervelet a été détectée lors d'une étude récente en tomographie par émission de positrons (TEP), qui met en question la validité de cette région de référence (Adams et al., 2004).

La description immunocytochimique a aussi permis de clarifier la répartition intra-laminaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans des régions comme le cortex cérébral, le bulbe olfactif ou l'hippocampe. Par exemple, dans le cortex cérébral, les données d'autoradiographie et de l'hybridation *in situ* ne s'accordaient pas sur les couches intermédiaires contenant de fortes densités de récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. En autoradiographie, plusieurs études avaient rapporté de fortes densités de sites de liaison dans la couche IV (Pazos et al., 1985; Appel et al., 1990; Preece et al., 2004) et d'autres dans la couche V (Lopez-Gimenez et al., 1997) du cortex fronto-pariétal. De même, en hybridation *in situ*, une première étude (Mengod et al., 1990) avait rapporté les plus fortes densités d'hybridation de l'ARNm dans la couche baptisée Va (couche frontière entre la couche IV et V) et des études subséquentes dans la couche IV ou V, en fonction de l'aire examinée (Pompeiano et al., 1994; Wright et



al., 1995). Il est important de faire la distinction entre un marquage de la couche IV et/ou de la couche V puisque la couche IV est enrichie en cellules granulaires et la couche V en cellules pyramidales (Zilles et Wree 1995). Or, toutes ces études s'entendaient sur un marquage intense dans le cortex frontal, où l'on sait que les cellules granulaires sont rares sinon inexistantes ! En fait, compte tenu des limites de résolution de l'autoradiographie sur film, tant pour la radiolisation que l'hybridation *in situ*, nos résultats laissent supposer que même dans le cortex pariétal, le marquage précédemment observé dans les couches moyennes du cortex représentait celui des dendrites apicales des cellules pyramidales de la couche V, dont la morphologie est aisément reconnaissable.

Bien que des cartographies aussi détaillées en immunocytochimie n'aient pas été effectuées pour les autres récepteurs à sérotonine, il est certain que, dans la plupart sinon toutes les régions où le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> a été localisé, d'autres sous-types de récepteurs à sérotonine sont présents (voir Tableau 1 du Chapitre 1). Ceci suggère que, dans une région donnée du SNC, la sérotonine puisse toujours agir sur plusieurs sous-types de récepteurs à la fois. De plus, chaque région semble dotée de sa propre combinaison de sous-types de récepteurs. Dans ces conditions, on peut se demander s'il est légitime de se questionner sur l'importance relative de chacun de ces sous-types de récepteur en particulier, avant même de connaître leur localisation et co-localisations respectives.

### **5.1.2 Corrélations anatomo-fonctionnelles de la distribution du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le SNC**

Selon les régions du SNC qui sont considérées, la littérature rapporte la participation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> à la régulation de divers états ou fonctions physiologiques. Par exemple : hypothalamus et fonctions endocriniennes (Zhang et al., 2002); noyau du tractus solitaire et fonctions autonomiques (Nosjean et al., 2002); motoneurones phréniques et récupération respiratoire (Basura et al., 2002); striatum et locomotion (Bishop et al., 2003). La distribution du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans des régions comme l'hippocampe, l'amygdale et le cortex cérébral est en accord avec plusieurs études récentes impliquant ce récepteur dans l'apprentissage et la mémoire (Buhot et al., 2000; Meneses 2002; Williams et al., 2002; de Quervian et al., 2003). La diversité des régions dans lesquelles le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> a été localisé suggère que ce récepteur serait utilisé dans la plupart des multiples fonctions physiologiques médiées par la sérotonine et par conséquent impliqué dans plusieurs conditions pathologiques impliquant des dysfonctions du système à sérotonine (Roth 1994; Barnes et Sharp 1999; Gaspar et al., 2003).

Jusqu'à maintenant, l'invalidation du gène du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> chez la souris s'est avérée compatible avec la croissance et la survie d'animaux en apparence bonne santé, sans déficit fonctionnel appréciable, ce qui montre à tout le moins que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (ainsi que d'autres récepteurs à sérotonine) n'est pas essentiel à la

survie (Gingrich et al., 1999; Bonasera et Tecott 2000). Si des anomalies neuro-comportementales existent chez ces souris, comme chez les *knockout* pour d'autres récepteurs de la sérotonine (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> et 5-HT<sub>5A</sub>), elles ne pourront qu'indiquer qu'un sous-type de récepteur individuel contribue à la modulation de voies neuronales multiples, en accord avec sa distribution relativement étendue (Bonasera et Tecott 2000).

Chez l'humain, des changements de densité du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans plusieurs régions cérébrales ont été rapportés pour des maladies psychiatriques et/ou neurodégénératives comme la schizophrénie (voir Dean 2003), la dépression majeure et le suicide (Mann 1999; Stockmeier 2003; Rosel et al., 2004), la maladie d'Alzheimer (Meltzer et al., 1999; Versijpt et al., 2003) et la maladie de Parkinson (Chen et al., 1998). On ignore cependant si les changements de densité du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> observés dans ces pathologies sont impliqués dans leur pathogenèse ou s'ils représentent ou font partie d'un mécanisme compensatoire.

Plusieurs études s'entendent toutefois sur une implication majeure du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans l'action des drogues psychostimulantes et psychothérapeutiques (voir Roth et al., 1999; Meltzer et al., 2003; Meltzer 2004), en accord avec la forte représentation de ce récepteur au niveau du cortex cérébral, la région du cerveau considérée comme leur zone cible (Meltzer 2004; Amargos-Bosch et al., 2004). Meltzer et coll. proposent qu'un effet antagoniste envers les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, associé ou non à un effet agoniste envers

les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> serait en grande partie responsable de l'action thérapeutique des antipsychotiques atypiques (Ichikawa et al., 2001; Meltzer 2004).

Les études électrophysiologiques rapportent une double action de la sérotonine dans le cortex préfrontal : une hyperpolarisation et une dépolarisation médiées principalement par les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et 5-HT<sub>2A</sub>, respectivement (Araneda et Andrade 1991; Martin-Ruiz et al., 2001; Amargos-Bosch et al., 2004). Cette réponse électrophysiologique serait due aux récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>1A</sub> co-localisés à 90% dans les mêmes cellules pyramidales, tel que démontré récemment par double marquage en hybridation *in situ* (Amargos-Bosch et al., 2004). Ces auteurs suggèrent qu'une ségrégation spatiale de ces récepteurs dans les différents compartiments du neurone pyramidal pourrait rendre compte de leur fonction propre.

### **5.1.3 Distribution du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le système de transmission sérotoninergique et relation probable avec la sérotonine elle-même**

La distribution topographique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, telle que révélée par l'immunocytochimie, montre que les régions 5-HT<sub>2A</sub> immunoréactives sont nombreuses et qu'elles sont constituées de neurones non sérotoninergiques. La région du raphé est en effet immunonégative, confirmant ainsi le caractère d'hétérorécepteur du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, déjà prédit par i) des études antérieures de radiolisation par suite de lésion cytotoxique des neurones sérotoninergiques (Fichette et al., 1987; Compan et al., 1998 a et b),

ii) l'étroite corrélation entre la distribution des sites de liaison et celle de l'ARNm du récepteur dans les diverses régions (Mengod et al., 1990; Pompeiano et al., 1994; Wright et al 1995), iii) des enregistrements intracellulaires *in vitro*, et/ou extracellulaires *in vivo* montrant que la 5-HT dépolarise les neurones pyramidaux du cortex cérébral via les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> selon un mécanisme post-synaptique (Araneda et Andrade 1991; Puig et al., 2003; Amargos-Bosch et al., 2004).

Par contre, nous avons noté que la distribution interrégionale ou laminaire de l'hétérorécepteur 5-HT<sub>2A</sub> ne correspond pas étroitement à la densité régionale et laminaire d'innervation sérotoninergique dans la plupart des régions du cerveau du rat (Steinbush 1981). Des études immunocytochimiques de double marquage en microscopie à fluorescence ont confirmé l'existence de cette disparité ou *mismatch* (Jansson et al., 1998, 2001a,b). Ce manque d'appariement entre les sites de relâche de la sérotonine et la distribution d'un de ses sous-types réceptoriels constitue un argument additionnel en faveur du caractère diffus de la neurotransmission à sérotonine, tel que proposé par Descarries et coll. dès 1975 (Descarries et al., 1975; Beaudet et Descarries 1976; 1978; Bunin et Wightman 1998).

Quel type de relation peut-on dès lors envisager entre le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et la sérotonine endogène ? Les données préliminaires que nous avons obtenues par suite de déplétion sévère par la PCPA suggèrent un parallèle entre la densité du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> (telle qu'évaluée par l'intensité relative du marquage immunocytochimique-5-HT<sub>2A</sub> ou une quantification de son ARNm) et la quantité de sérotonine présente dans

les neurones 5-HT et donc dans leur environnement (évaluée par l'intensité relative d'un marquage immunocytochimique-5-HT). Quand l'immunoréactivité (les niveaux) de sérotonine sont très bas, l'immunoréactivité 5-HT<sub>2A</sub> l'est aussi. Quand elle revient à la normale, il en va de même du récepteur.

Par ailleurs, des études électrophysiologiques récentes suggèrent que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> du cortex préfrontal est impliqué, avec le 5-HT<sub>1A</sub>, dans un circuit, cortex-raphé-cortex, de contrôle de la relâche de sérotonine dans le cortex. L'application de DOI dans le cortex préfrontal médial, augmente la relâche de sérotonine dans le cortex préfrontal médial lui-même, effet contré par l'antagoniste MDL 100 907 (Martin-Ruiz et al., 2001; Puig et al., 2003; Amargos-Bosch et al., 2004). L'effet du DOI serait dû à l'activation d'afférences pyramidales descendantes, agissant sur les neurones sérotoninergiques du raphé (Amargos-Bosch et al., 2004).

De plus, il est connu depuis longtemps que la régulation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est paradoxale (voir Sanders-Bush 1990). À la lumière de ces résultats, nous pouvons envisager une régulation réciproque entre les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> et la sérotonine endogène en accord avec l'hypothèse voulant que ce récepteur agisse en tant que détecteur neuronal du niveau ambiant de sérotonine dans le tissu nerveux (Cornea-Hébert et al., 1997).

## **5.2 Topographie cellulaire**

La cartographie immunocytochimique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> que nous avons effectuée, révèle que, dans le système nerveux central, la

localisation prédominante de ce récepteur est neuronale, somato-dendritique et axonale (axones myélinisés; Cornea-Hébert et al., 1996, 1999a). Nous n'avons pas noté de marquage glial significatif, sauf sur la glie radiaire de la moelle épinière. La localisation neuronale somato-dendritique prédominante du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> a été également rapportée par les autres études immunocytochimiques effectuées en parallèle ou subséquent, dans le cortex cérébral (Willins et al., 1997; Hamada et al., 1998; Jakab et Goldman-Rakic 1998, 2000; Xu et Pandey 2000; Jansson et al., 2001b; Miner et al., 2003; Li et al., 2004), le bulbe olfactif (Hamada et al., 1998; Yuan et al., 2003), le septum (Luttgen et al., 2004), le striatum (Rodriguez et al., 1999; Bubser et al., 2001), le cervelet (Maeshima et al., 1998b; Eastwood et al., 2001; Geurts et al., 2002), la substance grise périaqueducale (Griffiths et Lovick 2002), l'aire tégmentale ventrale (Doherty et Pickel 2000; Ikemoto et al., 2000; Rodriguez et al., 2000; Nocjar et al., 2002), le noyau moteur dorsal du vague (Fay et Kubin 2000; Huang et Pickel 2003), le noyau du tractus solitaire (Huang et Pickel 2002; Nosjean et al., 2002) et la moelle épinière (Maeshima et al., 1998a; Doly et al., 2004). Cette localisation neuronale somato-dendritique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> indique que la sérotonine médie principalement des effets post-synaptiques à travers ce sous-type.

Cependant, à la différence de nos résultats, une faible incidence de localisation immunocytochimique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans des axones non myélinisés et/ou des terminaisons axonales a été signalée dans certaines études en microscopie électronique du cortex préfrontal du

singe et du rat (Jakab et Goldman-Rackic 1998; Miner et al., 2003; voir plus loin).

### **5.2.1 Marquage dendritique intense mais non épineux**

Dans chacune des régions que nous avons examinées, nous avons constaté que l'intensité relative du marquage 5-HT<sub>2A</sub> des dendrites était toujours plus grande que celle des somata, suggérant une plus forte concentration du récepteur dans ces prolongements neuronaux (Cornea-Hébert et al., 1996, 1999a,b, 2002). Un tel marquage proéminent des dendrites avait aussi été noté par d'autres auteurs (Willins et al., 1997; Jakab et Goldman-Rakic 1998, Rodriguez et al., 1999; Doherty et Pickel 2000; Fay et Kubin 2000). Le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> jouerait donc un rôle important dans les dendrites. Willins a proposé un rôle clé du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> des dendrites apicales dans le traitement de l'information par les neurones corticaux (Willins et al., 1997). Jakab et Goldman-Rakic ont proposé que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> puisse participer au contrôle de la cinétique des courants électriques qui arrivent au corps cellulaire (Jakab et Goldman-Rakic 1998). En raison de la localisation principalement intracellulaire du récepteur, nous avons formulé une hypothèse plus générale voulant que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> puisse participer à un système de signalisation dendritique antérograde ou rétrograde, activé par la sérotonine (Cornea-Hébert et al., 1996, 1999a, 2002). Les trois hypothèses restent actuellement à vérifier. Cependant, une étude récente en immunocytochimie à fluorescence a montré qu'un pré-traitement avec la colchicine augmente le nombre de corps cellulaires immunoréactifs pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>



dans le septum et l'hippocampe indiquant que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> subit un transport axonal antérograde dépendant des microtubules, appuyant ainsi notre hypothèse (Luttgen et al., 2004).

L'absence de marquage des épines dendritiques dans plusieurs régions où les dendrites sont bien pourvues de ces sites de réception synaptique (cortex cérébral et piriforme, neostriatum et cervelet) est aussi en accord avec les résultats de plusieurs autres laboratoires, qui ont pris la peine de noter l'absence complète, ou le faible marquage de ces structures, dans le cortex cérébral du rat (Hamada et al., 1998) ou du singe (Jakab et Goldman-Rakic 1998) et le striatum du rat (Rodriguez et al., 1999). Miner et al. (2003) ont cependant rapporté un certain marquage à l'immunoperoxydase diffus du cou ou de la tête des épines dans certaines épines du cortex préfrontal chez le rat (~30 % de leur matériel). Quoi qu'il en soit, nous nous serions attendus à la présence de nombreuses épines fortement marquées dans nos spécimens, compte tenu de la haute densité d'immunoréactivité 5-HT<sub>2A</sub> que nous avons détectée dans les branches dendritiques apicales du cortex cérébral, par exemple. Cette absence notable de marquage des épines est venue renforcer l'idée d'une association du récepteur aux neurotubules et d'une fonction associée au transport des protéines et/ou métabolisme intra-dendritique, plutôt qu'à une signalisation membranaire pure.

### **5.2.2 Marquage axonal (axones myélinisés) non terminal**

Nos données sur l'absence de terminaisons axonales et/ou axones amyéliniques immunoréactifs pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le cortex

fronto-pariétal (Cornea-Hébert et al., 1996, 1999a, 2002) diffèrent des résultats rapportées par Jakab et Goldman-Rakic 1998 à l'effet de la présence « d'un groupe mineur de synapses asymétriques » dans le cortex préfrontal du singe. Quant à Miner et al., ils ont fait état d'une faible proportion du marquage (24% des profils marqués) sur des axones amyéliniques de type aminergique dans le cortex préfrontal du rat (Miner et al., 2003). La signification fonctionnelle d'une telle localisation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> reste encore à être déterminée.

Une première série d'études électrophysiologiques a suggéré que la sérotonine, par l'entremise du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, puisse augmenter la fréquence des potentiels post-synaptiques excitateurs spontanés (EPSPs) dans le neocortex par une modulation de la relâche du glutamate (Aghajanian et Marek 1997, 1999b; Marek et Aghajanian 1998, 1999). Deux mécanismes potentiels ont été proposés pour expliquer cet effet : i) la présence des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> sur des afférences excitatrices d'origine intra-corticale, thalamique ou amygdalienne ou ii) un signal rétrograde résultant de l'activation des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> post-synaptiques sur les épines dendritiques (Aghajanian et Marek 1997, 1999b; Marek et Aghajanian 1998; 1999). En ce qui concerne le substrat morphologique de ces hypothèses, il ne saurait être constituée du petit nombre de synapses asymétriques rapporté par Jakab et Goldman-Rakic, ni par les quelques axones amyéliniques décrits par Miner et al., encore moins par la quasi-absence de marquage 5-HT<sub>2A</sub> sur les épines dendritiques dans les cellules pyramidales du neocortex (Jakab et Goldman-Rakic 1998;

Miner et al., 2003). La modulation de la relâche du glutamate par la sérotonine, via les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, dans le cortex cérébral, se ferait donc plutôt par un autre mécanisme impliquant les nombreux récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> localisés dans les somata/dendrites des neurones pyramidaux et/ou certains interneurons.

Par ailleurs, une deuxième série d'études électrophysiologiques effectuée par l'équipe d'Artigas, a montré que les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> du cortex préfrontal sont impliqués dans la relâche de la sérotonine dans cette région du cerveau, un effet qui s'expliquerait par une augmentation de la relâche du glutamate. Ces résultats ont été interprétés comme étant dûs à la présence des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> sur les neurones pyramidaux qui projettent au raphé (Martin-Ruiz et al., 2001; Bortolozzi et al., 2003; Puig et al., 2003; Amargos-Bosch et al., 2004). Ils fournissent une démonstration fonctionnelle de la localisation somatodendritique et non terminale des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, du moins dans le cortex cérébral, où la majorité de ces récepteurs se retrouve sur les cellules pyramidales et une minorité sur les interneurons.

Certaines de nos observations en microscopie photonique et électronique ayant montré la présence de récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans des axones myélinisés en provenance des régions contenant les neurones marqués, nous ont conduit à nous demander si le récepteur serait retrouvé dans les terminaisons de ces axones. L'examen en microscopie électronique de la couche II du cortex piriforme, zone de projection du tractus olfactif latéral (lot), avait précisément pour but de répondre à cette question. Nous n'avons alors trouvé aucun marquage significatif

des terminaisons dans cette région, même dans du matériel marqué à la diaminobenzidine (observations non publiées), laissant supposer que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, bien que présent dans ces axones myélinisés, ne se rend pas en quantité appréciable jusque dans leurs arborisations terminales. La signification de cette localisation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> aux axones myélinisés reste à déterminer mais s'avère certes compatible avec l'hypothèse d'une participation du récepteur à un système de signalisation antérograde ou rétrograde activé par la sérotonine (Cornea-Hébert et al., 1996, 1999a, 2002).

### **5.3 Topographie subcellulaire**

#### **5.3.1 Le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est majoritairement intracytoplasmique**

Compte-tenu de la localisation à forte prédominance intracellulaire que nous avons documentée pour le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les dendrites du cortex cérébral, nous avons dû nous interroger sur la signification d'une telle distribution dans le cas d'un RCPG. Une première hypothèse était que la fraction majoritairement cytoplasmique observée ne représente qu'une forme immature du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Il faut cependant souligner que, des trois anticorps que nous avons pu utiliser, deux étaient dirigés contre des épitopes différents en N-terminal et un contre des épitopes en C-terminal. Les résultats quantifiés du marquage obtenu avec chacun des anticorps ont été quasiment identiques, suggérant un marquage des formes prédominantes du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Le marquage avec l'anticorps

dirigé contre le segment en C-terminal est important, car il écarte la possibilité d'un marquage confiné à la forme précurseur. En effet, la synthèse des protéines dans la cellule débute en N-terminal et se termine en C-terminal (Voet et Voet 1998). Lorsque l'on visualise la protéine via son segment C-terminal, il est probable que sa synthèse est achevée. De plus, aucun des anticorps ne nous a montré un marquage significatif des différents sites de synthèse ou de dégradation protéique, comme le réticulum endoplasmique, le Golgi ou les endosomes, ce qui diminue fortement la possibilité d'un marquage en cours de synthèse et/ou de dégradation. Le marquage était parsemé sur et entre les neurotubules, indiquant qu'une forte proportion du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> pourrait être constituée soit de récepteur en cours de transport soit de récepteur ayant une fonction à déterminer sur les neurotubules, soit les deux.

L'étude très récente de Doly et al. (2004) semble, à première vue, contredire nos résultats. Ces auteurs décrivent un marquage immunocytochimique 5-HT<sub>2A</sub> à prédominance membranaire dans la moelle épinière, mais ajoutent que des « cell bodies or dendrites were frequently entirely decorated by the peroxidase product ». Dans leur examen préliminaire d'un échantillon de cortex cérébral, ils rapportent que : « the peroxidase reaction product highlighted a large surface of the plasma membrane. Other dendrites showed in addition to plasma membrane labeling an important intracellular staining localized on neurotubules ». La raison de l'hétérogénéité de ce marquage reste à être comprise. L'anticorps utilisé dans l'étude de Doly et al. a été produit,

par la compagnie Dia Sorin contre la même séquence en N-terminal que l'un des trois anticorps utilisés dans notre étude quantitative (l'anticorps produit par le laboratoire du Dr Roth). On retiendra de cette étude qu'un marquage intracellulaire important est fréquemment présent dans des corps cellulaires et dendrites de la moelle épinière et du cortex cérébral, de même que la possibilité d'un marquage, à l'immunoperoxydase, de la faible fraction du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> présent sur la membrane.

La localisation majoritairement intracytoplasmique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est aussi étayée par des résultats biochimiques. Une étude récente sur des neurones pyramidaux en culture a montré par microscopie confocale que seulement une faible proportion des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> liait le marqueur des protéines membranaires glycosylées, WGA (*wheat germ agglutinin*), suggérant que la majorité du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> soit située dans le compartiment intracellulaire (Xia et al., 2003b). Une autre étude d'immunobuvardage de tissu humain a montré que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est plus abondant dans une fraction cytosolique que membranaire (Eastwood et al., 2001). Cette localisation à prédominance intracytoplasmique semble donc une caractéristique avérée du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et pose le problème de son fonctionnement et de sa régulation.

Se pourrait-il que, à l'état physiologique, le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> soit internalisé en permanence sous une action tonique de la sérotonine normalement présente dans l'espace extracellulaire ? Le fait que la déplétion sévère de la sérotonine par la PCPA n'ait pas été

accompagnée d'une redistribution subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> entre les compartiments membranaire et cytoplasmique va à l'encontre de cette possibilité. Cependant, on retiendra que la densité totale du récepteur s'en est trouvée abaissée (avec une augmentation de son ARNm), laissant croire que des changements de densité puissent caractériser son fonctionnement. À cet égard, Willins et al. (1999) ont rapporté, en microscopie à fluorescence confocale, qu'une diminution de l'immunoréactivité du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> des dendrites apicales du cortex préfrontal, avec augmentation dans les corps cellulaires, survient par suite à un traitement chronique avec les antipsychotiques atypiques (Willins et al., 1999).

### **5.3.2 Localisation subcellulaire similaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et de la protéine MAP1A**

La co-localisation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et de la protéine MAP1A dans les dendrites (*dendritic shaft*) corticales, et leur distribution subcellulaire similaire, telles que démontrées par nous, suggèrent l'existence d'interactions fonctionnelles entre ces deux protéines *in vivo*. La co-localisation du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> avec la protéine MAP1A a été confirmée récemment dans le cortex à barillets, par microscopie à immunofluorescence confocale (Touri et al., 2004). De plus, nos résultats biochimiques préliminaires sont compatibles avec une interaction physique entre le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et la protéine MAP1A, telle que suggérée par les résultats en double hybride (Kroeze et al., 1999; Kroeze et Roth, 2000). L'interaction du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> avec la protéine MAP1A dans les dendrites corticales pourrait également

expliquer l'absence de récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> dans les épines dendritiques et/ou terminaisons axonales, car ces structures ne contiennent pas la protéine MAP1A (voir Kaech et al., 2001).

La MAP1A est une protéine neurotubulaire de haut poids moléculaire, qui joue un rôle important dans la détermination de la morphologie neuronale au cours de développement et l'équilibre entre la plasticité et la stabilité des neurites dans les neurones matures (Vaillant et al., 1998; Matus 1990; Müller et al., 1994; Noiges et al., 2002). Il a été montré que la MAP1A est impliquée aussi dans l'attachement de certaines molécules au cytosquelette, comme la protéine PSD-93 (*postsynaptic density-93*), une guanylate kinase associée à la membrane (Brenman et al., 1998). La MAP1A fait également partie d'un complexe ribonucléoprotéique contribuant à l'attachement des ARNm au cytosquelette (DeFranco et al., 1998).

Il est connu que la sérotonine est impliquée dans des fonctions morphogéniques, comme l'élaboration des arborisations dendritiques et axonales, le bourgeonnement terminal et la survie neuronale, fonctions sans doute médiées par un ou plusieurs de ses récepteurs (Dooley et al., 1997; Azmitia 2001).

On peut s'interroger sur la signification biologique d'une interaction entre un neurorécepteur et une protéine neurotubulaire. Une telle interaction suggère un rôle dans la plasticité neuronale, non seulement au cours du développement mais aussi chez l'adulte. L'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et MAP1A pourrait sous-tendre une implication du récepteur dans la plasticité du cytosquelette



microtubulaire des dendrites et des axones, laquelle, selon Kaech et al., 2001, serait relativement lente et stable comparativement à celle dépendant d'une liaison au cytosquelette d'actine, laquelle se retrouverait préférentiellement dans les épines dendritiques et mettrait en jeu des processus plus dynamiques.

### **5.3.3 Le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est plus concentré au niveau des dendrites distales**

Un autre résultat original de ce travail a été la démonstration d'une plus forte concentration du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les dendrites distales que proximales. À notre connaissance, c'est la première fois que l'on constate qu'un récepteur métabotrope est distribué de façon non uniforme le long des dendrites, tout comme la protéine MAP1A d'ailleurs. Ceci indique que ce récepteur est dirigé vers le compartiment dendritique pour y être concentré dans les petites branches dendritiques. Une étude récente sur les neurones pyramidaux en culture indique que les récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> sont ciblés vers le compartiment dendritique en interagissant avec le domaine PDZ de la protéine PSD-95 (Xia et al., 2003b). Un tel mécanisme pourrait rendre compte de la localisation dendritique à prédominance distale du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> mais aussi d'autres récepteurs métabotropes abondamment dotés de ce motif de reconnaissance des domaines PDZ dans leur séquence (Kornau et al., 1995; Hamblin et al., 1998).

Une telle compartimentation subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans les dendrites corticales suggère un rôle important de ce récepteur dans l'excitabilité dendritique. De plus, la plus forte concentration du

récepteur 5-HT<sub>2A</sub> et de la protéine MAP1A au sein des petites dendrites renforce l'idée d'une implication de ce récepteur dans l'organisation du cytosquelette microtubulaire des dendrites, qui pourrait être ainsi régulé par la sérotonine.

#### **5.4 Conclusion générale**

Les données rapportées dans cette thèse ont permis de préciser et de compléter les connaissances actuelles sur la distribution cellulaire et surtout subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans le SNC.

La distribution de ce récepteur de la sérotonine dans de très nombreuses régions cérébrales et sa localisation à prédominance intracellulaire dans les dendrites pourrait sous-tendre un (des) rôle(s) commun(s) à toutes ces régions. Son activation pourrait moduler non seulement l'excitabilité de la cellule, mais aussi entraîner des changements intracellulaires de plus longue durée. Sa compartimentation sur le cytosquelette microtubulaire et sa concentration plus forte dans les petites dendrites, suggère que ce sous-type de récepteur puisse médier des fonctions morphogéniques particulières de la sérotonine dans le cerveau, non seulement au cours de développement (Azmitia 2001; Gaspar et al., 2003) mais aussi chez l'adulte.

Ces données soulèvent cependant plusieurs questions en rapport avec les rôles et les modalités de fonctionnement attribués au récepteur 5-HT<sub>2A</sub>.

Dans les années 1990, les nombreuses données pharmacologiques, électrophysiologiques et comportementales sur le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> ont

conduit J.E. Leysen à suggérer que le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> soit peu ou pas utilisé en condition physiologique et que son activation répétée ou prolongée soit responsable d'états pathologiques (Leysen 1992). La localisation à prédominance intraneuronale du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> soulève aussi des questions sur son mode d'activation : la faible proportion du récepteur associée à la membrane est-elle responsable des caractéristiques de cette activation? Celle-ci est-elle secondaire à l'activation d'un autre récepteur de la sérotonine co-localisé sur les mêmes neurones?

De nombreuses études pharmacologiques ont impliqué le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dans l'action thérapeutique des antipsychotiques atypiques. Sous l'action de la clozapine notamment, Willins et coll. (1997) ont décrit chez le rat un déplacement du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> à partir des dendrites apicales vers le corps cellulaire des cellules pyramidales du cortex. On peut donc se demander si l'association du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> aux neurotubules contribue à son fonctionnement, notamment lors de l'action des antipsychotiques atypiques et si un éventuel transport antérograde ou rétrograde intervient dans ces conditions?

Chose certaine, quelles que soient les réponses que l'avenir apporte à ces questions, celles-ci devront tenir compte des données que nous avons mis à jour sur la localisation anatomique, cellulaire et subcellulaire du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>.

## **Chapitre 6 : BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE**

- Adams K.H., Pinborg L.H., Svarer C., Hasselbalch S.G., Holm S., Haugbol S., Madsen K., Frokjaer V., Martiny L., Paulson O.B. and Knudsen G.M. (2004) A database of [18F]-altaserin binding to 5-HT<sub>2A</sub> receptors in normal volunteers: normative data and relationship to physiological and demographic variables. *NeuroImage* 21 : 1105-1113.
- Adell A., Celada P. and Artigas F. (2001) The role of 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the regulation of serotonin cell firing and release in the rat brain. *J Neurochem* 79 : 172-182.
- Adham N., Kao H.-T., Schechter L.E., Bard J., Olsen M., Urquhart D., Durkin M., Hartig P.R., Weinshank R.L. and Branchek T. (1993) Cloning of another human serotonin receptor (5-HT<sub>1F</sub>): A fifth 5-HT<sub>1</sub> receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci, USA* 90 : 408-412.
- Aghajanian G.K. and Bloom F.E. (1967) Localization of tritiated serotonin in rat brain by electron microscopic autoradiography. *J Pharmacol Exp Ther* 156 : 23-30.
- Aghajanian G.K. and Marek G.J. (1997) Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. *Neuropharmacology* 36 : 589-599.
- Aghajanian G.K. and Marek G.J. (1999a) Serotonin and hallucinogens. *Neuropsychopharmacology* 21 : 16S-23S.
- Aghajanian G.K. and Marek G.J. (1999b) Serotonin, via 5-HT<sub>2A</sub> receptors, increases EPSCs in layer V pyramidal cells of prefrontal

cortex by an asynchronous mode of glutamate release. *Brain Res* 825 : 161-171.

Aghajanian G.K. and Marek G.J. (2000) Serotonin model of Schizophrenia : emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res Rev* 31 : 302-312.

Aghajanian G.K., Bloom F.E., Lowell R., Sheard M. and Freedman D.E. (1966) The uptake of 5-hydroxytryptamine-<sup>3</sup>H from the cerebral ventricles : autoradiographic localization. *Biochem Pharmacol* 15 : 1401-1403.

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* 25 : 3389-33409.

Amargos-Bosch M., Bortolozzi A., Puig M.V., Serrats J., Adell A., Celada P., Toth M., Mengod G. and Artigas F. (2004) Co-expression and *in vivo* interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cerebral Cortex* 14 : 281-299.

Angers S., Salahpour A., Joly E., Hilairret S., Chelsky D., Dennis M. and Bouvier M. (2000) Detection of  $\beta$ 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 3684-3689.

Anji A., Kumari M., Sullivan Hanley N.R., Bryan G.L. and Hensler J.G. (2000) Regulation of 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA levels and binding

sites in rat frontal cortex by the agonist DOI and the antagonist mianserin. *Neuropharmacology* 39 : 1996-2005.

Anji A., Sullivan Hanley N.R., Kumari M. and Hensler J.G. (2001) The role of protein kinase C in the regulation of serotonin-2A receptor expression. *J Neurochem* 77: 589-597.

Appel N.M., Mitchell Wm.M., Garlick R.K., Glennon R.A., Teitler M., and DeSouza E.B. (1990) Autoradiographic characterization of ( $\pm$ )-1-(2,5-dimethoxy-4-[ $^{125}$ I]iodophenyl)-2-aminopropane ([ $^{125}$ I]DOI) binding to 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1C</sub> receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 255:843-857.

Araneda R. and Andrade R. (1991) 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub> and 5-Hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40 : 399-412.

Araneda S., Magoul R. and Calas A. (1989) Tracing specific transmitter pathways in the rat CNS : combination of [ $^3$ H]serotonin retrograde labelling with immunocytochemical detection of endogenous transmitters. *J Neurosci Meth* 30 :211-218.

Ashby C.R., Jiang L.H., Kasser R.J. and Wang R.Y. (1990) Electrophysiological characterization of 5-hydroxytryptamine-2 receptors in the rat medial prefrontal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 252 : 171-178.

Ashby C.R., Edwards E. and Wang R.Y. (1994) Electrophysiological evidence for a functional interaction between 5-HT<sub>1A</sub> and

5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat medial prefrontal cortex: An iontophoretic study. *Synapse* 17 : 173-181.

Audet M.A., Descarries L. and Doucet G. (1989) Quantified regional and laminar distribution of the serotonin innervation in the anterior half of adult rat cerebral cortex. *J Chem Neuroanat* 2 : 29-44.

Azmitia E.C. (2001) Modern views on an ancient chemical : serotonin effects on cell proliferation, maturation and apoptosis. *Brain Res Bull* 56 : 413-424.

Azmitia E.C. and Gannon P.J. (1986) The primate serotonergic system : a review of human and animal studies and a report on *Macaca fascicularis*. *Adv Neurol* 43 : 407-468.

Baldwin J.M. (1994) Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6 : 180-190.

Bancila M., Verge D., Rampin O., Backstrom J.R., Sanders-Bush E., Mckenna K.E., Marson L., Calas A. and Giuliano F. (1999) 5-Hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptors on spinal neurons controlling penile erection in the rat. *Neuroscience* 92 : 1523-1537.

Barnes N.M. and Sharp T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38 : 1083-1152.

Basura G.J., Nantwi K.D. and Goshgarian H.G. (2002) Theophylline-induced respiratory recovery following cervical spinal cord hemisection is augmented by serotonin 2 receptor stimulation. *Brain Res* 956 : 1-13.



- Battaglia G., Shannon M. and Titeler M. (1984) Guanyl nucleotide and divalent cation regulation of cortical S<sub>2</sub> serotonin receptors. *J Neurochem* 43 : 1213-1219.
- Beaudet A. and Descarries L. (1976) Quantitative data on serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* 111 : 301-309.
- Beaudet A. and Descarries L. (1978) The monoamine innervation of rat cerebral cortex: synaptic and nonsynaptic axon terminals. *Neuroscience* 3 : 851-860.
- Beaudet A. and Sotelo C. (1981) Synaptic remodeling of serotonin axon terminals in rat agranular cerebellum. *Brain Res* 206 : 305-329.
- Beaudet A., Dournaud P. and Boudin H. (1998) Complementarity of radioautographic and immunohistochemical techniques for localizing neuroreceptors at the light and electron microscopy level. *Braz J Med Biol Res* 31 : 215-223.
- Bécamel C., Figge A., Poliak S., Dumuis A., Peles E., Bockaert J., Lubbert H. and Ullmer C. (2001) Interaction of serotonin 5-Hydroxytryptamine type 2C receptors with PDZ10 of the multi-PDZ domain protein MUPP1\*. *J Biol Chem* 276 :12974-12982.
- Bécamel C., Gavarini S., Chanrion B., Alonso G., Galeotti N., Dumuis A., Bockaert J. and Marin P. (2004) The serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors interact with specific sets of PDZ proteins. *J Biol Chem* 279 :20257-20266.
- Bender E., Pindon A., van Oers I., Zhang Y-B., Gommeren W., Verhasselt P., Jurzak M., Leysen J. and Luyten W. (2000)

Structure of the human serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor gene and cloning of a novel 5-HT<sub>4</sub> splice variant. *J Neurochem* 74 : 478-489.

Berry, S.A., M.C. Shah, N. Khan, and B.L. Roth (1996) Rapid agonist-induced internalization of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor occurs via the endosome pathway *in vitro*. *Mol Pharmacol* 50 : 306-313.

Bhatnagar A., Willins D.L., Gray J.A., Woods J., Benovic J.L. and Roth B.L. (2001) The dynamin-dependent, arrestin-independent internalization of 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT<sub>2A</sub>) serotonin receptors reveals differential sorting of arrestins and 5-HT<sub>2A</sub> receptors during endocytosis. *J Biol Chem* 276 : 8269-8277.

Bhattacharyya S., Puri S., Miledi R. and Panicker M. (2002) Internalization and recycling of 5-HT<sub>2A</sub> receptors activated by serotonin and protein kinase C-mediated mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 14470-14475.

Bishop C., Kamdar D.P. and Walker P.D. (2003) Intrastratial serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors mediate dopamine D<sub>1</sub>-induced hyperlocomotion in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Synapse* 50 : 164-170.

Blackshear M.A., Martin L.L. and Sanders-Bush E. (1986) Adaptive changes in the 5-HT<sub>2</sub>-binding site after chronic administration of agonists and antagonists. *Neuropharmacology* 25 :1267-1271.

Blier P., Pineyro G., El Mansari M., Bergeron R. and de Montigny C. (1998) Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Ann N Y Acad Sci* 861 : 204-216.

- Boess F.G., Beroukhim R. and Martin I.L. (1995) Ultrastructure of the 5-hydroxytryptamine 3 receptor. *J Neurochem* 64 : 1401-1405.
- Bokaert J., Claeysen S., Sebben M. and Dumius A. (1998) 5-HT<sub>4</sub> receptors : gene, transduction and effects on olfactory memory. *Ann N Y Acad Sci* 861 : 1-15.
- Bonasera S.J. and Tecott L.H. (2000) Mouse models of serotonin receptor function : toward a genetic dissection of serotonin systems. *Pharmacol Ther* 88 : 133-142.
- Bonaventure P., Langlois X., and Leysen J.E. (1998) Co-localization of 5-HT<sub>1B</sub>- and 5-HT<sub>1D</sub> receptor mRNA in serotonergic cell bodies in guinea pig dorsal raphe nucleus : a double labeling in situ hybridization histochemistry study. *Neurosci Lett* 254 :113-116.
- Bortolozzi A., Amargos-Bosch M., Adell A., Diaz-Mataix L., Serrats J., Pons S. and Artigas F. (2003) *In vivo* modulation of 5-hydroxytryptamine release in mouse prefrontal cortex by local 5-HT<sub>2A</sub> receptors : effect of antipsychotic drugs. *Eur J Neurosci* : 18 : 1235-1246.
- Bortolozzi A., Amargos-Bosch M., Toth M., Artigas F. and Adell A. (2004) *In vivo* efflux of serotonin in the dorsal raphe nucleus of 5-HT<sub>1A</sub> receptor knockout mice. *J Neurochem* 88 : 1373-1379.
- Bouvier M. (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nature Rev Neurosci* 2 : 274-286.
- Brailov I., Bancila M., Brisorgueil M.-J., Miquel M.-C., Hamon M. and Verge D. (2000) Localization of 5-HT<sub>6</sub> receptors at the plasma

membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res* 872 : 271-275.

Branchek T., Adham N., Macchi M., Kao H.-T. and Hartig P.R. (1990) [<sup>3</sup>H]-DOB (4-bromo-2,5-dimethoxyphenylisopropylamine) and [<sup>3</sup>H]-Ketanserin label two affinity states of the cloned human 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptor. *Mol Pharmacol* 38 : 604-609.

Branchek T. A. and Blackburn T.P. (2000) 5-HT<sub>6</sub> receptors as emerging targets for drug discovery. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40 : 319-334.

Brenman J.E., Topinka J.R., Cooper E.C., McGee A.W., Rosen J., Milroy T., Ralston H.J. and Bretz D.S. (1998) Localization of postsynaptic density-93 to dendritic microtubules and interaction with microtubule-associated protein 1A. *J Neurosci* 18 : 8805-8813.

Bubser M., Backstrom J.R., Sanders-Bush E., Roth B.L. and Deutch A.Y. (2001) Distribution of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in afferents of the rat striatum. *Synapse* 39 : 297-304.

Buckholtz N.S., Zhou D.F. and Freedman D.X. (1988) Serotonin<sub>2</sub> agonist administration down-regulates rat brain serotonin<sub>2</sub> receptors. *Life Sci* 42 : 2439-2445.

Buhot M.C., Martin S. and Segu L. (2000) Role of serotonin in memory impairment. *Ann Med* 32 : 210-221.

Bunin M.A. and Wightman R.M. (1998) Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (Serotonin) neuronal release and uptake : an

investigation of extrasynaptic transmission. *J Neurosci* 18 : 4854-4860.

- Burnet P.W.J., Michelson D., Smith M.A., Gold P.W. and Sternberg E.M. (1994) The effect of chronic imipramine administration on the densities of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors and the abundancies of 5-HT receptor and transporter mRNA in the cortex, hippocampus and dorsal raphe of three strains of rat. *Brain Res* 638 : 311-324.
- Burns C.M., Chu H., Rueter S.M., Hutchinson L.K., Canton H., Sanders-Bush E. and Emeson R.B. (1997) Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* 387 : 303-308.
- Butler M.O., Morinobu S. and Duman R.S. (1993) Chronic electroconvulsive seizures increase the expression of serotonin<sub>2</sub> receptor mRNA in rat frontal cortex. *J Neurochem* 61 : 1270-1276.
- Calas A., Alonso G., Arnauld E. and Vincent J.D. (1974) Demonstration of indolaminergic fibres in the media eminence of the duck, rat and monkey. *Nature* 250 : 241-243.
- Canton H., Emeson R.B., Barker E.L., Backstrom J.R., Lu J.T., Chang M.S. and Sanders-Bush E. (1996) Identification, molecular cloning and distribution of a short variant of the 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor produced by alternative splicing. *Mol Pharmacol* 50 : 799-807.
- Chalmers D.T. and Watson S.J. (1991) Comparative anatomical distribution of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA and 5-HT<sub>1A</sub> binding in rat

brain – a combined *in situ* hybridisation/*in vitro* receptor autoradiographic study. *Brain Res* 561 : 51-60.

Chan J., Aoki C. and Pickel V.M. (1990) Optimization of differential immunogold-silver and peroxidase labeling with maintenance of ultrastructure in brain sections before plastic embedding. *J Neurosci Methods* 33 :113-127.

Chan-Palay V. (1976) Serotonin axons of the supra- and subependymal plexuses and in the leptomeninges : their roles in local alterations of cerebrospinal fluid and vasomotor activity. *Brain Res* 102 : 103-130.

Chen C.P.L-H., Alder J.T., Bray L., Kingsburry A.E., Francis P.T. and Foster O.J.F. (1998) Post-synaptic 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors are increased in Parkinson's disease neocortex. *Ann N Y Acad Sci* 861 : 288-289.

Claeyssen S., Sebben M., Becamel C., Bockaert J. and Dumius A. (1999) Novel brain-specific 5-HT<sub>4</sub> receptor splice variants show marked constitutive activity : role of the C-terminal intracellular domain. *Mol Pharmacol* 55 : 910-920.

Compan V., Daszuta A., Salin P., Sebben M., Bockaert J. and Dumius A. (1996) Lesion study of the distribution of serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptors in rat basal ganglia and hippocampus. *Eur J Neurosci* 8 : 2591-2598.

Compan V., Segu L., Buhot M.C. and Daszuta A. (1998a) Selective increases in serotonin 5-HT<sub>1B/1D</sub> and 5-HT<sub>2A/2C</sub> binding sites in

adult rat basal ganglia following lesions of serotonergic neurons.  
Brain Res 793 : 103-111.

Compan V., Segu L., Buhot M.C. and Daszuta A. (1998b) Differential effects of serotonin (5-HT) lesions and synthesis blockade on neuropeptide-Y immunoreactivity and 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B/1D</sub> and 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor binding sites in the rat cerebral cortex. Brain Res 795 :264-276.

Conn P.J. and Sanders-Bush E. (1986) Regulation of serotonin-stimulated phosphoinositide hydrolysis : relation to the serotonin 5-HT<sub>2</sub> binding site. J Neurosci 6 : 3669-3675.

Cornea A., Janovick J.A., Maya-Nunez G. and Conn P.M. (2001) Gonadotropin-releasing hormone receptor microaggregation. Rate monitored by fluorescence resonance energy transfer. J Biol Chem 276 : 2153-2158.

Cornea-Hébert V., Riad M., Zerari F., Garcia S., Descarries L., Wu C. and Singh S. (1996) Cellular mapping of 5-HT<sub>2A</sub> receptor protein in adult rat CNS. Soc Neurosci Abstr 22:1775.

Cornea-Hébert V., Vermette S., Garcia S., Laprade N., Wu C., Soghomonian J.-J. and Descarries L. (1997) Serotonin depletion by PCPA lowers 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactivity but increases its mRNA levels in adult rat brain. Soc Neurosci Abstr 23:971.

Cornea-Hébert V., Riad M., Wu C., Singh S.K. and Descarries L. (1999a) Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system of adult rat. J Comp Neurol 409 : 187-209.

- Cornea-Hébert V., Watkins K.C., Willins D.L., Roth B. and Descarries L. (1999b) Intracellular distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor in rat cortical neurons. *Soc Neurosci Abstr* 25:1204.
- Cornea-Hébert V., Watkins K.C., Bélanger D., Abi Farah C., Leclerc N. and Descarries L. (2000) Association of 5-HT<sub>2A</sub> receptor to the microtubule protein MAP1A in cortical dendrites of adult rat. *Soc Neurosci Abstr* 26: 1428.
- Cornea-Hébert V., Watkins K.C., Roth B., Kroeze W.K., Gaudreau P., Leclerc N. and Descarries L. (2002) Similar ultrastructural distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor and microtubule-associated protein MAP1A in cortical dendrites of adult rat. *Neuroscience* 113 : 23-35.
- Cyr M., Landry M. and Di Paolo T. (2000) Modulation by estrogen-receptor directed drugs of 5-hydroxytryptamine-2A receptors in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 23 : 69-78.
- Dahlström A. and Fuxe K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20 : 398-399.
- Davies M.F., Deisz R.A., Prince D. A. and Peroutka S.J. (1987) Two distinct effects of 5-hydroxytryptamine on cortical neurons. *Brain Res* 423 : 347-352.
- Davies P.A., Pistis M., Hanna M.C., Peters J.A., Lambert J.J., Hales T.G. and Kirkness E.F. (1999) The 5-HT<sub>3B</sub> subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397 : 359-363.
- Dean B. (2003) The cortical serotonin<sub>2A</sub> receptor and the pathology of schizophrenia : a likely accomplice. *J Neurochem* 85 : 1-13.



- DeFranco C., Chicurel M.E. and Potter H. (1998) A general RNA-binding protein complex that includes the cytoskeleton-associated protein MAP1A. *Mol Biol Cell* 9 : 1695-1708.
- DeFelipe J. and Jones E.G. (1988) A light and electron microscopic study of serotonin-immunoreactive fibers and terminals in the monkey sensory-motor cortex. *Exp Brain Res* 71 : 171-182.
- Descarries L. and Beaudet A. (1978) The serotonin innervation of adult rat hypothalamus. In J.D. Vincent and C. Kordon (eds) : *Biologie cellulaire des processus neurosecrétaires hypothalamiques. Cell biology of hypothalamic neurosecretion*, vol 280. Coll Internat C.N.R.S., Paris, pp. 135-153.
- Descarries L., Beaudet A. and Watkins K.C. (1975) Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res* 100 : 563-588.
- de Quervian D. J-F., Henke K., Aerni A., Coluccia D., Wollmer M.A., Hock C., Nitsch R.M. and Papassotiropoulos A. (2003) A functional genetic variation of the 5-HT<sub>2a</sub> receptor affects human memory. *Nature Neurosci* 6 : 1141-1142.
- Dewar K.M., Grondin L., Carli M., Lima L. and Reader T.A. (1992) [<sup>3</sup>H]Paroxetine binding and serotonin content of rat cortical areas, hippocampus, neostriatum, ventral mesencephalic tegmentum, and midbrain raphe nuclei region following *p*-chlorophenylalanine and *p*-chloroamphetamine treatment. *J Neurochem* 58 : 250-257.

- Doherty M.D. and Pickel V.M. (2000) Ultrastructural localization of the serotonin 2A receptor in dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 864 : 176-185.
- Doly S., Madeira A., Fischer J., Brisorgueil M.-J., Daval G., Bernard R., Vergé D. and Conrath M. (2004) The 5-HT<sub>2A</sub> receptor is widely distributed in the rat spinal cord and mainly localized at the plasma membrane of postsynaptic neurons. *J Comp Neurol* 472 : 496-511.
- Dooley A.E., Pappas I.S. and Parnavelas J.G. (1997) Serotonin promotes the survival of cortical glutamatergic neurons *in vitro*. *Exp Neurol* 148 : 205-214.
- Doucet E., Pohl M., Fattaccini C.M., Adrien J., El Mestikawy S.E. and Hamon M. (1995) *In situ* hybridization evidence for the synthesis of 5-HT<sub>1B</sub> receptor in serotonergic neurons of anterior raphe nuclei in the rat brain. *Synapse* 19 : 18-28.
- Dournaud, P., H. Boudin, A. Schonbrunn, G.S. Tannenbaum, and A. Beaudet (1998) Interrelationships between somatostatin sst<sub>2A</sub> receptors and somatostatin-containing axons in rat brain: evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin. *J Neurosci* 18 : 1-16.
- Eastwood S.L., Burnet P.W.J., Gittins R., Baker K. and Harrison P.J. (2001) Expression of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the human cerebellum and alterations in schizophrenia. *Synapse* 42 : 104-114.
- Eglen R.M., Jasper J.R., Chang D.J. and Martin G.R. (1997) The 5-HT<sub>7</sub> receptor : orphan found. *Trends Pharmacol Sci* 18 : 104-107.

- Eison A.S. and Mullins U.L. (1996) Regulation of central 5-HT<sub>2A</sub> receptors : a review of in vivo studies. *Behav Brain Res* 73 : 177-181.
- El Mestikawy S., Riad M., Laporte A.M., Verge D., Daval G., Gozlan H. and Hamon M. (1990) Production of specific anti-rat 5-HT<sub>1A</sub> receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide. *Neurosci Lett* 118 : 189-192.
- Erlander M.G., Lovenberg T.W., Baron B.M., de Lecea L., Danielson P.E., Racke M., Slone A.L., Siegel B.W., Foye P.E., Cannon K., Burns J.E. and Sutcliffe J.G. (1993) Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 3452-3456.
- Fargin A., Raymond J.R., Lohse M.J., Kobilka B.K., Caron M.G. and Lefkowitz R.J. (1988) The genomic clone G-21 which resembles a  $\beta$ -adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *Nature* 335 : 358-360.
- Fay R. and Kubin L. (2000) Pontomedullary distribution of 5-HT<sub>2A</sub> receptor-like protein in the rat. *J Comp Neurol* 418 : 323-345.
- Felder C.C., Kanterman R.Y., Ma A.L. and Axelrod J. (1990) Serotonin stimulates phospholipase A<sub>2</sub> and the release of arachidonic acid in hippocampal neurons by a type 2 serotonin receptor that is independent of inositolphospholipid hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 2187-2191.

- Ferron A., Reader T.A. and L. Descarries (1981) Responsivness of cortical neurons to serotonin after 5,7-DHT denervation or PCPA depletion. *J Physiol, Paris* 77 : 381-384.
- Fiorella D., Rabin R.A. and Winter J.C. (1995) The role of the 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the stimulus effects of hallucinogenic drugs. I: Antagonist correlation analysis. *Psychopharmacology (Berl)* 121 : 347-356.
- Fiorica-Howells E., Hen R., Gingrich J., Li Z. and Gershon M.D. (2002) 5-HT<sub>2A</sub> receptors : location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT<sub>2A</sub> knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282 : G877-G893.
- Fischette C.T., Nock B. and Renner K. (1987) Effects of 5,7-dihydroxytryptamine on serotonin<sub>1</sub> and serotonin<sub>2</sub> receptors throughout the rat central nervous system using quantitative autoradiography. *Brain Res* 421 : 263-279.
- Fitzgerald L.W., Iyer G., Conklin D.S., Krause C.M., Marshall A., Patterson J.P., Tran D.P., Jonak G.J and Hartig P.R. (1999) Messenger RNA editing of the human serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor. *Neuropsychopharmacology* 21 : 82S-90S.
- Florian J.A. and Watts S.W. (1998) Integration of mitogen-activated protein kinase kinase activation in vascular 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor signal transduction. *J Pharmacol Exp Ther* 284 : 346-355.
- Freedman N.J. and Lefkowitz R.J. (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* 51 : 319-353.

- Gaspar P., Cases O. and Maroteaux L. (2003) The developmental role of serotonin : news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* 4 : 1002-1012.
- Gelber E.I., Kroeze W.K., Willins D.L., Gray J.A., Sinar C.A., Hyde E.G., Gurevich V., Benovic J. and Roth B.L. (1999) Structure and function of the third intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor : the third intracellular loop is alpha-helical and binds purified arrestins. *J Neurochem* 72 : 2206-2214.
- Gérard C., El Mestikawy S., Lebrand C., Adrien J., Ruat M., Traiffort E., Hamon M. and Martres M.-P. (1996) Quantitative RT-PCR distribution of serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor mRNA in the central nervous system of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *Synapse* 23 : 164-173.
- Gérard C., Martres M.-P., Lefèvre K., Miquel M.-C., Verge D., Lanfumey L., Doucet E., Hamon M. and El Mestikawy S. (1997) Immunolocalization of serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain Res* 746 : 207-219.
- Gerhardt C.C. and van Heerikhuizen (1997) Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. *Eur J Pharmacol* 334 : 1-23.
- Geurts F.J., De Schutter E. and Timmermans J.-P. (2002) Localization of 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>5A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptor-like immunoreactivity in the rat cerebellum. *J Chem Neuroanat* 24 : 65-74.

- Gewirtz J.C. and Marek G.J. (2000) Behavioral evidence for interactions between a hallucinogenic drug and group II metabotropic glutamate receptors. *Neuropsychopharmacol* 23 : 569-576.
- Gingrich J.A., Zhou M., Sealon S. and Hen R. (1999) Mice lacking the 5-HT<sub>2A</sub> receptor are insensitive to many of the behavioural and physiological effects of hallucinogens. *Soc Neurosci Abstr* 25 : 799.
- Glennon R.A. (1996) Classical hallucinogens. In C.R. Schuster and M.J. Kuhar (eds) *Pharmacological aspects of drug dependence*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 343-371.
- Glennon R.A. and Dukat M. (1995) Serotonin receptor subtypes. In F.E. Bloom, D.J. Kupfer (eds): *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. Raven Press Ltd, New York, pp : 415-429.
- Glennon R.A. and Lucki I. (1988) Behavioural Models of Serotonin Receptor Activation. In E. Sanders-Bush (ed) *The Serotonin Receptors*, The Humana Press, Clifton, New Jersey, pp. 253-293.
- Glennon R.A., Titeler M. and McKenney J.D. (1984) Evidence for 5-HT<sub>2</sub> involvement in the mechanism of action of hallucinogenic agents. *Life Sci* 35 : 2505-2511.
- Glennon R.A., Seggel M.R., Soine W., Davis K.H., Lyon R.A. and Titeler M. (1988) <sup>125</sup>I-2,5-Dimethoxy-4-iodophenyl-2-aminopropane (DOI) : an iodinated radioligand that specifically labels the agonist high affinity state of the 5-HT<sub>2</sub> serotonin receptor. *J Med Chem* 31 : 5-7.

- Glennon R.A., Westkaemper R.B. and Bartyzel P. (1991) Medicinal chemistry of serotonergic agents. In S.J. Peroutka (ed) Serotonin receptor subtypes. Basic and clinical aspects. J.C. Venter and L.C. Harrison (series eds) Receptor Biochemistry and Methodology, vol 15. Wiley-Liss, New York, pp : 19 - 64.
- Gobbi M., Regondi M.C., Pompeiano M., Palacios J.M. and Mennini T. (1994) Differential effects of 5,7-dihydroxytryptamine-induced serotonergic degeneration of 5-HT<sub>1A</sub> receptors and 5-HT uptake sites in the rat brain. *J Chem Neuroanat* 7 : 65-73.
- Goppelt-Struebe M. and Stroebel M. (1998) Signaling pathways mediating induction of the early response genes prostaglandin G/H synthase-2 and egr-1 by serotonin via 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *J Cell Physiol* 175 : 341-347.
- Goppelt-Struebe M., Hahn A., Stroebel M. and Reiser C.O.A. (1999) Independent regulation of cyclo-oxygenase 2 expression by p42/44 mitogen-activated protein kinases and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase. *Biochem J* 339 : 329-334.
- Gozlan H., Emerit M.B., Hall M.D., Nielsen M. and Hamon M. (1986) *In situ* molecular sizes of the various types of 5-HT binding sites in the rat brain. *Biochem Pharmacol* 35 : 1891-1897.
- Grailhe R., Waeber C., Dulawa S.C., Hornung J.P., Zhuang X., Brunner D., Geyer M.A. and Hen R. (1999) Increased exploratory activity and altered response to LSD in mice lacking the 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *Neuron* 22 : 581-591.

- Grailhe R., Grabtree G.W. and Hen R. (2001) Human 5-HT(5) receptors : the 5-HT(5A) receptor is functional but the 5-HT(5B) receptor was lost during mammalian evolution. *Eur J Pharmacol* 418 : 157-167.
- Gray J.A. and Roth B.L. (2001) Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors by agonists and antagonists. *Brain Res Bull* 56 :441-451.
- Gray J.A., Sheffler D.J., Bhatnagar A., Woods J.A., Hufeisen S.J., Benovic J.L. and Roth B.L. (2001) Cell-type specific effects of endocytosis inhibitors on 5-hydroxytryptamine(2A) receptor desensitization and resensitization reveal an arrestin-, GRK2-, and GRK5-independent mode of regulation in human embryonic kidney 293 cells. *Mol Pharmacol* 60 : 1020-1030.
- Gray J.A., Bhatnagar A., Gurevich V.V. and Roth B.L. (2003a) The interaction of a constitutively active arrestin with the arrestin-insensitive 5-HT<sub>2A</sub> receptor induces agonist-independent internalization. *Mol Pharmacol*. 63 : 961-972.
- Gray J.A., Compton-Toth B.A. and Roth B.L. (2003b) Identification of two serine residues essential for agonist-induced 5-HT<sub>2A</sub> receptor desensitization. *Biochemistry* 42 : 10853-10862.
- Greene E.L., Houghton O., Collinsworth G., Garnovskaya M.N., Nagai T., Sajjad T., Bheemanathini V., Grewal J.S., Paul R.V. and Raymond J.R. (2000) 5-HT<sub>2A</sub> receptors stimulate mitogen-activated protein kinase via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 278 : F650-F658.



- Grewal J.S., Mukhin Y.V., Garnovskaya M.N., Raymond J.R. and Greene E.L. (1999) Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor induces TGF-beta1 expression in mesangial cells via ERK : proliferative and fibrotic signals. *Am J Physiol* 276 : F922-F930.
- Griffiths J.L. and Lovick T.A. (2002) Co-localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptor- and GABA-immunoreactivity in neurones in the periaqueductal grey matter of the rat. *Neurosci Lett* 326 : 151-154.
- Grotewiel M. S. and Sanders-Bush E. (1994) Regulation of serotonin<sub>2A</sub> receptors in heterologous expression systems. *J Neurochem* 63 : 1255-1260.
- Guest P.C., Salim K., Skynner H.A., George S.E., Bresnick J.N. and McAllister G. (2000) Identification and characterization of a truncated variant of the 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor produced by alternative splicing. *Brain Res* 876 : 238-244.
- Guillet-Deniau I., Burnol A.-F. and Girard J. (1997) Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J Biol Chem* 272 : 14825-14829.
- Gustafson E.L., Durkin M.M., Bard J.A., Zgombick J. and Branchek T.A. (1996) A receptor autoradiographic and *in situ* hybridization analysis of the 5-HT<sub>7</sub> receptor in rat brain. *Br J Pharmacol* 117 : 657-666.
- Hamada S., Senzaki K., Hamaguchi-Hamada K., Tabuchi K., Yamamoto H., Yamamoto T., Yoshikawa S., Okano H. and Okado N. (1998) Localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptor in rat cerebral cortex and olfactory system revealed by immunocytochemistry using two

antibodies raised in rabbit and chicken. *Mol Brain Res* 54 : 199-211.

Hamblin M.W., Guthrie C.R., Kohen R. and Heidmann D.E. (1998) Gs protein-coupled serotonin receptors: receptor isoforms and functional differences. *Ann N Y Acad Sci* 861 : 31-37.

Hanley, J.G., Koulen, P., Bedford, F., Gordon-Weeks, P.R. and Moss S.J. (1999) The protein MAP-1B links GABA<sub>A</sub> receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature* 397 : 66-69.

Hartig P., Kao H.-T., Macchi M., Adham N., Zgombick J., Weinshank R. and Branchek T. (1990) The molecular biology of serotonin receptors, An overview. *Neuropsychopharmacology* 3 : 335-347.

Harsing L.G.Jr, Prauda I., Barkoczy J., Matyus P. and Juranyi Z. (2004) A 5-HT<sub>7</sub> heteroreceptor-mediated inhibition of [<sup>3</sup>H]serotonin release in raphe nuclei slices of the rat: evidence for a serotonergic-glutamatergic interaction. *Neurochem Res* 29 : 1487-1497.

Hebert T.E., Moffet S., Morello J.-P., Loisel T.P., Bichet D.G., Barret C. and Bouvier M. (1996) A peptide derived from a  $\beta$ 2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* 271 : 16384-16392.

Heidmann D.E., Metcalf M.A., Kohen R. and Hamblin M.W. (1997) Four 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> (5-HT<sub>7</sub>) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem* 68 : 1372-1381.

- Heidmann D.E., Szot P., Kohen R. and Hamblin M.W. (1998) Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> (5-HT<sub>7</sub>) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology* 37 : 1621-1632.
- Hensler J.G. and Truett K.A. (1998) Effect of chronic serotonin-2 receptor agonist or antagonist administration on serotonin-1A receptor sensitivity. *Neuropsychopharmacology* 19 : 354-364.
- Herrick-Davis K., Grinde E. and Niswender C.M. (1999) Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor RNA editing alters receptor basal activity: implications for serotonergic signal transduction. *J Neurochem* 73 : 1711-1717.
- Hope A.G., Downie D.L., Sutherland L., Lambert J.J., Peters J.A. and Burchell B. (1993) Cloning and functional expression of an apparent splice variant of the murine 5-HT<sub>3</sub> receptor A subunit. *Eur J Pharmacol, Mol Pharmacol Sect* 245 : 187-192.
- Hoyer D. and Martin G. (1997) 5-HT Receptor Classification and Nomenclature: Towards a Harmonization with the Human Genome. *Neuropharmacology* 36 : 419-428.
- Hoyer D., Hannon J.P. and Martin G.R. (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Bioch and Behav* 71 : 533-554.
- Huang J. and Pickel V.M. (2002) Serotonin transporters (SERTs) within the rat nucleus of the solitary tract: subcellular distribution and relation to 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *J Neurocytol* 31 : 667-679.

- Huang J. and Pickel V.M. (2003) Ultrastructural localization of serotonin<sub>2A</sub> and N-Methyl-D-Aspartate receptors in somata and dendrites of single neurons within rat dorsal motor nucleus of the vagus. *J Comp Neurol* 455 : 270-280.
- Ichikawa J., Ishii H., Bonaccorso S., Fowler W.L., O'Laughlin I.A., Meltzer H.Y. (2001) 5-HT<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation : a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *J Neurochem* 76 : 1521-1531.
- Ikemoto K., Nishimura A., Okado N., Mikuni M., Nishi K. and Nagatsu I. (2000) Human midbrain dopamine neurons express serotonin 2A receptor: an immunohistochemical demonstration. *Brain Res* 853 : 377-380.
- Ito H., Nyberg S., Halldin C., Lundkvist C. and Farde L. (1998) PET imaging of central 5-HT<sub>2A</sub> receptors with carbon-11-MDL100,907. *J Nucl Med* 39 : 208-214.
- Jakab R.L. and Goldman-Rakic P.S. (1998) 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> serotonin receptors in the primate cerebral cortex: possible site of action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 735-740.
- Jakab R.L. and Goldman-Rakic P.S. (2000) Segregation of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in inhibitory circuits of the primate cerebral cortex. *J Comp Neurol* 417 : 337-348.
- Jakala P., Sirvio J., Koivisto E., Bjorklund M., Kaukua J. and Riekkinen P. Jr. (1995) Modulation of rat neocortical high-voltage

spindle activity by 5-HT<sub>1</sub>/5-HT<sub>2</sub> receptor subtype specific drugs.  
Eur J Pharmacol 282 : 39-55.

Jakeman L.B., To Z.P., Eglen R.M., Wong E.H. and Bonhaus D.W.  
(1994) Quantitative autoradiography of 5-HT<sub>4</sub> receptors in brains  
of three species using two structurally distinct radioligands,  
[<sup>3</sup>H]GR113808 and [<sup>3</sup>H]BIMU-1. Neuropharmacology 33 : 1027-  
1038.

Jansson A., Tinner B., Steinbusch H.W.M., Agnati L.F. and Fuxe K.  
(1998) On the relationship of 5-hydroxytryptamine neurons to  
5-hydroxytryptamine 2A receptor-immunoreactive neuronal  
processes in the brain stem of rats. A double immunolabelling  
analysis. NeuroReport 9:2505-2511.

Jansson A., Descarries L., Cornea-Hébert V., Riad M., Vergé D.,  
Bancila M., Agnati L.F. and Fuxe K. (2001a) Transmitter-receptor  
mismatches in central dopamine, serotonin, and neuropeptide  
systems. In W. Walz (ed): The neuronal environment: Brain  
homeostasis in Health and Disease. Humana Press Inc, Totowa,  
N.J. pp. 83-108.

Jansson A., Tinner B., Bancila M., Vergé D., Steinbusch H.W.M.,  
Agnati L.F. and K. Fuxe (2001b) Relationships of  
5-hydroxytryptamine immunoreactive terminal-like varicosities to  
5-hydroxytryptamine-2A receptor-immunoreactive neuronal  
processes in the rat forebrain. J Chem Neuroanat 22 : 185-203.

Jéquier E., Lovenberg W. and A. Sjoerdsma (1967) Tryptophan  
Hydroxylase inhibition: the mechanism by which

p-chlorophenylalanine depletes rat brain serotonin. *Mol Pharmacol* 3 : 274-278.

Johnson M.P., Siegel B.W. and Carr A.A. (1996) [<sup>3</sup>H]MDL100,907 : a novel selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor ligand. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 354 : 205-209.

Jordan B.A. and Devi L.A. (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399 : 697-700.

Julius D., Huang K.N., Livelli T.J., Axel R. and Jessel T.M. (1990) The 5-HT<sub>2</sub> receptor defines a family of structurally distinct but functionally conserved serotonin receptors. *Proc Natl Acad Sci* 87 :928-932.

Kaech S., Parmar H., Roelandse M., Bornmann C. and Matus A. (2001) Cytoskeletal microdifferentiation : a mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites. *Proc Natl Acad Sci* 98 : 7086-7092.

Kakiuchi T., Nishiyama S., Sato K., Ohba H., Nakanishi S. and Tsukada H. (2000) Age-related reduction of [<sup>11</sup>C]MDL100,907 binding to central 5-HT<sub>2A</sub> receptors : PET study in the conscious monkey brain. *Brain Res* 883 : 135-142.

Kapur S. and Seeman P. (2001) Does fast dissociation from the dopamine D<sub>2</sub> receptor explain the action of atypical antipsychotics? : A new hypothesis. *Am J Psychiatry* 158 :360-369.

- Kapur S. and Mamo D. (2003) Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27 : 1081-1090.
- Kia H.K., Miquel M.C., McKernan R.M., Laporte A.M., Lombard M.C., Bourgoin S., Hamon M. and Verge D. (1995) Localisation of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat spinal cord: immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *Neuroreport* 6 : 257-261.
- Kobilka B.K., Frielle T., Collins S., Yang-Feng T., Kobilka T.S., Franke U., Lefkowitz R.J. and Caron M.G. (1987) An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* 329 : 75-79.
- Koe B.K. and A. Weissman (1966) p-chlorophenylalanine : a specific depletor of brain serotonin. *J Pharmacol Exp Ther* 154 : 499-516.
- Kornau H-C., Schenker L.T., Kennedy M. B. and Seeburg P.H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269 : 1737-1740.
- Krobert K.A., Bach T., Syversvsveen T., Kvingedal A.M. and Levy F.O. (2001) The cloned human 5-HT<sub>7</sub> receptor splice variants: a comparative characterization of their pharmacology, function and distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363 : 620-632.
- Kroeze W.K. and Roth B.L. (2000) Interaction of the third intracellular loop of the human 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor with microtubule-associated protein 1A (MAP-1A). *Soc Neurosci Abstr* 26 : 1426.

- Kroeze W.K., Willins D.L. and Roth B.L. (1999) Proteins interacting with the third intracellular loop of human 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptors identified by yeast two-hybrid screening. *Soc Neurosci Abstr* 25 : 1201.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- Lakoski J.M. and Aghajanian G.K. (1985) Effects of ketanserin on neuronal responses to serotonin in the prefrontal cortex, lateral geniculate and dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* 24 :265-273.
- Langkopf A., Hammarback J.A., Muller R., Vallee R.B. and Garner C.C. (1992) Microtubule-associated proteins 1A and LC2. Two proteins encoded in one messenger RNA. *J Biol Chem* 267 : 16561-16566.
- Laprade N., Radja F., Reader T.A. and Soghomonian J.-J. (1996) Dopamine receptor agonists regulate levels of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor and its mRNA in a subpopulation of rat striatal neurons. *J Neurosci* 16 : 3727-3736.
- Laporte A.M., Koscielniak T., Ponchant M., Verge D., Hamon M. and Gozlan H. (1992) Quantitative autoradiographic mapping of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat CNS using [<sup>125</sup>I]iodo-zacopride and [<sup>3</sup>H]zacopride as radioligands. *Synapse* 10 : 271-281.
- Leysen J.E. (1990) Gaps and Peculiarities in 5-HT<sub>2</sub> receptor studies. *Neuropsychopharmacology*. 3 : 361-369.
- Leysen J.E. (1992) 5-HT<sub>2</sub>-receptors: location, pharmacological, pathological and physiological role. In S.Z. Langer, N. Brunello, G.



Racagni, J. Mendlewicz (eds): Serotonin Receptor Subtypes: Pharmacological Significance and Clinical Implications. Int. Acad. Biomed. Drug Res. Basel: Karger, pp. 31-43.

Leysen J.E., Niemegeers C.J.E., Tollenaere J.P. and Laduron P.M. (1978) Serotonergic component of neuroleptic receptors. *Nature* 272 : 168-171.

Leysen J.E., Geerts R., Gommeren W., Verwimp M. and Van Gompel P. (1982a) Regional distribution of serotonin-2 receptor binding sites in the brain and effects of neuronal lesions. *Arch int Pharmacodyn* 256 : 301-305.

Leysen J.E., Niemegeers J.M., Van Neuten J.M. and Laduron P.M. (1982b) [<sup>3</sup>H]ketanserin (R 41 468), a selective <sup>3</sup>H-ligand for serotonin<sub>2</sub> receptor binding sites. Binding properties, brain distribution, and functional role. *Mol Pharmacol* 21 : 301-314.

Leysen J.E., Eens A., Gommeren W., Van Gompel P., Wynants J. and Janssen P.A. (1987) Non-serotonergic [<sup>3</sup>H]ketanserin binding sites in striatal membranes are associated with a dopac release system on dopaminergic nerve endings. *Eur J Pharmacol* 134 : 373-375.

Leonhardt S., Gorospe E., Hoffman B.J. and Teitler M. (1992) Molecular pharmacological differences in the interaction of serotonin with 5-Hydroxytryptamine<sub>1C</sub> and 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptors. *Mol Pharmacol* 42 : 328-335.

Li Q.-H., Nakadate K., Tanaka-Nakadate S., Nakatsuka D., Cui Y. and Watanabe Y. (2004) Unique expression patterns of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the rat brain during postnatal development :

Western Blot and immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol* 469 : 128-140.

Lopez-Gimenez J.F., Mengod G., Palacios J.M. and Vilaro M.T. (1997) Selective visualisation of rat brain 5-HT<sub>2A</sub> receptors by autoradiography with [<sup>3</sup>H] MDL 100,907. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 356 : 446-454.

Lopez-Gimenez J.F., Villazon M., Brea J., Loza I., Palacios J.M., Mengod G. and Vilaro T. (2001) Multiple conformations of native and recombinant human 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptors are labeled by agonists and discriminated by antagonists. *Mol Pharmacol* 60 : 690-699.

Lundkvist C., Halldin C., Ginovart N., Nyberg S., Swahn C.G., Carr A.A., Brunner F. and Farde L. (1996) [<sup>11</sup>C]MDL100907, a radioligand for selective imaging of 5-HT<sub>2A</sub> receptors with positron emission tomography. *Life Sci* 58 : PL 187-192. Erratum in : 58 :379.

Luttgen M., Ove Ogren S. and Meister B. (2004) Chemical identity of 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactive neurons of the rat septal complex and dorsal hippocampus. *Brain Res* 1010 : 156-165.

Lyon R.A., Davis K.H. and Titeler M. (1987) <sup>3</sup>H-DOB labels a guanyl-nucleotide sensitive state of cortical 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Mol Pharmacol* 31 : 194-199.

MacDonald E. and Sirviö J. (1993) Toxins for serotonergic neurons. In E. MacDonald and J. Sirviö (eds): *Neurotoxins as tools in lesioning experiments* : Academic Press, pp : 12-17.

- Maeshima, T., Ito R., Hamada S., Senzaki K., Hamaguchi-Hamada K., Shutoh F., and Okado N. (1998a) The cellular localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the spinal cord and spinal ganglia of the adult rat. *Brain Res* 797 :118-124.
- Maeshima T., Shutoh F., Hamada S., Senzaki K., Hamaguchi-Hamada K., Ito R., and Okado N. (1998b) Serotonin 2A receptor-like immunoreactivity in rat cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Lett* 252 :72-74.
- Mann J.J. (1999) Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behaviour. *Neuropsychopharmacology* 21 : 99S-105S.
- Mann S.S. and Hammarback J.A. (1994) Molecular characterization of light chain 3. *J Biol Chem* 269 : 11492-11497.
- Manrique C., Segu L., Hery F., Hery M., Faudon M. and Francois-Bellan A.M. (1993) Increase of central 5-HT<sub>1B</sub> binding sites following 5,7-dihydroxytryptamine axotomy in the adult rat. *Brain Res* 623 : 345-348.
- Manrique C., Francois-Bellan A.M., Segu L., Becquet D., Hery M., Faudon M. and Hery F. (1994) Impairment of serotonergic transmission is followed by adaptive changes in 5-HT<sub>1B</sub> binding sites in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 663 : 93-100.
- Marek G.J. and Aghajanian G.K. (1996) LSD and the phenethylamine hallucinogen DOI are potent partial agonists at 5-HT<sub>2A</sub> receptors on interneurons in rat piriform cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 278 :1373-1382.

- Marek G.J. and Aghajanian G.K. (1998) 5-Hydroxytryptamine induced excitatory postsynaptic currents in neocortical layer V pyramidal cells : suppression by  $\mu$ -opiate receptor activation. *Neuroscience* 86 : 485-497.
- Marek G.J. and Aghajanian G.K. (1999) 5-HT<sub>2A</sub> receptor or  $\alpha$ 1-adrenoceptor activation induces excitatory postsynaptic currents in layer V pyramidal cells of the medial prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol* 367 : 197-206.
- Maricq A.V., Peterson A.S., Brake A.J., Myers R.M. and Julius D. (1991) Primary structure and functional expression of the 5-HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254 : 432-437.
- Martin-Cora F.J. and Pazos A. (2004) Autoradiographic distribution of 5-HT<sub>7</sub> receptors in the human brain using [<sup>3</sup>H]mesulergine : comparison to other mammalian species. *Br J Pharmacol* 141 :92-104.
- Martin-Ruiz R., Puig M.V., Celada P., Shapiro D.A., Roth B.L., Mengod G. and Artigas F. (2001) Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *J Neurosci* 21 : 9856-9866.
- Matsuura T., Takeuchi Y., Kojima M., Ueda S., Yamada H., Nojyo Y., Ushizima K. and Sano Y. (1985) Immunohistochemical studies of the serotonergic supraependymal plexus in the mammalian ventricular system, with special reference to the characteristic reticular ramification. *Acta Anat* 123 : 207-219.

- Matus A. (1990) Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J Physiol Paris* 84 : 134-137.
- Matthes H. Boschert U., Amlaiky N., Grailhe R., Plassat J.L., Muscatelli F., Mattei M.G. and Hen R. (1993) Mouse 5-hydroxytryptamine<sub>5A</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>5B</sub> receptors define a new family of serotonin receptors : cloning, functional expression, and chromosomal localization. *Mol Pharmacol* 43 : 313-319.
- McCall R.B. and Aghajanian G.K. (1980) Pharmacological characterization of serotonin receptors in the facial motor nucleus : a microiontophoretic study. *Eur J Pharmacol* 65 : 175-183.
- McKenna D.J. and Peroutka S.J. (1989) Differentiation of 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptor subtypes using <sup>125</sup>I-R(-)2,5-Dimethoxy-4-iodo-phenylisopropylamine and <sup>3</sup>H-ketanserin. *J Neurosci* 9 :3482-3490.
- McKenna D.J., Nazarali A.H., Himeno A. and Saavedra J.M. (1989) Chronic treatment with (+/-) DOI, a psychomimetic 5-HT<sub>2</sub> agonist, downregulates 5-HT<sub>2</sub> receptors in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 2 : 81-87.
- Meltzer C.C., Price J.C., Mathis C.A., Greer P.J., Cantwell M.N., Houck P.R., Mulsant B.H., Ben-Eliezer D., Lopresti B., DeKosky S.T. and Reynolds C.F. (1999) PET imaging of serotonin type 2A receptors in late-life neuropsychiatric disorders. *Am J Psychiatry* 156 : 1871-1878.

- Meltzer H.Y. (1989) Clinical studies on the mechanism of action of clozapine : the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. *Psychopharmacology* 99 [Suppl] : S18-S27.
- Meltzer H.Y. (1999) The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* 21 : 106S-115S.
- Meltzer H.Y. (2004) What's atypical about atypical antipsychotic drugs ? *Curr Opin Pharmacol* 4 : 53-57.
- Meltzer H.Y., Li Z., Kaneda Y. and Ichikawa J. (2003) Serotonin receptors : their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27 : 1159-1172.
- Meneses A. (2002) Involvement of 5-HT<sub>2A/2B/2C</sub> receptors on memory formation : simple agonism, antagonism, or inverse agonism ? *Cell Mol Neurobiol* 22 : 675-688.
- Mengod G., Pompeiano M., Martinez-Mir M.I., and Palacios J.M. (1990) Localization of the mRNA for the 5-HT<sub>2</sub> receptor by in situ hybridization histochemistry. Correlation with the distribution of receptor sites. *Brain Res* 524:139-143.
- Mengod G., Vilaro M.T., Raurich A., Lopez-Gimenez J.F., Cortes R. and Palacios J.M. (1996) 5-HT receptors in mammalian brain : receptor autoradiography and *in situ* hybridization studies of new ligands and newly identified receptors. *Histochem J* 28 : 747-758.
- Meyer J.H., McMain S., Kennedy S.H., Korman L., Brown G.M., DaSilva J.N., Wilson A.A., Blak T., Eynan-Harvey R., Goulding V.S., Houle S. and Links P. (2003) Dysfunctional attitudes and

5-HT<sub>2</sub> receptors during depression and self-harm. *Am J Psychiatry* 160 : 90-99.

Mijnster M.J., Galis-de Graaf Y. and Voon P. (1998) Serotonergic regulation of neuropeptide and glutamic acid decarboxylase mRNA levels in the rat striatum and globus pallidus : studies with fluoxetine and DOI. *Brain Res Mol Brain Res* 54 : 64-73.

Miner L.A.H., Backstrom J.R., Sanders-Bush E. and Sesack S.R. (2003) Ultrastructural localization of serotonin<sub>2A</sub> receptors in the middle layers of the rat prelimbic prefrontal cortex. *Neuroscience* 116 : 107-117.

Miquel M.C., Doucet E., Boni C., El Mestikawy S., Matthiessen L., Daval G., Vergé D. and Hamon M. (1991) Central serotonin 1A receptors : respective distributions of encoding mRNA, receptor protein and binding sites by *in situ* hybridization histochemistry, radioimmunochemistry and autoradiographic mapping in the rat brain. *Neurochem Int* 19 : 453-465.

Miquel M.C., Doucet E., Riad M., Adrien J., Vergé D. and Hamon M. (1992) Effect of the selective lesion of serotonergic neurons on the regional distribution of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 14 : 357-362.

Morales M., Battenberg E., de Lecea L., Sanna P.P. and Bloom F.E. (1996) Cellular and subcellular immunolocalization of the type 3 serotonin receptor in the rat central nervous system. *Mol Brain Res* 36 : 251-260.

- Morilak D.A. and Ciaranello R.D. (1993) 5-HT<sub>2</sub> receptor immunoreactivity on cholinergic neurons of the pontomesencephalic tegmentum shown by double immunofluorescence. *Brain Res* 627 : 49-54.
- Morilak D.A., Garlow S.J. and Ciaranello R.D. (1993) Immunocytochemical localisation and description of neurons expressing serotonin 2 receptors in the rat brain. *Neuroscience* 54 :701-717.
- Morilak D.A., Somogyi P., Lujan-Miras R. and Ciaranello R.D. (1994) Neurons expressing 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat brain: neurochemical identification of cell types by immunocytochemistry. *Neuropsychopharmacology* 11 :157-166.
- Moukhles H., Bosler O., Bolam J.P., Vallee A., Umbriaco D., Geffard M, and Doucet G. (1997) Quantitative and morphometric data indicate precise cellular interactions between serotonin terminals and postsynaptic targets in rat substantia nigra. *Neuroscience* 76 : 1159-1171.
- Moyer R.W. and Kennaway D.J. (1999) Immunohistochemical localization of serotonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett* 271 : 147-150.
- Müller R., Kindler S., and Garner C.C. (1994) The MAP1 family. In : Hyams J.S., Lloyd C.W. (Eds.), *Modern Cell Biology, Volume 13, Microtubules*. Wiley-Liss, New-York, pp. 141-154.
- Nelson D.L., Lucaites V.L., Wainscott D.B. and Glennon R.A. (1999) Comparisons of hallucinogenic phenylisopropylamine binding



affinities at cloned human 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 359 : 1-6.

Ngan E.T., Yatham L.N., Ruth T.J. and Liddle P.F. (2000) Decreased serotonin 2A receptor densities in neuroleptic-naive patients with schizophrenia : a PET study using [<sup>18</sup>F]setoperone. Am J Psychiatry 157 : 1016-1018.

Niesler B., Frank B., Kappeller J. and Rappold G.A. (2003) Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT<sub>3</sub> serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. Gene 310 : 101-111.

Niswender C.M., Sanders-Bush E. and Emeson R.B. (1998) Identification and characterization of RNA editing events within the 5-HT<sub>2C</sub> receptor. Ann N Y Acad Sci 861 : 38-48.

Nocjar C., Roth B.L. and E.A. Pehek (2002) Localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors on dopamine cells in subnuclei of the midbrain A10 cell group. Neuroscience 111 : 163-176.

Noiges R., Eichinger R., Kutschera W., Fischer I., Nemeth Z., Wiche G. and Propst F. (2002) Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B : light chains determine distinct functional properties. J Neurosci 22 : 2106-2114.

Nosjean A., Hamon M. and Darmon M. (2002) 5-HT<sub>2A</sub> receptors are expressed by catecholaminergic neurons in the rat nucleus tractus solitarii. Neuroreport 13 : 2365-2369.

Oksenberg D., Havlik S., Peroutka S.J. and Ashkenazi A. (1995) The third intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor

determines effector coupling specificity. *J Neurochem* 64 : 1440-1447.

Oleskevich S. and Descarries L. (1990) Quantified distribution of the serotonin innervation in adult rat hippocampus. *Neuroscience* 34 : 19-33.

Oleskevich S., Descarries L., Watkins K.C., Séguéla P. and Daszuta A. (1991) Ultrastructural features of the serotonin innervation in adult rat hippocampus : an immunocytochemical description in single and serial thin sections. *Neuroscience* 42 : 777-791.

Overton M.C. and Blumer K.J. (2000) G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo. *Curr Biol* 10 : 341-344.

Palacios J.M., Waeber C., Hoyer D. and Mengod G. (1990) Distribution of serotonin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 600 : 36-52.

Palacios J.M., Raurich A., Mengod G., Hurt S.D. and Cortes R. (1996) Autoradiographic analysis of 5-HT receptor subtypes labeled by [<sup>3</sup>H]5-CT ([<sup>3</sup>H]5-carboxamidotryptamine). *Behav Brain Res* 73 : 239-243.

Palfreyman M.G., Schmidt C.J., Sorensen S.M., Dudley M.W., Kehne J.H., Moser P., Gittos M.W. and Carr A.A. (1993) Electrophysiological, biochemical and behavioural evidence for 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> mediated control of dopaminergic function. *Psychopharmacology* 112 : S60-S67.

Palvimaki E.P., Roth B.L., Majasuo H., Laakso A., Kuoppamaki M., Syvalahti E. and Hietala J. (1996) Interactions of selective

serotonin reuptake inhibitors with the serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor. *Psychopharmacology (Berl)* 126 : 234-240.

- Pandey G.N., Dwivedi Y., Rizavi H.S., Ren X., Pandey S.C., Pesold C., Roberts R.C., Conley R.R. and Tamminga C.A. (2002) Higher expression of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the postmortem brains of teenage suicide victims. *Am J Psychiatry* 159 : 419-429.
- Parent A., Descarries L. and Beaudet A. (1981) Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine. *Neuroscience* 6 : 115-138.
- Paxinos G. and Watson C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. London : Academic Press.
- Pazos A. and Palacios J.M. (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 346: 205-230.
- Pazos A., Cortez R. and Palacios J.M. (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res* 346 : 231-249.
- Pei Q., Lewis L., Sprakes M.E., Jones D.G., Grahame-Smith D.G. and Zetterström T.S.C. (2000) Serotonergic regulation of mRNA expression of Arc, an immediate early gene selectively localized at neuronal dendrites. *Neuropharmacology* 39 : 463-470.
- Peremans K., Audenaert K., Jacobs F., Dumont F., De Vos F., Van De Wiele C., Vandecapelle M., Van Bree H., Verschotten F., Slegers G., Mertens J. and Dierckx R. (2002) Biodistribution and

displacement studies of the selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist 123I-5-I-R91150 in the normal dog. Nucl Med Commun 10 : 1019-1027.

Peroutka S.G. and Snyder S.H. (1979) Multiple serotonin receptors : differential binding of [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine, [<sup>3</sup>H]lysergic acid diethylamine and [<sup>3</sup>H]spiroperidol. Mol Pharmacol 16 : 687-699.

Peroutka S.J., Lebovitz R.M. and Snyder S.H. (1981) Two distinct central serotonin receptors with different physiological functions. Science 212 : 827-829.

Petäjä-Repo U.E., Hogue M., Laperrière A., Bhalla S., Walker P. and Bouvier M. (2001) Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. J Biol Chem 276 : 4416-4423.

Pickel V.M., Joh T.H. and Reis D.J. (1977) A serotonergic innervation of noradrenergic neurons in the locus coeruleus : demonstration by immunohistochemical localization of the transmitter specific enzymes tyrosine and tryptophan hydroxylase. Brain Res 131 : 197-214.

Pinborg L.H., Adams K.H., Svarer C., Holm S., Hasselbalch S.G., Haugbol S., Madsen J. and Knudsen G.M. (2003) Quantification of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the human brain using [<sup>18</sup>F]altanserin-PET and the bolus/infusion approach. J Cereb Blood Flow Metab 23 : 985-996.

- Pindon A., van Hecke G., van Gompel P., Lesage A.S., Leysen J.E. and Jurzak M. (2002) Differences in signal transduction of two 5-HT<sub>4</sub> receptor splice variants : compound specificity and dual coupling with Galphas- and Galphai/o-proteins. *Mol Pharmacol* 61 : 85-96.
- Pompeiano M., Palacios J.M., and Mengod G. (1994) Distribution of the serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor family mRNAs: comparison between 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Mol Brain Res* 23:163-178.
- Pranzatelli M.R. and Pluchino R.S. (1991) The relation of central 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors : low dose agonist-induced selective tolerance in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 39 : 407-413.
- Preece M.A., Dalley J.W., Theobald D.E.H., Robbins T.W. and Reynolds G.P. (2004) Region specific changes in forebrain 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptors in isolation-reared rats : an *in vitro* autoradiography study. *Neuroscience* 123 : 725-732.
- Pritchett D.B., Bach A.W.J., Wozny M., Taleb O., Dal Toso R., Shih J.C. and Seeburg P.H. (1988) Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5-HT-2 receptor. *EMBO J* 7 :4135-4140.
- Puig M.V., Celada P., Diaz-Mataix L. and Artigas F. (2003) *In vivo* modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT<sub>2A</sub> receptors : relationship to thalamocortical afferents. *Cerebral Cortex* 13 : 870-882.
- Radja F., Laporte A.-M., Daval G., Vergé D., Gozlan H. and Hamon M. (1991) Autoradiography of serotonin receptor subtypes in the central nervous system. *Neurochem Int* 18 : 1-15.

- Rauser L., Savage J.E., Meltzer H.Y. and Roth B.L. (2001) Inverse agonist actions of typical and atypical antipsychotic drugs at the human 5-Hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 299 : 83-89.
- Raymond J.R., Mukhin Y.V., Gelasco A., Turner J., Collinsworth G., Gettys T.W., Grewal J.S. and Garnovskaya M.N. (2001) Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 92 : 179-212.
- Reader T.A., Brière R., Grondin L. and Ferron A. (1986) Effects of *p*-chlorophenylalanine on cortical monoamines and on the activity of noradrenergic neurons. *Neurochemical Res* 11 : 1025-1035.
- Riad M., El Mestikawy S., Verge D., Gozlan H. and Hamon M. (1991) Visualization and quantification of central 5-HT<sub>1A</sub> receptors with specific antibodies. *Neurochem Int* 19 : 413-423.
- Riad M., Garcia S., Watkins K.C., Jodoin N., Doucet E., Langlois X., El Mestikawy S., Hamon M. and Descarries L. (2000) Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417 : 181-194.
- Riad M., Watkins K.C., Doucet E., Hamon M. and Descarries L. (2001) Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J Neurosci* 21 : 8378-8386.
- Riad M., Zimmer L., Rbah L., Watkins K.C., Hamon M. and Descarries L. (2004) Acute treatment with the antidepressant fluoxetine

internalizes 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors and reduces the *in vivo* binding of the PET radioligand [<sup>18</sup>]MPPF in the nucleus raphe dorsalis of rat. *J Neurosci* 24 : 5420-5426.

Riordan J.F. and Vallee B.L. (1972) Reactions with N-Ethylmaleimide and p-mercuribenzoate. *Meth Enzymol* 25 : 449-456.

Rioux A., Fabre V., Lesh K.P., Moessner R., Murphy D.L., Lanfumey L., Hamon M. and Martres M.-P. (1999) Adaptive changes of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in mice lacking the serotonin transporter. *Neurosci Lett* 262 : 113-116.

Rodriguez J.J., Garcia D.R. and Pickel V.M. (1999) Subcellular distribution of 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> and N-methyl-D-aspartate receptors within single neurons in rat motor and limbic striatum. *J Comp Neurol* 413 : 219-231.

Rodriguez J.J., Doherty M.D. and Pickel V.M. (2000) N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the ventral tegmental area : subcellular distribution and colocalization with 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptors. *J Neurosci Res* 60 : 202-211.

Rosel P., Arranz B., Urretavizcaya M., Oros M., San L. and Navarro M.A. (2004) Altered 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>4</sub> postsynaptic receptors and their intracellular signalling systems IP(3) and cAMP in brains from depressed violent suicide victims. *Neuropsychobiology* 49 : 189-195.

Roth B.L. (1994) Multiple serotonin receptors : clinical and experimental aspects. *Ann Clin Psychiatry* 6 : 67-78.

- Roth B.L. and Ciaranello R. (1991) Chronic mianserin treatment decreases 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding without altering 5-HT<sub>2</sub> receptor mRNA levels. *Eur J Pharmacol* 207 : 169-172.
- Roth B.L. and Shapiro D.A. (2001) Insights into the structure and function of 5-HT<sub>2</sub> family serotonin receptors reveal novel strategies for therapeutic target development. *Expert Opin Ther Targets* 5 : 685-695.
- Roth B.L., Nakaki T., Chuang D.M. and Costa E. (1986) 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptors coupled to phospholipase C in rat aorta : modulation of phosphoinositide turnover by phorbol ester. *J Pharmacol Exp Ther* 238 : 480-485.
- Roth B.L., McLean S., Zhu X.-Z. and Chuang D.-M. (1987) Characterization of two [<sup>3</sup>H]ketanserin recognition sites in rat striatum. *J Neurochem* 49 : 1833-1838.
- Roth, B.L., Palvimaki E.P., Berry S., Khan N., Sachs N., Uluer A., and Choudhary M.S. (1995) 5-Hydroxytryptamine 2A (5-HT<sub>2A</sub>) receptor desensitization can occur without down-regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 275 : 1638-1646.
- Roth B.L., Berry S.A., Kroeze W.K., Willins D.L. and Kristiansen K. (1998a) Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors : molecular biology and mechanisms of regulation. *Critical Rev Neurobiol* 12 : 319-338.
- Roth B.L., Meltzer H.Y. and Khan (1998b) Binding of typical and atypical antipsychotic drugs to multiple neurotransmitter receptors. *Adv Pharmacol* 42 : 482-485.



- Roth B.L., Willins D., Kristiansen K. and Kroeze W. (1999) Activation is hallucinogenic and antagonism is therapeutic : role of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in atypical antipsychotic drug actions. *Neuroscientist* 5 : 254-262.
- Roth B.L., Lopez E., Patel S. and Kroeze W. K (2000) The multiplicity of serotonin receptors : uselessly diverse molecules or an embarrassment of riches? *Neuroscientist* 6 : 252-262.
- Salahpour A., Bonin H., Bhalla S., Petäjä-Repo U. and Bouvier M. (2003) Biochemical characterization of beta<sub>2</sub>-adrenergic receptor dimers and oligomers. *Biol Chem* 384 : 117-123.
- Saltzman A.G., Morse B., Whitman M.M., Ivanshchenko Y., Jaye M. and Felder S. (1991) Cloning of the human serotonin 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1C</sub> receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Comm* 181 : 1469-1478.
- Sanders-Bush E. (1990) Adaptative regulation of central serotonin receptors linked to phosphoinositide hydrolysis. *Neuropsychopharmacology* 3 : 411-416.
- Sanders-Bush E. and Canton H. (1995) Serotonin receptors : signal transduction pathways. In F.E. Bloom, D.J. Kupfer (eds) : *Psychopharmacology : the fourth generation of progress*. Raven Press Ltd, New York, pp : 431-441.
- Sanders-Bush E., Breeding M. and Roznoski M. (1987) 5-HT<sub>2</sub> binding sites after mianserin : comparison of loss of sites and brain levels of drug. *Eur J Pharmacol* 133 : 199-204.

- Sari Y., Miquel M.C., Brisorgueil M.J., Ruiz G., Doucet E., Hamon M. and Verge D. (1999) Cellular and subcellular localisation of 5-hydroxytryptamine<sub>1B</sub> receptors in the rat central nervous system: immunocytochemical, autoradiographic and lesion studies. *Neuroscience* 88 :899-915.
- Saudou F. and Hen R. (1994) Invited review: 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. *Neurochem Int* 25 : 503-532.
- Scruggs J.L., Patel S., Bubser M. and Deutch A. (2000) DOI-induced activation of the cortex: dependence on 5-HT<sub>2A</sub> heteroreceptors on thalamocortical glutamatergic neurons. *J Neurosci* 20 : 8846-8852.
- Séguéla P., Watkins K.C. and Descarries L. (1989) Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. *J Comp Neurol* 289 : 129-142.
- Sleight A.J., Stam N.J., Mutel V. and Vanderheyden M.L. (1996) Radiolabelling of the human 5-HT<sub>2A</sub> receptor with an agonist, a partial agonist and an antagonist: effects on apparent agonist affinities. *Biochem Pharmacol* 51 : 71-76.
- Sleight A.J., Boess F.G., Bos M. and Bourson A. (1998) The putative 5-HT<sub>6</sub> receptor: localization and function. *Ann N Y Acad Sci* 861 : 90-96.
- Smith R.L., Barrett R.J. and Sanders-Bush E. (1990) Adaptation of brain 5-HT<sub>2</sub> receptors after mianserin treatment: receptor sensitivity, not receptor binding, more accurately correlates with behaviour. *J Pharmacol Exp Ther* 254 : 484-488.

- Soghomonian J.-J., Doucet G. and Descarries L. (1987) Serotonin innervation in adult rat neostriatum. I. Quantified regional distribution. *Brain Res* 425 : 85-100.
- Soghomonian J.-J., Descarries L. and Watkins K.C. (1989) Serotonin innervation in adult rat neostriatum. II. Ultrastructural features : a radioautographic and immunocytochemical study. *Brain Res* 481 : 67-86.
- Sotelo C., Cholley B., El Mestikawy S., Gozlan H. and Hamon M. (1990) Direct immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei. *Eur J Neurosci* 2 : 1144-1154.
- Sprague J.E., Huang X., Kanthasamy A. and Nichols D.E. (1994) Attenuation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induced neurotoxicity with the serotonin precursors tryptophan and 5-hydroxytryptophan. *Life Sci* 55 : 1193-1198.
- Steinbusch H.W.M. (1981) Distribution of serotonin immunoreactivity in the central nervous system of the rat. Cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6 : 557-618.
- Steinbusch H.W.M. (1984) Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. In A. Björklund, T. Hökfelt and M.J. Kuhar (eds): *Handbook of Chemical Neuroanatomy, vol. 3, Classical Transmitters and Transmitter Receptors in the CNS, Part II*. Elsevier, Amsterdam, pp.68-125.
- Steinbusch H.W.M. and Nieuwenhuys (1983) The raphe nuclei of the rat brainstem : a cytoarchitectonic and immunohistochemical

study. In P.C. Emson (ed) : Chemical Neuroanatomy, Raven Press, New York, pp. 131-207.

Stockmeier C.A. (2003) Involvement of serotonin in depression: evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin transporter. *J Psychiatric Res* 37 : 357-373.

Szele F.G. and Pritchett D.B. (1993) High affinity agonist binding to cloned 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptors is not sensitive to GTP analogs. *Mol Pharmacol* 43 : 915-920.

Takeuchi Y., Kimura H., Matsuura T., Yonezawa T. and Sano Y. (1983) Distribution of serotonergic neurons in the central nervous system: a peroxidase-antiperoxidase study with anti-serotonin antibodies. *J Histochem Cytochem* 31 :181-185.

Talvik-Lotfi M., Nyberg S., Nordstrom A.L., Ito H., Halldin C., Brunner F. and Farde L. (2000) High 5-HT<sub>2A</sub> receptor occupancy in M100907--treated schizophrenic patients. *Psychopharmacology (Berl)*.148 :400-403.

Teitler M., Leonhardt S., Weisberg E.L. and Hoffman B.J. (1990) 4-[<sup>125</sup>I]Iodo-(2,5-dimethoxy)phenylisopropylamine and [<sup>3</sup>H]ketanserin labeling of 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> (5-HT<sub>2</sub>) receptors in mammalian cells transfected with a rat 5-HT<sub>2</sub> cDNA : evidence for multiple states and not multiple 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 38 : 594-598.

Terrillon S. and Bouvier M. (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO reports* 5 : 30-34.

- Tilakaratne N. and Friedman E. (1996) Genomic responses to 5-HT<sub>1A</sub> or 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor activation is differentially regulated in four regions of rat brain. *Eur J Pharmacol* 307 : 211-217.
- Titeler M., Lyon R.A. and Glennon R.A. (1988) Radioligand binding evidence implicates the brain 5-HT<sub>2</sub> receptor as a site of action for LSD and phenylisopropylamine hallucinogens. *Psychopharmacology* 94 :213-216.
- Törk I. (1990) Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci* 600 : 9-35.
- Touri F., Welker E. and Reiderer B.M. (2004) Differential distribution of MAP1A isoforms in the adult mouse barrel cortex and comparison with the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *J Chem Neuroanat* 27 : 99-108.
- Vaidya V.A., Marek G.J., Aghajanian G.K. and Duman R.S. (1997) 5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J Neurosci* 17 : 2785-2795.
- Vaillant A.R., Müller R., Langkopf A. and Brown D.L. (1998) Characterization of the microtubule-binding domain of microtubule-associated protein 1A and its effects on microtubule dynamics. *J Biol Chem* 273 : 13973-13981.
- Vallee R.B. (1986) Purification of brain microtubules and microtubule-associated protein 1 using taxol. *Meth Enzymol* 134 : 104-115.

- VanderMaelen C.P. and Aghajanian G.K. (1980) Intracellular studies showing modulation of facial motoneurone excitability by serotonin. *Nature* 287 : 346-347.
- Vanderwolf C.H., Baker G.B. and Dickson C. (1990) Serotonergic control of cerebral activity and behaviour : models of dementia. *Ann N Y Acad Sci* 600 : 366-382.
- van Hooft J.A. and Yakel J.L. (2003) 5-HT<sub>3</sub> receptors in the CNS : 3B or not 3B ? *Trends in Pharmacol Sci* 24 : 157-160.
- Van Oekelen D., Luyten W.H.M.L. and Leysen J.E. (2003) 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors and their atypical regulation properties. *Life Sci* 72 : 2429-2449.
- Vergé D., Daval G., Marcinkiewicz M., Patey A., El Mestikawy S., Gozlan H. and Hamon M. (1986) Quantitative autoradiography of multiple 5-HT<sub>1</sub> receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci* 6 : 3474-3482.
- Vergé D. and Calas A. (2000) Serotonergic neurons and serotonin receptors : gains from cytochemical approaches. *J Chem Neuroanat* 18 : 41-56.
- Versijpt J., Van Laere K.J., Dumont F., Decoo D., Vandecapelle M., Santens P., Goethals I., Audenaert K., Slegers G., Dierckx R.A. and Korf J. (2003) Imaging of the 5-HT<sub>2A</sub> system : age-, gender-, and Alzheimer's disease-related findings. *Neurobiol Aging* 24 : 553-561.
- Voet D. and Voet J.G. (1998) *Biochimie*. Traduction de la deuxième édition américaine par Y. Gaudemer avec la collaboration de

H. Dulieu, N. Latruffe et J. Wallach. De Boeck Université. Paris, Bruxelles.

Vollenweider F.X., Leenders K.L., Scharfetter C., Maguire P., Stadelmann O. and Angst J. (1997) Positron emission tomography and fluorodeoxyglucose studies of metabolic hyperfrontality and psychopathology in the psilocybin model of psychosis. *Neuropsychopharmacology* 16 : 357-372.

Vollenweider F.X., Vollenweider-Scherpenhuyzen M.F.I., Babler A., Vogel H. and Hell D. (1998) Psilocybin induces schizophrenia-like psychosis in humans via a serotonin-2 agonist action. *NeuroReport* 9 : 3897-3902

Vouret-Craviari V., Auburger P., Pouyssegur J. and Van Obberghen-Schilling E. (1995) Distinct mechanisms regulate 5-HT<sub>2</sub> and thrombin receptor desensitization. *J Biol Chem* 270 :4813-4821.

Wada Y., Shiraishi J., Nakamura M. and Koshino Y. (1997) Role of serotonin receptor subtypes in the development of amygdaloid kindling in rats. *Brain Res* 747 :338-342.

Waeber C., Grailhe R., Yu X.J., Hen R. and Moskowitz M.A. (1998) Putative 5-HT<sub>5</sub> receptors : localization in the mouse CNS and lack of effect in the inhibition of dural protein extravasation. *Ann N Y Acad Sci* 861 : 85-90.

Waeber C., Zhang L.A. and Palacios J.M. (1990) 5-HT<sub>1D</sub> receptors in the guinea pig brain : pre- and postsynaptic localizations in the striatonigral pathway. *Brain Res* 528 : 197-206.

- Wang H., Bedford F.K., Brandon N.J., Moss S.J. and Olsen R.W. (1999) GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* 397 : 69-72.
- Watts S.W. (1998) Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway via the 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *Ann N Y Acad Sci* 861 : 162-168.
- Weissmann D., Belin M.F., Aguera M., Meunier C., Maitre M., Cash C.d., Ehret M., Mandel P. and Pujol J.F. (1987) Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *Neuroscience* 23 : 291-304.
- Westkaemper R.B. and Glennon R.A. (1993) Molecular graphics models of members of the 5-HT<sub>2</sub> subfamily: 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Med Chem Res* 3 : 317-334.
- Wilkinson L.O. and Dourish C.T. (1991) Serotonin and animal behavior. In J.C. Venter and L.C. Harrison (series eds) *Receptor Biochemistry and Methodology*, volume 15 : J.S. Peroutka (ed) *Serotonin Receptor Subtypes, Basic and Clinical Aspects*, Wiley-Liss, New-York, pp.147-210.
- Williams G.V., Rao S.G. and Goldman-Rakic P.S. (2002) The physiological role of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in working memory. *J Neurosci* 22 : 2843-2854.
- Willins D.L. and Meltzer H.Y. (1997) Direct injection of 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonist into the medial prefrontal cortex produces a head-twitch response in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 282 :699-706.



- Willins D.L., Deutch A.Y., and Roth B.L. (1997) Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. *Synapse* 27: 79-82.
- Willins D.L., Berry S.A., Alsayegh L., Backstrom J.R., Sanders-Bush E., Friedman L. and Roth B.L. (1999) Clozapine and other 5-hydroxytryptamine-2A receptor antagonists alter the subcellular distribution of 5-hydroxytryptamine-2A receptors *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience* 91 : 599-606.
- Willner P. (1997) The dopamine hypothesis of schizophrenia : Current status, future prospects. *Int Clin Psychopharmacol* 12 : 297-308.
- Woolley M.L., Bentley J.C., Sleight A.J., Marsden C.A. and Fone K.C.F. (2001) A role for 5-HT<sub>6</sub> receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. *Neuropharmacology* 41 : 210-219.
- Wouters W., Van Dun J. and Laudron P.M. (1987) Identification of the serotonin-5<sub>2</sub> receptor ligand binding site by photoaffinity labelling with 7-azido-8-[<sup>125</sup>I]ketanserin ([<sup>125</sup>I]AZIC). *FEBS Lett* 213 :359-364
- Wright D.E., Serogy K.B., Lundgren K.H., Davis B.M., and Jennes L. (1995) Comparative localization of serotonin 1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J Comp Neurol* 351:357-373.
- Wu C., Yoder E., Shi L., Wei J., Dias P., Monell C.R., Ellisman H. and Singh S. (1995) Development of monoclonal antibodies to the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *Soc Neurosci Abstr* 21 : 1126.

- Wu C., Yoder E.J., Shih J., Chen K., Dias P., Shi L., Ji X-D., Wei J., Conner J.M., Kumar S., Ellisman M.H. and Singh S.K. (1998) Development and characterization of monoclonal antibodies specific to the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *J Histochem Cytochem* 46:811-824.
- Xia Z., Gray J.A., Compton-Toth B.A. and Roth B.L. (2003a) A direct interaction of PSD-95 with 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction. *J Biol Chem* 278 : 21901-21908.
- Xia Z., Hufeisen S.J., Gray J.A., and Roth B.L. (2003b) The PDZ-binding domain is essential for the dendritic targeting of 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptors in cortical pyramidal neurons *in vitro*. *Neuroscience* 122 : 907-920.
- Xie Z., Lee S.P., O'Dowd B.F. and George S.R. (1999) Serotonin 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. *FEBS Lett* 456 : 63-67.
- Xu T. and Pandey S.C. (2000) Cellular localization of serotonin<sub>2A</sub> (5-HT<sub>2A</sub>) receptors in the rat brain. *Brain Res Bulletin* 51 : 499-505.
- Yuan Q., Harley C.W. and McLean J.H. (2003) Mitral cell beta1 and 5-HT<sub>2A</sub> receptor colocalization and cAMP coregulation: a new model of norepinephrine-induced learning in the olfactory bulb. *Learn Mem* 10 : 5-15.

- Zetterström T.S.C., Pei Q., Madav T.R. and Grahame-Smith D.G. (1999) Manipulation of brain 5-HT levels affect gene expression for BDNF in rat brain. *Neuropharmacology* 38 : 1063-1073.
- Zhang Y., Damjanoska K.J., Carrasco G.A., Dudas B., D'Souza D., Tetzlaff J., Garcia F., Sullivan Hanley N.R., Scripathirathan K., Petersen B.R., Gray T.S., Battaglia G., Muma N.A. and Van de Kar L.D. (2002) Evidence that 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus mediate neuroendocrine responses to (-)DOI. *J Neurosci* 22 : 9635-9642.
- Zhou F.M. and Hablitz J.J. (1999) Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *J Neurophysiol* 82 :2989-2999.
- Zifa E. and Fillion G. (1992) 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacological Rev* 44 : 401-458.
- Zilles and Wree (1995) Cortex: Areal and laminar structure. In G. Paxinos (ed): *The rat nervous system*, second edition. Academic Press. San Diego.

**ANNEXE**

## Transmitter–Receptor Mismatches in Central Dopamine, Serotonin, and Neuropeptide Systems

*Further Evidence for Volume Transmission*

---

Anders Jansson, Laurent Descarries, Virginia Cornea-Hébert,  
Mustapha Riad, Daniel Vergé, Mircea Bancila,  
Luigi Francesco Agnati, and Kjell Fuxe

### 1. INTRODUCTION

In the central nervous system (CNS), the existence of neurotransmitter-defined neurons, with projections showing a regional distribution distinctly separate from that of the corresponding receptors on target cells, represents a compelling argument in favor of volume transmission (VT). Such mismatches imply that the transmitter reaches its functional targets by diffusion into the extracellular space (ECS) (1–4), as initially postulated to be the case for cortical monoamines released from axon terminals (varicosities) often lacking synaptic membrane specializations (5; for review, see refs. 6 and 7). In the past 10 yr, it has been further realized that the VT modality may also apply to entirely synaptic neuronal systems, such as those using  $\gamma$ -aminobutyric acid and glutamate, in which spillover of transmitter beyond synaptic clefts has been described (8–10). This chapter focuses on recent immunofluorescence, confocal laser, and immunoelectron microscopic (IEM) observations, which illustrate the diversity of topological relationships between dopamine (DA)-, serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT])- and neuropeptide (NP)-containing neurons and their receptors in various regions of the brain. The clinical relevance of some of these data is also emphasized (11). Noradrenaline and acetylcholine systems are not considered here, since they have been recently reviewed elsewhere (7,12,13). In each of these transmitter-defined systems, and presumably many others, the bulk of the data supports the view that VT plays a major role throughout the CNS.

### 2. DOPAMINE (DA) SYSTEM

In several DA-innervated regions, which have not all been systematically examined for the synaptic frequency of their DA varicosities, the evidence for VT comes mostly from some of the striking mismatches observed by light microscopic immunocytochemistry between these axon terminals and DA receptors, and from IEM observations on

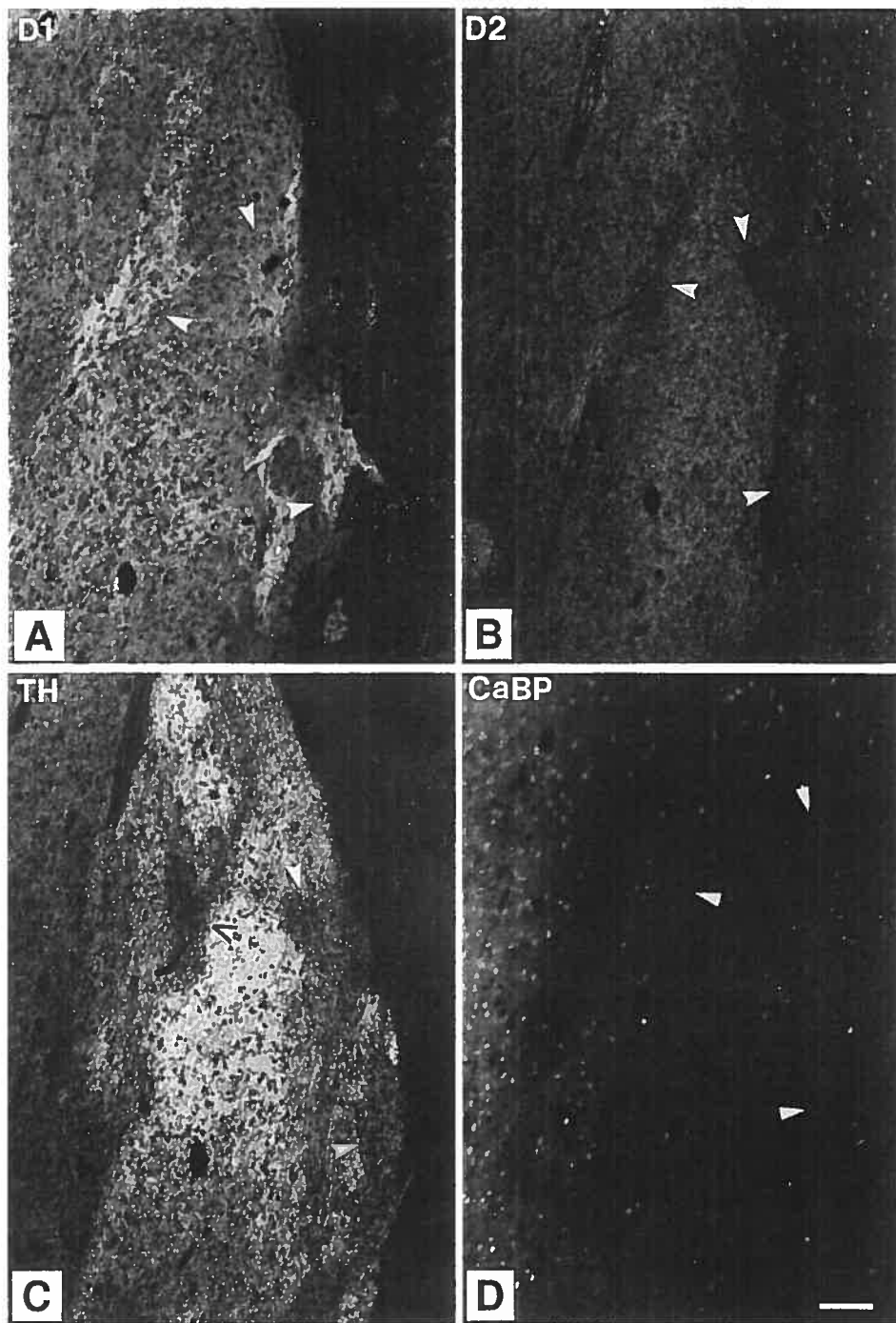
the subcellular distribution of the latter, combined or not with a simultaneous visualization of the DA terminals.

A detailed immunofluorescence analysis of the distribution of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors, in relation to tyrosine hydroxylase (TH)- and DA transporter-labeled elements has recently been carried out in the rat nucleus accumbens (14). In the dorsomedial part of the shell of this nucleus, the existence of patches with a high density of D<sub>1</sub> receptors, but a low density of D<sub>2</sub> receptors, TH, and DA transporter were demonstrated (Figs. 1 and 2). In contrast, these D<sub>1</sub>-rich, but poorly DA-innervated, patches were surrounded by a high density of TH-containing nerve terminals, coincident with the distribution of D<sub>2</sub> receptors. These D<sub>1</sub>-rich patches formed a continuous tubular-shaped network through the shell of the nucleus, suggesting that its population of D<sub>1</sub>-bearing neurons may be modulated by DA released and having diffused from surrounding DA nerve terminals.

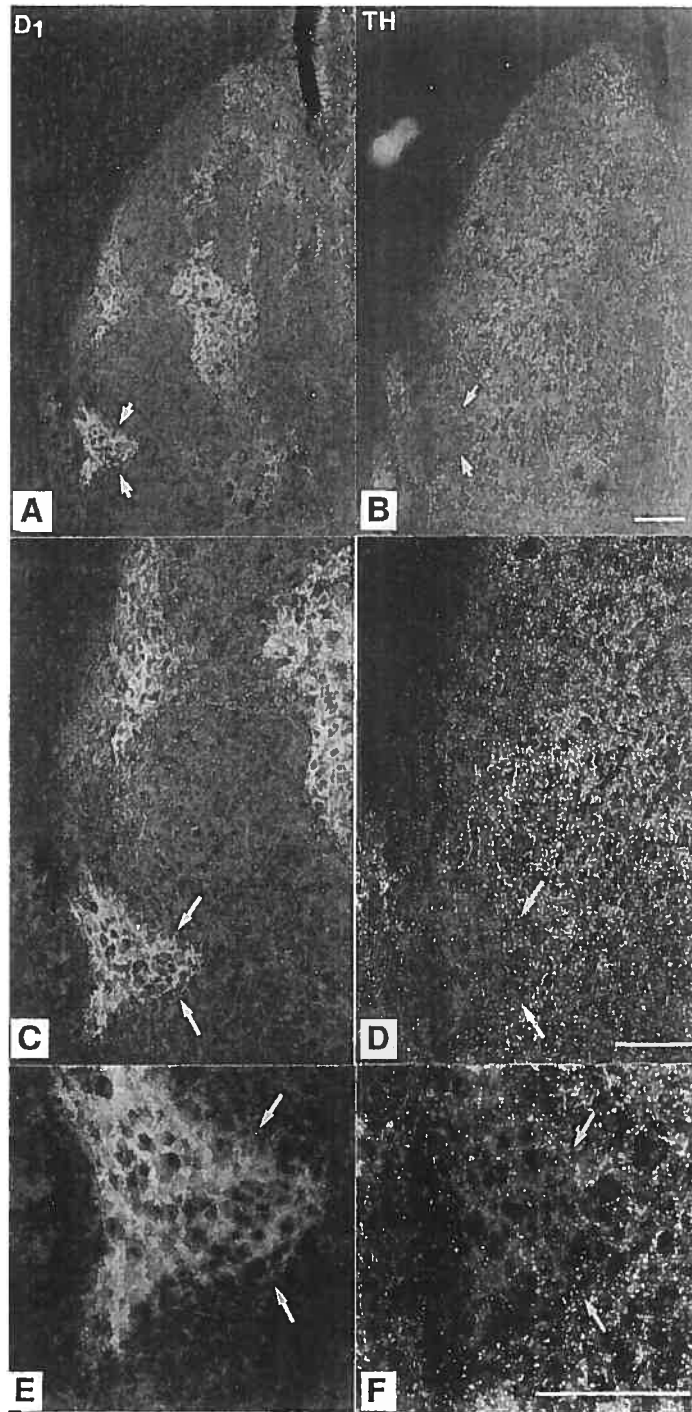
Extensive observations were also made in the islands of Calleja complex (ICC), which consists of dense aggregations of small granule cells (7–9 μm), closely grouped together and showing somatic appositions compatible with ephaptic (electrical) coupling (15). A recent study (16) has shown that activation of D<sub>3</sub> receptors in the ICC results in the formation of gap junctions between its granule cells. The DA afferents from the substantia nigra and ventral tegmental area do not reach into the ICC, but mostly form a dense network around its islets (17,18). Only a few fine DA fibers enter the core of the islets (*see ref. 19*), as also described previously for cholecystokinin and substance P (SP) fibers (20). Abundant D<sub>3</sub>-receptor mRNA and a high density of D<sub>3</sub> receptor binding sites are present in most ICC granule cells (21–25). D<sub>1</sub> receptors are also expressed in these cells, as indicated by high D<sub>1</sub> mRNA levels, a high density of D<sub>1</sub> receptor binding sites, and functional responses to D<sub>1</sub> receptor activation (26–29). The presence of these two DA receptor subtypes, away from the corresponding afferents, strongly argues in favor of VT/modulation by DA in the ICC.

In the neostriatum of rat, the asynchronous nature of 60–70% of DA terminals, identified electron microscopically after [<sup>3</sup>H]DA uptake autoradiography or DA immunocytochemistry (30), has provided a strong indication of a dual mode of communication, diffuse as well as synaptic. A major extrasynaptic localization of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors has been described in several parts of the basal ganglia of rat, monkey, and human (28,31,32). In rat neostriatum, it has been emphasized that a majority of membrane-associated D<sub>1</sub> or D<sub>2</sub> receptors were located along portions of dendrites lacking a synaptic input. Extracellular (EC) DA concentrations are presumably sufficient to activate high-affinity D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in the basal ganglia (33), especially in view of the increases in EC efflux of DA associated with burst firing (34). It has been calculated that the distance traveled by DA molecules in the ECS might be on the order of 10 μm during one half-life (33,35). This could allow DA, released from nonjunctional varicosities and spilling over from synaptic varicosities, to exert its influence on several thousand neighboring axon terminals or dendritic spines, provided that these potential targets are endowed with high-affinity DA receptors (for bases of this estimate, *see ref. 12*).

The major mechanism for terminating EC DA signaling is the plasma membrane transporter for DA (36), located along all parts of DA neurons, but outside synapses (37,38). Intraregional differences in the release of DA have already been documented in the neostriatum of adult rat (39,40), presumably corresponding to the islands and



**Fig. 1.** Patches of D<sub>1</sub> receptor-immunoreactivity in the shell of the nucleus accumbens (bregma 1.5 mm; adult rat). As shown in (A), these form rostrally running bands on consecutive sections. Note the lack of immunoreactivity to D<sub>2</sub> receptor (B) and TH (C) in the corresponding areas of adjacent 10- $\mu$ m-thick sections. Calbindin immunoreactivity is weak in this region (D). Immunofluorescence microphotographs. Scale bar = 100  $\mu$ m.



**Fig. 2.** Double immunofluorescence labeling with a polyclonal D<sub>1</sub> receptor Ab and a mouse monoclonal TH Ab in the shell of nucleus accumbens (11-day-old rat). Arrows designate the patches of strong D<sub>1</sub>-immunoreactivity (A,C,E) and low TH-immunoreactivity (B,D,F). (For details, *see ref. 14*). Scale bar = 100  $\mu$ m.



matrix of hyperdense and dense DA innervation, respectively (41). A similar heterogeneity might be expected in the nucleus accumbens, in view of its patchy DA innervation. Moreover, a higher density of plasmalemmal transporter immunoreactivity has been reported on DA axons in the core vs the shell of the nucleus accumbens (38). Recent IEM observations (42) on DA (TH-immunostained) terminals in the prelimbic division of rat prefrontal cortex have shown that the membrane transporter for DA predominates on preterminal or intervaricose axon segments, compared to axon varicosities. Such a location of the DA transporter away from release sites may be in keeping with the even greater diffusion of DA measured in the prefrontal cortex, compared with the striatum (43). It could also account for the markedly higher release rate and lower uptake of DA in this brain region (44).

The issue of VT is clearly of relevance in the pathophysiology and treatment of Parkinson's disease. Considerable experimental evidence indicates that the loss of nigrostriatal DA innervation underlying this disease may be, at least initially, compensated by DA spreading from residual DA terminals (30,45–50). In a recent study showing spontaneous recovery in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated cats (50), decrease DA uptake by surviving DA neurons has also been suggested as a possible compensatory mechanism. Of similar interest was the finding of a regional downregulation of TH in mice lacking DA transporter (51), a reduction more pronounced in the dorsal striatum than in nucleus accumbens, where the uptake of DA is purported to be less efficient (52). It may then be expected that the treatment of patients with Parkinson's disease would benefit from an efficient DA transporter inhibition, increasing the residual levels of DA, and thus compensating for the loss of DA terminals via VT mechanisms (49,53).

### 3. SEROTONIN SYSTEM

5-HT neurons (54–56) have long been known to innervate the brain with axon varicosities (terminals) that often lack morphologically defined synaptic specializations (5). For example, in rat neocortex, neostriatum, and hippocampus, the synaptic incidence of 5-HT terminals has been shown to be in the order of 20–45%, depending on the region and/or the layer considered (57). In the cerebral cortex, both junctional and nonjunctional 5-HT varicosities have been observed along the same axons (58), dispelling the suggestion of two categories of terminals issued from different cell groups of origin (59). The existence of asynaptic cortical 5-HT varicosities has now been confirmed in all mammalian species examined, including primates, strengthening the view of a widely distributed system using both volume and wiring modalities of transmission (7).

The cyclic voltammetry studies of Bunin et al. (60–62) on rat brain slices, comprising the mesencephalic raphe nuclei and substantia nigra, have provided functional evidence for VT from synaptic, as well as asynaptic, 5-HT release sites. Those authors demonstrated comparable electrically evoked diffusion of 5-HT in the substantia nigra, pars reticulata, in which an abundant 5-HT innervation is known to be entirely junctional (63), and in the dorsal raphe nucleus, where most of the rare 5-HT varicosities appear to be nonjunctional (64) and 5-HT release occurs mostly from somata/dendrites (65–68). Such results clearly indicate that rises in EC 5-HT, upon electrical stimulation, may be derived from leaky synapses, as well as 5-HT somata/dendrites and/or

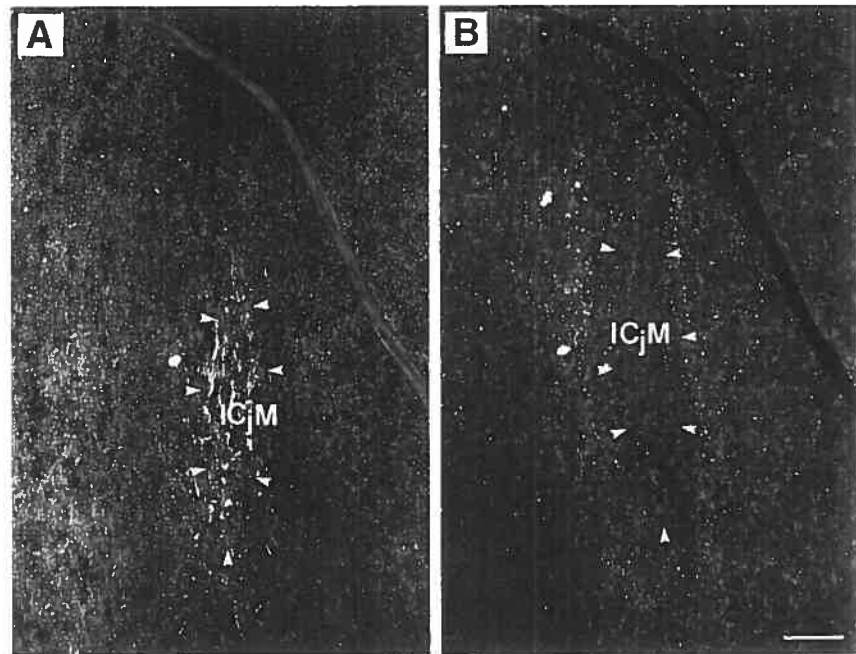
asynaptic varicosities. Moreover, in the substantia nigra, they have led to estimating the half-life of 5-HT in the order of 200 ms, during which diffusion could take place over 20  $\mu\text{m}$  (61), which is a huge distance at the subcellular level.

Recent IEM studies (69,70) on the ultrastructural distribution of the plasma membrane transporter for 5-HT have also yielded results consistent with a diffusion of 5-HT away from synaptic and/or asynaptic release sites. A predominant localization of the transporter along nonsynaptic portions of the membrane of 5-HT axons was then demonstrated in several regions of adult rat brain: Uptake experiments confirmed that the transporter was indeed functional in such a location (69). Additional studies (71) have shown the 5-HT transporter to be scant on the membrane of 5-HT neuron somata/dendrites, and mostly concentrated along extrasynaptic portions of the axolemma of their axons and varicosities.

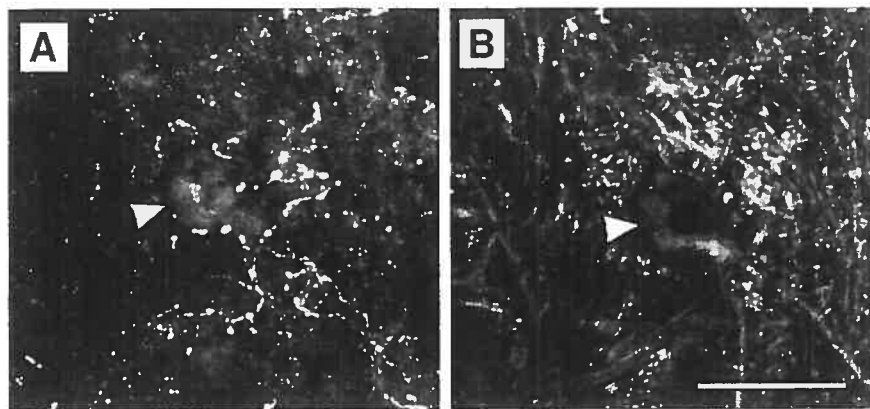
As in the case of DA, double immunolabeling experiments at the light microscopic level have been carried out to investigate the spatial relationships between 5-HT neurons and some of their receptor targets. For example, using anti-5-HT and anti-5-HT<sub>2A</sub> receptor antibodies (Abs) in nucleus raphe pallidus of the medulla oblongata, 5-HT<sub>2A</sub>-immunoreactive axon-like processes were found within the dendritic arbors of 5-HT-immunoreactive neurons (72,73). In this instance, both types of processes remained a short (10–50  $\mu\text{m}$ ) distance away from each another, suggesting that these 5-HT<sub>2A</sub> receptors may be activated by somatodendritically released 5-HT that reaches them by diffusion. In the ICC, a striking 5-HT–5-HT<sub>2A</sub> receptor mismatch was observed, resembling that of the DA system (Fig. 3). A large number of 5-HT<sub>2A</sub>-immunoreactive somata/dendrites contrasted with a paucity of 5-HT-immunoreactive fibers in the islets proper and Calleja magna; these were surrounded by a strong 5-HT innervation (73).

In contrast, in the facial and trigeminal motor nuclei (Fig. 4), point-to-point relationships were apparent between 5-HT axon varicosities and the dendritic branches of large motor neurons showing 5-HT<sub>2A</sub> receptors, in keeping with previous electron microscopic demonstrations of the existence of axosomatic and axodendritic synapses formed by 5-HT varicosities in these two nuclei (74,75). Similarly, 5-HT-immunopositive axons, abutting on 5-HT<sub>2A</sub> immunopositive neurons, were visible in the nucleus ambiguus, where the existence of direct appositions between both types of elements has in fact been established by dual IEM labeling (Fig. 5). In the ventral tegmental nucleus, there was no relation of proximity between 5-HT-immunoreactive terminals and 5-HT<sub>2A</sub>-immunoreactive cell bodies and dendrites. Instead, these 5-HT<sub>2A</sub>-immunoreactive neurons are presumably reached by diffusion of 5-HT released from cell bodies and dendrites in the neighboring dorsal raphe nucleus or 5-HT axons passing through this nucleus (72).

Such a diversity of topological relationships between 5-HT elements and one of their receptor targets should be sufficient evidence in itself that 5-HT transmission/modulation may involve both VT and wiring transmission. In many regions of adult rat brain and the spinal cord, however, it has also been possible to investigate the distribution of the 5-HT<sub>2A</sub> receptors at the ultrastructural level. After immunogold labeling, it was then found that these 5-HT receptors are mainly cytoplasmic, rather than membrane-bound, whether located on the somata, dendrites, or myelinated axons of central neurons (76). Of particular interest was their prominent localization in pyramidal neurons of adult rat cerebral cortex (77,78), in which quantitative analysis after



**Fig. 3.** Double immunofluorescence labeling for 5-HT<sub>2A</sub> receptor (A) and 5-HT itself (B) in the basal forebrain (bregma 1.2 mm; adult rat). Although strongly 5-HT<sub>2A</sub>-immunoreactive processes, probably dendrites, are visualized in the island of Calleja magna (ICjM) (A), a dense network of 5-HT-immunoreactive nerve terminals surrounds this island (B). Arrowheads indicate the border of the ICjM (*see also ref. 73*). Scale bar = 50  $\mu$ m.

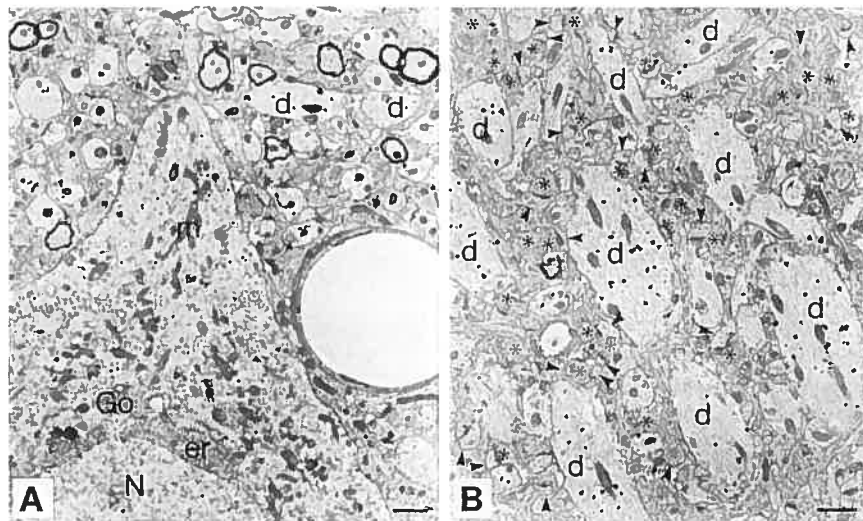


**Fig. 4.** Double immunofluorescence labeling in the facial nucleus (adult rat), showing 5-HT-immunoreactive terminals in close relationships with a 5-HT<sub>2A</sub>-immunoreactive neuronal cell body. Scale bar = 50  $\mu$ m.

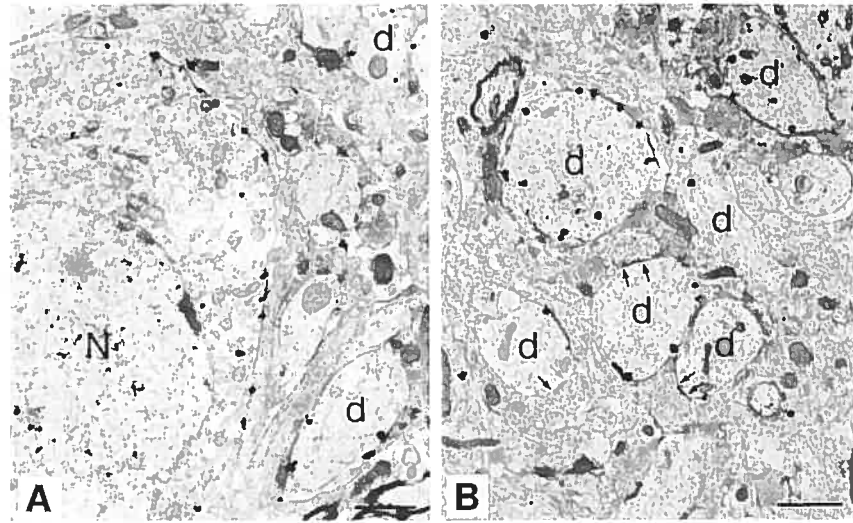
immunogold labeling excluded any enrichment of the plasma membrane (76; Fig. 6). Moreover, in these and other spiny dendrites, the 5-HT<sub>2A</sub> receptors were always absent from dendritic spines, even though these represent a major site of synaptic afferents



**Fig. 5.** Double immuno-electron microscopic labeling for 5-HT (rabbit polyclonal anti-5-HT Ab/DAB labeling) and 5-HT<sub>2A</sub> receptor (mouse monoclonal Ab/immunogold labeling) in the nucleus ambiguus (adult rat). A DAB-labeled 5-HT axon terminal (A) is visualized in direct apposition with at least two dendrites (D) displaying internal 5-HT<sub>2A</sub> receptor. Scale bar = 10  $\mu$ m.



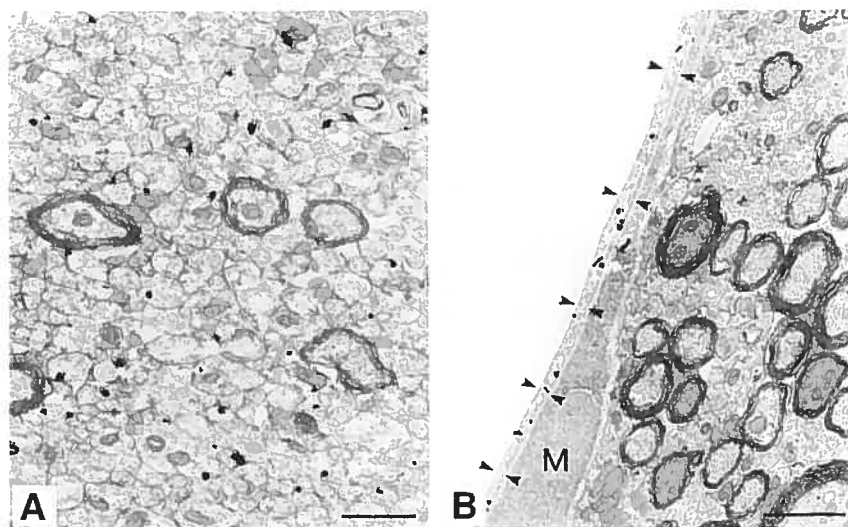
**Fig. 6.** Electron micrographs from layer V of the parietal cortex (adult rat), illustrating the subcellular localization of immunogold-labeled 5-HT<sub>2A</sub> receptors. In both, the cell body of a pyramidal neuron (A) N in nucleus, and relatively large dendrites (d) in the neuropil (B), most of the immunogold particles are found in the cytoplasm, and very few on the plasma membrane. In (A), note the absence of labeling on the endoplasmic reticulum (er), Golgi apparatus (Go), and mitochondria (m). In (B), note that dendritic spines (arrowheads), as well as axon terminals (asterisks) remain immunonegative. Scale bar = 1  $\mu$ m. (Adapted with permission from ref. 78a.)



**Fig. 7.** Immunogold labeling of 5-HT<sub>1A</sub> receptors on part of a neuronal cell body (A) N in nucleus, and dendrites (A and B) in the nucleus raphe dorsalis (adult rat). In both the cell body and dendrites, most of the immunogold particles are associated with the plasma membrane. In dendrites, however, such particles are never seen on postsynaptic specializations (between arrows in [B]). Scale bar = 1  $\mu$ m. (Adapted with permission from ref. 78b and 82).

(Fig. 6B). The suggestion was therefore made that 5-HT<sub>2A</sub> receptors are permanently internalized under physiological conditions, and that one of their main functions is to participate in retrograde signaling processes, activated also by other 5-HT receptors located on the same cells. In IF experiments, a redistribution of 5-HT<sub>2A</sub> receptors from apical dendrites into the cell bodies of pyramidal cortical neurons, has now been reported *in vivo* and *in vitro*, following treatment with the atypical antipsychotic, clozapine (79,80). This observation lends further support to a retrograde signaling function of 5-HT<sub>2A</sub> receptors.

Electron microscopic observations after immunogold labeling have also been made on both 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors in adult rat brain (81–84). In nucleus raphe dorsalis, where 5-HT<sub>1A</sub> receptors are known to behave as autoreceptors, their immunogold labeling was exclusively on the somata/dendrites of 5-HT neurons, and exhibited a clearcut predilection for the plasma membrane, but to the exclusion of its synaptically differentiated portions (Fig. 7). Because this 5-HT nucleus receives only a scant, mostly asynaptic, 5-HT innervation (64), presumably from other raphe nuclei, it could be assumed that these high-affinity autoreceptors are activated by somatodendritically released 5-HT. In the hippocampal formation, both the somata and dendrites of pyramidal and granule cells displayed extrasynaptic, membrane-associated 5-HT<sub>1A</sub> heteroreceptors, which appeared to be particularly abundant on the dendritic spines of pyramidal cells, at least in CA3 (82). In this hippocampal sector, not only is the 5-HT innervation known to be mostly asynaptic, but it has also been shown to synaptically contact only dendritic branches, and never dendritic spines (85). Thus, in every respect, the topological relationships between 5-HT somata/dendrites or axon terminals and 5-HT<sub>1A</sub> auto- and heteroreceptors favor the diffuse transmission paradigm.



**Fig. 8.** Immunogold labeling of 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the globus pallidus (adult rat). In this field of neuropil, (A), most of the immunogold particles are associated with the membrane of fine, unmyelinated, preterminal axons. On a nearby microvessel, (B), the immunogold labeling is confined to the endothelial lining (between arrowheads), and spares an underlying myocyte (M in nucleus). Scale bar = 1  $\mu$ m. (Adapted with permission from ref. 78b and 82).

5-HT<sub>1B</sub> receptors have been visualized in both the substantia nigra and globus pallidus of adult rat (82–84; Fig. 8). These receptors were then shown to be preferentially located on the membrane of fine, unmyelinated, preterminal axons, presumably belonging to striatonigral and striatopallidal neurons (Fig. 8A). 5-HT<sub>1B</sub> receptors on nerve terminals in the substantia nigra and superior colliculus were consistently found in extrasynaptic locations (83,84). A selective localization to the cytoplasm of endothelial cells of cerebral microvessels was also observed (81; Fig. 8B). The presence of 5-HT<sub>1B</sub> receptors on the membrane of preterminal axons suggested that they may mediate a 5-HT control of transmitter release through effects on axonal conduction. Together with their microvascular localization, it represents a further aspect of 5-HT function that appears incompatible with wiring transmission.

It seems likely that novel antidepressants, such as fluoxetine, which selectively block the 5-HT transporter, exert their therapeutic effects through increased EC levels of 5-HT. These will then activate extrasynaptic 5-HT receptor subtypes that may be otherwise silent or merely mediating long-term influences of an ambient, resting level of 5-HT. The 5-HT<sub>2A</sub> receptors, and notably their downregulation, have been implicated in the etiology of depression (86–90). Their involvement is further evidenced by clinical and genetic observations of altered 5-HT<sub>2A</sub> receptor function in depressed patients (91–93), and by their mediation of estrogen- or androgen-induced mood changes in animals (94,95).

5-HT<sub>1A</sub> receptors are a major target for psychotherapeutic drugs (96). The implication of these receptors in the therapeutic efficacy of antidepressants is well-established (97). In particular, their desensitization as autoreceptors on the somata/dendrites of 5-HT neurons in the dorsal raphe nucleus accounts for the therapeutic delay following

treatment with monoamine oxidase inhibitors or selective 5-HT reuptake inhibitors (98). A recent study in adult rat has provided an explanation for this desensitization. Using quantitative IEM, after treatment with the selective 5-HT<sub>1A</sub> agonist, 8-hydroxy-2-(*n*-dipropylamine)tetralin hydrobromide, a significant decrease in the amount of receptor located on the membrane of dorsal raphe somata/dendrites, and increase in their cytoplasmic labeling, was demonstrated 1 h after intravenous injection of the drug (99).

These findings are in keeping with previous electrophysiological results having shown a desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors after treatment with selective 5-HT reuptake inhibitors (100). They strongly suggest that this desensitization is the result of an internalization. Internalization of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors would thus prevent inhibition of the firing of 5-HT neurons and their release of 5-HT, and hence increase their functional activity upon stimulation.

#### 4. PEPTIDERGIC SYSTEMS

During the past decade, considerable attention has been devoted to the diverse properties of NPs, several of which are now recognized as neuromodulators with potent physiological effects. There have been no systematic studies to determine the synaptic or asynaptic character of these innervations, but mismatches between presumed sites of NP release and their receptors were recognized early, during investigations of the distribution of  $\beta$ -endorphin- and enkephalin-immunoreactive terminals and opiate receptor binding sites (2,3). Furthermore, it was subsequently documented that exogenous neuropeptide tyrosine (NPY) (4),  $\beta$ -endorphin and prolactin (101) may diffuse for long distances in brain, and that endogenously released  $\beta$ -endorphin seems capable also of globally modulating brain function via the cerebrospinal fluid (CSF) (102). Topographical analysis of these systems has also greatly benefited from the development of specific Abs against various NP receptors, allowing analysis of the relationships between release and target sites, by double immunolabeling at both the light and electron microscopic levels.

##### 4.1. Enkephalin

The light microscopic observations of a mismatch between putative opioid binding and release sites have now been confirmed by immunofluorescence observations on the distribution of opioid receptors and axon terminals. In rat entopeduncular nucleus, for example, enkephalin-immunoreactive terminals were found in a medial subregion; the neuronal cell bodies and dendrites bearing delta-opioid receptor were located laterally, suggesting VT signaling (103). Whether such remote delta-opioid receptors are fully functional, or are spare receptors (104), remains to be established, but they may be reached by EC  $\beta$ -endorphin released from surrounding plexa of  $\beta$ -endorphin terminals or coming from the CSF (102). An IEM study of rat dentate gyrus (105) has demonstrated delta-opioid receptors in granule and nongranule cell bodies, dendrites, dendritic spines, axon terminals, and astroglia. It concluded that the distribution of these profiles overlapped with, but was not restricted to, regions known to contain enkephalin. Again, such delta-opioid receptors could be reached by  $\beta$ -endorphin from the CSF.

In early electron microscope autoradiographic studies of rat neostriatum with radioligands,  $\mu$ -opioid receptors were observed in para- and extrasynaptic locations,

along the plasma membrane of somata/dendrites and axons (106). More recently, a double-immunolabeling study of  $\mu$ -opioid receptors and leu<sup>5</sup>-enkephalin, carried out in the patch compartment of neostriatum (107), also demonstrated an extrasynaptic plasma membrane distribution of these receptors on the soma-dendrites of spiny neurons, including some containing leu<sup>5</sup>-enkephalin.  $\mu$ -opioid receptors were also found in axon terminals, some of which contained leu<sup>5</sup>-enkephalin then did not form recognizable synaptic junctions. Opioids, acting in an autocrine or paracrine fashion, might thus be in a position to exert a variety of effects. They could modulate their own release from either somata/dendrites or axon terminals through autoreceptors, but also influence neuronal excitability and/or the release of other transmitters through somatodendritic and axon terminal heteroreceptors. Moreover, they are likely to exert these effects as coexistent transmitters, as already shown for other peptides, such as galanin in the noradrenaline neurons of rat locus coeruleus (108).

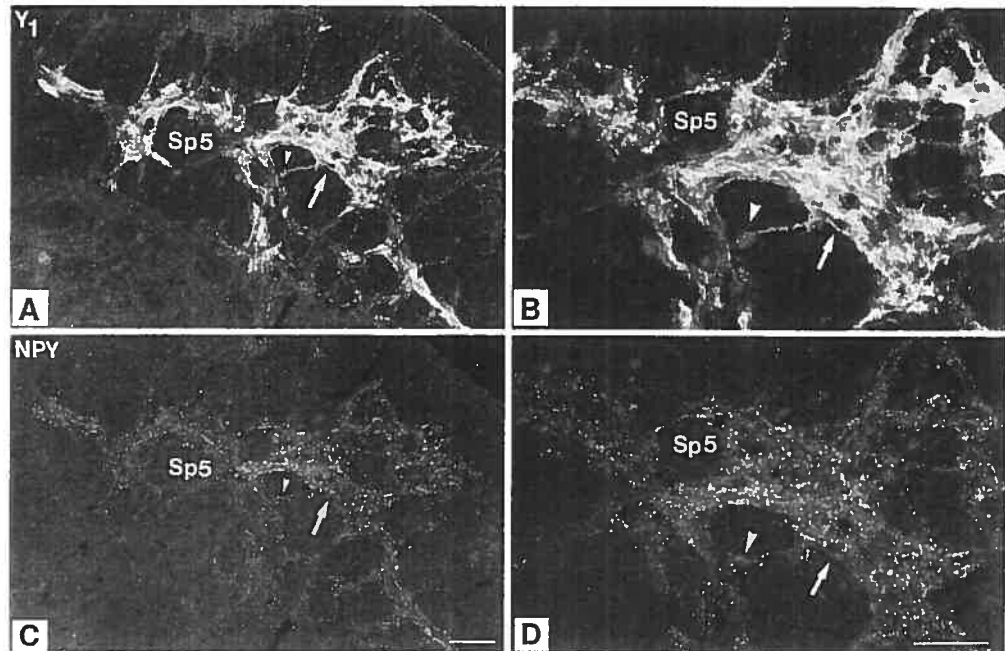
#### 4.2. Neuropeptide Y

Early immunocytochemical studies of NPY and its receptors also revealed significant mismatches (4,109). This work has now been extended by detailed immunocytochemical observations of NPY terminals and Y1 receptor bearing profiles in the same rat brain sections (110). In the hippocampal formation, there were no close associations between Y1-immunopositive somata and dendrites and a sparse plexus of weakly NPY-immunoreactive nerve terminals. This contrasted with areas of co-distribution of the two markers in the hypothalamus (paraventricular nucleus and dorsomedial nucleus). In the arcuate nucleus, some of the cell bodies and dendrites showing Y1 receptors and also immunoreactive for  $\beta$ -endorphin (111), were closely surrounded by NPY terminals, suggesting appositional or synaptic contacts in addition to short-distance relationships ( $\mu\text{m}$  range). In the rostral and dorsal part of the spinal tract nucleus of the Vth nerve (Fig. 9), the area displaying Y1-immunoreactive neurons was considerably larger than that pervaded by NPY terminals, suggesting activation of the constituent neurons by diffusing NPY, in addition to point-to-point contacts. More caudally, the distance between the terminals and receptors was even greater, the former being confined to the superficial layer and the Y1-immunoreactive processes to the deeper magnocellular layer.

As with DA and 5-HT and some of their receptors, the ICC also displayed an obvious mismatch between NPY-immunoreactive terminals and Y1 receptors. The islands and Calleja magna were surrounded by a dense network of NPY terminals (Fig. 10); there were only a few within the ICC, in which numerous dendritic profiles exhibited a high density of Y1 receptors. Binding of a peptide YY derivative, selective for the Y1 receptor has previously been shown to be highly concentrated in the islands of Calleja (112). These findings imply that, in order to activate Y1 receptors in the islands, NPY released in their surroundings must diffuse for distances of 100–200  $\mu\text{m}$  (110).

Somewhat divergent observations were, however, made in a double-labeling IEM study (113) on the localization of Y1 receptors and NPY, carried out on rat nucleus accumbens. It was then shown that, in the core and shell of the nucleus, Y1 receptors were present within neuronal cell bodies, dendrites, and axon terminals that contained or were apposed to NPY-immunoreactive neurons, and also in numerous other spiny or





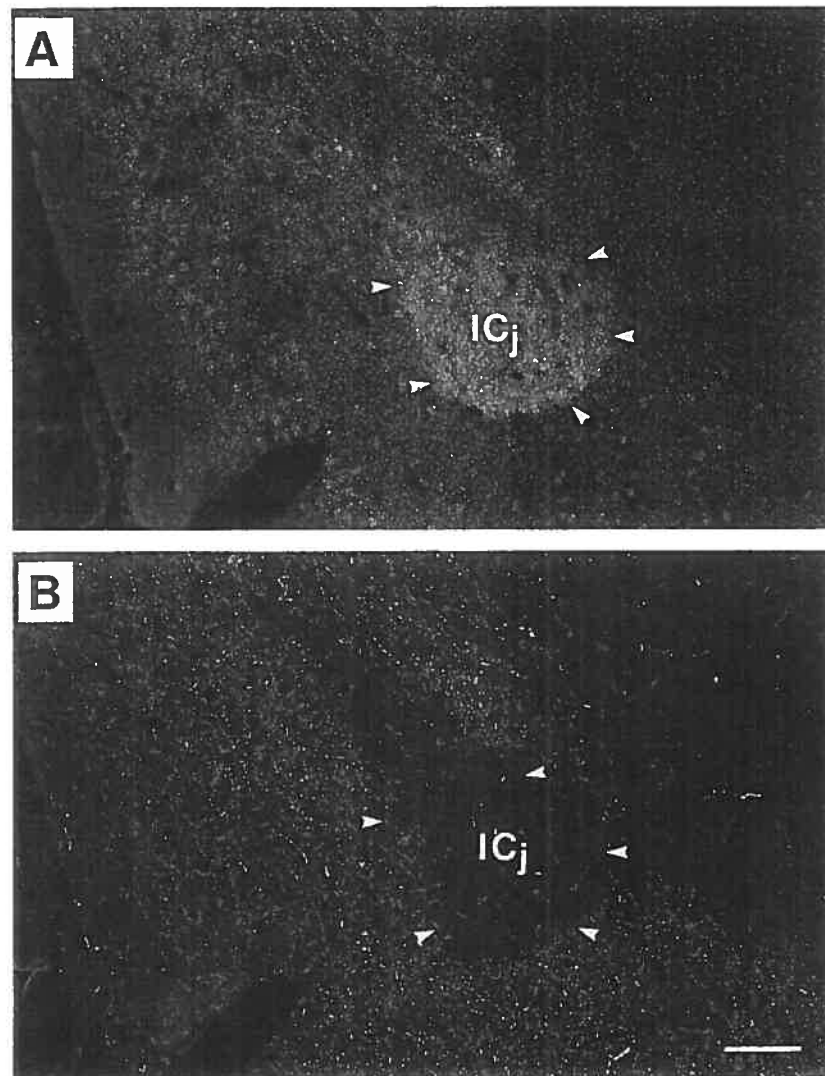
**Fig. 9.** Double immunofluorescence labeling for NPY Y1 receptor (A,B) and NPY (C,D) in transverse sections from the dorso-rostral part of the spinal trigeminal nucleus (Sp5) (adult rat; bregma 13.5 mm). Note the high degree of overlap between the regions, showing Y1 receptor-IR dendritic profiles (A and B) and NPY-IR terminals (C and D). As indicated by corresponding arrows and arrowheads, many NPY-IR terminals are closely associated with Y1 receptor-IR somata/dendrites, suggestive of point-to-point connections. Scale bar = 50  $\mu$ m.

aspinous neurons, axon terminals, and astrocytes. It was concluded from those observations that Y1 receptors may play a role in the autoregulation of NPY neurons, in which they would be internalized, along with endogenous NPY, but may also be implicated in effects of NPY on other transmitters and glial function.

#### 4.3. Substance P

Ultrastructural data are also available in the case of SP and the neurokinin receptors. In cerebral cortex, striatum, and spinal cord, a subcellular mismatch has been described at the EM level, after double immunolabeling for SP and SP receptors (114). It was then estimated that ~70% of the plasma membrane of receptor-immunoreactive somata/dendrites was laden with receptor, but that less than 15% was contacted by synaptic boutons, only some of which were SP-immunoreactive.

In contrast, in the superficial laminae of the dorsal horn, another double-immunolabeling study (115) has demonstrated that most dendrites endowed with NK-1 receptors were apposed by SP-containing boutons, and this more frequently than their receptor-immunonegative counterparts. A preferential relationship between SP-immunoreactive boutons and neurokinin-1 receptor sites has also been described by light microscope in the so-called "striocapsules" encircling striosomes (116), within which SP-immunoreactive puncta were reported to densely innervate SP-immunoreactive



**Fig. 10.** IF labeling for NPY Y1 receptor (A) and NPY (B) in adjacent transverse sections from the ventral forebrain (adult rat; bregma 1.7 mm). As shown in (A), Y1 receptor-immunoreactivity is dense inside the islands of Calleja (ICj); in (B), NPY terminals surround the ICj (arrowheads) and very few penetrate it. (For details, see ref. 110). Scale bar = 50  $\mu$ m. Bregma: 1.7 mm.

dendritic processes. In the dorsal vagal complex of rat and cat, however, NK-1 receptors were found mostly in an extrasynaptic, somatodendritic plasma membrane localization, even if many SP terminals make synaptic contact with these neurons (117). This was taken as an indication that these SP receptors would be activated by VT, but from synaptic release sites. In the rat spinal cord, immunoreactivity to NK-2 receptors (receptor for neurokinin A) was found to be primarily associated with astroglia (118); that for NK-3 receptors (receptor for neurokinin B) decorated the plasma membrane of spines and axon terminals, but outside of synaptic differentiations (119). There is

indeed good evidence (120,121) that SP has the ability to spread over considerable distances in the ECS, at least under conditions of endopeptidase inhibition, or of endogenous release of calcitonin gene-related peptide, competitive substrate for these enzymes. Another tachykinin, neurokinin A, has been detected in CSF 30 min after its release (122), and, in controlled superfusion experiments, displays substantial spread and clearance within the spinal cord, in line with the astroglial location of NK-2 receptors (121).

#### 4.4. Neurotensin

New and interesting data have also emerged from the study of neurotensin (NT). Previous immunocytochemical mapping studies had shown extensive axon networks immunoreactive for this peptide in rat basal forebrain, hypothalamus, and some brainstem regions, including those containing the cell bodies of origin and terminal arborizations of nigrostriatal and mesolimbic DA (123). Autoradiographic studies later demonstrated NT-binding sites in the same regions, including the mesostriatal and mesolimbic systems, although transmitter/receptor mismatches appeared to be present in other regions, e.g., the cingulate cortex (124).

NT receptor-immunoreactivity has now been studied in great detail, at both the light and electron microscopic levels (125,126), disclosing unexpected findings. First, a number of regions endowed with NT-binding sites showed no or divergent patterns of NT receptor immunostaining, suggesting that they may express a molecularly distinct form of the receptor (127–129). Second, in rat substantia nigra, NT receptor-immunoreactivity was highly correlated with [<sup>125</sup>I]NT binding, and both markers were located extrasynaptically, along the plasma membrane of presumed DA neurons, and less heavily in myelinated and unmyelinated axons and astrocytic leaflets, suggesting functional sites activated by VT (126). A similar conclusion had already been reached from an electron microscope autoradiographic study (130) of the ultrastructural distribution of NT-binding sites in the ventral tegmental area and interfascicular nucleus of rat. Moreover, a subsequent double-immunolabeling study had shown that NT terminals directly abutted, but only infrequently established, differentiated synaptic contacts with TH-containing perikarya and dendrites, furthering the view of a widespread, paracrine type of action of NT in the midbrain tegmentum (131). A similar ultrastructural localization of somatostatin sst2A receptors, mostly involving extrasynaptic portions of somatodendritic plasma membrane, was recently described by Dournaud et al. (132), in rat brain regions displaying diffuse, rather than dense, sst2A receptor labeling and only moderate or low densities of somatostatin-immunoreactive fibers and varicosities.

#### 4.5. Extracellular (EC) Enzymes

The study of EC brain enzymes has also thrown new light on VT by NPs. For example, endoprotease 3.4.24.16, which participates in the degradation of NT (133), is present in nerve cells and glial cells, but also exists in a soluble form. The neuronal form is membrane-bound: the glial form is soluble and secreted into the ECS (134). Such a localization suggests a role in restricting the diffusion of released NT.

Another example is the prohormone convertase 5 (PC5), an endoprotease responsible for the formation of peptides and peptide fragments. PC5 is associated with nerve

cell bodies and dendrites, but not with astrocytes (135). It has an extensive distribution in the forebrain, and is only one of at least six prohormone convertases thus far identified in rat brain. The isoform, PC5-A, has been shown to process NT, nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and other signaling proteins (135,136). It is probable that secreted endopeptidases or endoproteases, bound to the cell membranes bordering the ECS, act in the EC environment, to enhance or terminate NP signaling, through the formation of active or inactive fragments, respectively, as already suggested for galanin and galanin fragments (137,138). EC enzymes, attached to the plasma membrane and/or present in the ECS, are themselves regionally distributed in brain in a differential manner, thus creating, in the case of NPs, neurochemical networks for VT molecules. In the clinic, increased activity of prolyl-endopeptidase has been measured in serum from patients with posttraumatic stress disorder (139), and it has been suggested (140) that peptidase inhibitors could be used to modulate nociceptive pain. Future research will tell how components of the ECS, notably various enzymes, may actually influence the chemical pathways and networks for VT signaling.

#### 4.6. Clinical Relevance

The involvement of NPs in the etiology and treatment of psychiatric disorders may depend directly or indirectly on VT. Indeed, NPs are now recognized as possible regulators of DA and 5-HT transmission/modulation, as shown, for example, by the effects of NT or cholecystokinin-8 on the binding of D<sub>2</sub> DA receptor antagonists (141). Clinical investigations have indicated that schizophrenic symptoms may be associated with low levels of NT in CSF (142–144); reduced amounts of NT receptor binding have been measured postmortem in several cortical regions of the brain of schizophrenic subjects (145,146). These findings have drawn attention to the possible treatment of psychotic disorders with NT receptor agonists (147). In patients with major depression, recent studies have suggested an association between NPY and mood disorders, despite earlier conflicting reports regarding the CSF levels of NPY in such patients (148,149). Low plasma levels of NPY were measured in patients with a history of suicidal attempts (150), and reduced NPY mRNA levels in the prefrontal cortex of subjects diagnosed with bipolar disorder (151).

The implication of NPY and Y1 receptors in depression is also supported by observations on a genetic animal model, in which NPY-immunoreactivity was found to be decreased and Y1 binding increased in the hippocampus (152). Because of increased CSF levels in vivo (153), and an altered morphology of hippocampal NPY terminals postmortem (154), NPY has also been implicated in schizophrenia. Specific changes in CSF concentrations of NPY, somatostatin, and CRF, parallel to clinical recovery, have indeed been measured after effective electroconvulsive therapy in both depressed and schizophrenic patients (155). Since NPY, given systemically to healthy subjects, promotes and improves sleep (156), it will be of interest to determine whether it improves the sleep disturbances so commonly found in depression. New leads for the development of antidepressant drugs are also provided by recent clinical trials demonstrating an improvement of major depression after treatment with SP receptor antagonists (157,158).

## 5. CONCLUSIONS

Clearly, on the basis of increasing light, confocal and electron microscopic immunocytochemical evidence, and depending on the region and chemical messenger considered, monoamine and NP communication in brain may be both synaptic and/or diffuse, whether in the form of short- or long-distance VT. The two modes of transmission presumably operate in parallel, complementary to each other. When it will become possible to determine discrete sites of transmitter release, as well as effect, *in vivo*, their respective roles and relative importance, should be amenable to investigation. The fact that a majority of the monoamine and NP receptors display an extrasynaptic location favors a predominance of VT in the case of these neuromodulators. In some NP systems, such as the  $\beta$ -endorphin, long-distance communication, including CSF convection, has already been demonstrated (102). In others, such as the NPY and neurokinins, both short- and long-distance VT may be involved, in addition to wiring transmission. Long-distance communication by active peptide fragments must also be taken into account, as initially shown for vasopressin (159), some fragments of which are highly active and improve performance in behavioral and memory experiments (160,161). Such a mechanism is probably important for many NPs, as exemplified by the existence of EC enzymes degrading and modifying the activity of, e.g., NT (153,154). Additional evidence should also be forthcoming from the study of prohormone convertases, e.g., PC5A, which have the ability to form active fragments or terminate the action of several NPs.

## REFERENCES

1. Kuhar, M. J., Unnerstall, J. R., and DeSouza, E. B. (1985) Receptor mapping in neuropharmacology by autoradiography: some technical problems. *Nida Res. Monogr.* **62**, 1–12.
2. Agnati, L. F., Fuxe, K., Zoli, M., Ozini, I., Toffano, G., and Ferraguti, F. (1986) A correlation analysis of the regional distribution of central enkephalin and beta-endorphin immunoreactive terminals and of opiate receptors in adult and old male rats. Evidence for the existence of two main types of communication in the central nervous system: the volume transmission and the wiring transmission. *Acta Physiol. Scand.* **128**, 201–207.
3. Herkenham, M. (1987) Mismatches between neurotransmitter and receptor localizations in brain: observations and implications. *Neuroscience* **23**, 1–38.
4. Fuxe, K. and Agnati, L. F. (1991) Two principal modes of electrochemical communication in the brain: volume versus wiring transmission, in *Volume Transmission in the Brain. Novel Mechanisms for Neural Transmission* (Fuxe, K. and Agnati, L. F., eds.), Raven, New York, pp. 1–9.
5. Descarries, L., Beaudet, A., and Watkins, K. C. (1975) Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res.* **100**, 563–588.
6. Descarries, L., Séguéla, P., and Watkins, K. C. (1991) Nonjunctional relationships of monoamine axon terminals in the cerebral cortex of adult rat, in *Volume Transmission in the Brain: Novel Mechanisms for Neural Transmission* (Fuxe, K. and Agnati, L. F., eds.), Raven, New York, pp. 53–62.
7. Descarries, L. and Mechawar, N. (2000) Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system, in *Progress Brain Research* (Agnati, L. F., Fuxe, K., Nicholson, C., and Syková, E., eds.), Volume Transmission Revisited. 125, Elsevier, Amsterdam.
8. Isaacson, J. S. and Nicoll, R. A. (1993) The uptake inhibitor L-trans-PDC enhances responses to glutamate but fails to alter the kinetics of excitatory synaptic currents in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* **70**, 2187–2191.

9. Kullman, D. M. (1999) Synaptic and extrasynaptic roles of glutamate in the mammalian hippocampus. *Acta Physiol. Scand.* **166**, 79–83.
10. Kullman, D. M. (2000) Spillover and synaptic cross talk mediated by glutamate and GABA in the mammalian brain, in *Progress Brain Research* (Agnati, L. F., Fuxe, K., Nicholson, C., and Syková, E., eds.), 125, Elsevier, Amsterdam.
11. Zoli, M., Jansson, A., Syková, E., Agnati, L. F., and Fuxe, K. (1999) Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 142–150.
12. Descarries, L., Gisiger, V., and Steriade, M. (1997) Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Progr. Neurobiol.* **53**, 603–625.
13. Descarries, L. (1998) The hypothesis of an ambient level of acetylcholine in the central nervous system. *J. Physiol. Paris.* **92**, 215–220.
14. Jansson, A., Goldstein, M., Tinner, B., Zoli, M., Meador, W. J., Lew, J. Y., et al. (1999) On the distribution patterns of D1, D2, tyrosine hydroxylase and dopamine transporter immunoreactivities in the ventral striatum of the rat. *Neuroscience* **89**, 473–489.
15. Ribak, C. E. and Fallon, J. H. (1982) The island of Calleja complex of rat basal forebrain. I. Light and electron microscopic observations. *J. Comp. Neurol.* **205**, 207–218.
16. Halliwell, J. V. and Horne, A. L. (1998) Evidence for enhancement of gap junctional coupling between rat island of Calleja granule cells in vitro by the activation of dopamine D3 receptors. *J. Physiol. (Lond.)* **506**, 175–194.
17. Hökfelt, T., Johansson, O., Fuxe, K., Goldstein, M., and Park, D. (1977) Immunocytochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron systems in the rat brain II. Tyrosine hydroxylase in the telencephalon. *Med. Biol.* **55**, 21–40.
18. Voorn, P., Jorritsma-Byham, B., Van Dijk, C., and Buijs, R. M. (1986) The dopaminergic innervation of the ventral striatum in the rat: a light- and electron-microscopical study with antibodies against dopamine. *J. Comp. Neurol.* **251**, 84–99.
19. Seifert, U., Hartig, W., Grosche, J., Bruckner, G., Riedel, A., and Brauer, K. (1998) Axonal expression sites of tyrosine hydroxylase, calretinin- and calbindin-immunoreactivity in striato-pallidal and septal nuclei of the rat brain: a double-immunolabelling study. *Brain Res.* **795**, 227–246.
20. Fallon, J. H., Loughlin, S. E., and Ribak, C. E. (1983) The islands of Calleja complex of rat basal forebrain. III. Histochemical evidence for a striatopallidal system. *J. Comp. Neurol.* **218**, 91–120.
21. Diaz, J., Levesque, D., Lammers, C. H., Griffon, N., Martres, M. P., Schwartz, J. C., and Sokoloff, P. (1995) Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience* **65**, 731–745.
22. Gurevich, E. V., Himes, J. W., and Joyce, J. N. (1999) Developmental regulation of expression of the D3 dopamine receptor in rat nucleus accumbens and islands of Calleja. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 587–598.
23. Ridray, S., Griffon, N., Mignon, V., Souil, E., Carboni, S., Diaz, J., Schwartz, J. C., and Sokoloff, P. (1998) Coexpression of dopamine D1 and D3 receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat: opposite and synergistic functional interactions. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 1676–1686.
24. Schwartz, J. C., Diaz, J., Bordet, R., Griffon, N., Perachon, S., Pilon, C., Ridray, S., and Sokoloff, P. (1998) Functional implications of multiple dopamine receptor subtypes: the D1/D3 receptor coexistence. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **26**, 236–242.
25. Hillefors, M., von Euler, M., Hedlund, P. B., and von Euler, G. (1999) Prominent binding of the dopamine D3 agonist [<sup>3</sup>H]PD 128907 in the caudate-putamen of the adult rat. *Brain Res.* **822**, 126–131.
26. Wamsley, J. K., Gehlert, D. R., Filloux, F. M., and Dawson, T. M. (1989) Comparison of the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat brain. *J. Chem. Neuroanat.* **2**, 119–137.

27. Mengod, G., Vilaro, M. T., Niznik, H. B., Sunahara, R. K., Seeman, P., O'Dowd, B. F., and Palacios, J. M. (1991) Visualization of a dopamine D1 receptor mRNA in human and rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **10**, 185–191.
28. Caillé, I., Dumartin, B., and Bloch, B. (1996) Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in the rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain Res.* **730**, 17–31.
29. Wirtshafter, D. (1998) D1 dopamine receptors mediate neuroleptic-induced Fos expression in the islands of Calleja. *Synapse* **28**, 154–159.
30. Descarries, L., Watkins, K. C., Garcia, S., Bosler, O., and Doucet, G. (1996) Dual character, asynaptic and synaptic, of the dopamine innervation in adult rat neostriatum: a quantitative autoradiographic and immunocytochemical analysis. *J. Comp. Neurol.* **375**, 167–186.
31. Levey, A. I., Herch, S. M., Rye, D. B., Sunahara, R., Niznik, H. B., Kitt, C. A., et al. (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in rat, monkey and human brain with subtype-specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8861–8865.
32. Yung, K. K. L., Bolam, J. P., Smith, A. D., Hersch, S. M., Ciliax, B. J., and Levey, A. I. (1995) Immunocytochemical localization of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience* **65**, 709–730.
33. Garris, P. A., Ciolkowski, E. L., Pastore, P., and Wightman, R. M. (1994) Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain. *J. Neurosci.* **14**, 6084–6093.
34. Chergui, K., Suaud-Chagny, M. F., and Gonon, F. (1994) Nonlinear relationship between impulse flow, dopamine release and dopamine elimination in the rat brain in vivo. *Neuroscience* **62**, 641–645.
35. Gonon, F. (1997) Prolonged and extrasynaptic excitatory action of dopamine mediated by D1 receptors in the rat striatum in vivo. *J. Neurosci.* **17**, 5972–5978.
36. Jones, S. R., Garris, P. A., Kilts, C. D., and Wightman, R. M. (1995) Comparison of dopamine uptake in the basolateral amygdaloid nucleus, caudate-putamen, and nucleus accumbens of the rat. *J. Neurochem.* **64**, 2581–2589.
37. Nirenberg, M. J., Vaughan, R. A., Uhl, G. R., Kuhar, M. J., and Pickel, V. M. (1996) The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of the nigrostriatal dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* **16**, 436–447.
38. Nirenberg, M. J., Chan, J., Pohorille, A., Vaughan, R. A., Uhl, G. R., Kuhar, M. J., and Pickel, V. M. (1997) The dopamine transporter: comparative ultrastructure of dopaminergic axons in limbic and motor compartments of the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* **17**, 6899–6907.
39. Garris, P. A., Ciolkowski, E. L., and Wightman, R. M. (1994) Heterogeneity of evoked dopamine overflow within the striatal and striatoamygdaloid regions. *Neuroscience* **59**, 417–427.
40. Peters, J. L. and Michael, A. C. (2000) Changes in the kinetics of dopamine release and uptake have differential effects on the spatial distribution of extracellular dopamine concentration in rat striatum. *J. Neurochem.* **74**, 1563–1573.
41. Doucet, G., Descarries, L., and Garcia, S. (1986) Quantification of the dopamine innervation in adult rat neostriatum. *Neuroscience* **19**, 427–445.
42. Sesack, S. R., Hawrylak, V. A., Matus, C., Guido, M. A., and Levey, A. I. (1998) Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J. Neurosci.* **18**, 2697–2708.
43. Cass, W. A. and Gerhardt, G. A. (1995) In vivo assessment of dopamine uptake in rat medial prefrontal cortex: comparison with dorsal striatum and nucleus accumbens. *J. Neurochem.* **65**, 201–207.
44. Garris, P. A. and Wightman, R. M. (1994) Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study. *J. Neurosci.* **14**, 442–450.

45. Zigmond, M. J., Abercrombie, E. D., Berger, T. W., Grace, A. A., and Stricker, E. M. (1990) Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci.* **13**, 290–296.
46. Rothblat, D. S. and Schneider, J. S. (1994) Spontaneous functional recovery from parkinsonism is not due to reinnervation of the dorsal striatum by residual dopaminergic neurons. *Brain Res. Bull.* **34**, 309–312.
47. Schneider, J. S., Rothblat, D. S., and DiStefano, L. (1994) Volume transmission of dopamine over large distances may contribute to recovery from experimental parkinsonism. *Brain Res.* **643**, 86–91.
48. Chritin, M., Blanchard, V., Raisman, V. R., Feuerstein, C., Agid, Y., Javoy, A. F., and Savasta, M. (1996) DA uptake sites, D1 and D2 receptors, D2 and preproenkephalin mRNAs and Fos immunoreactivity in rat striatal subregions after partial dopaminergic degeneration. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 2511–2520.
49. Zoli, M., Torri, C., Ferrari, R., Jansson, A., Zini, I., Fuxe, K., and Agnati, L. F. (1998) The emergence of the volume transmission concept. *Brain Res. Rev.* **29**, 136–147.
50. Rothblat, D. S. and Schneider, J. S. (1999) Regional differences in striatal dopamine uptake and release associated with recovery from MPTP-induced parkinsonism: an in vivo electrochemical study. *J. Neurochem.* **72**, 724–733.
51. Jaber, M., Dumartin, B., Sagne, C., Haycock, J. W., Roubert, C., Giros, B., Bloch, B., and Caron, M. G. (1999) Differential regulation of tyrosine hydroxylase in the basal ganglia of mice lacking the dopamine transporter. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 3499–3511.
52. Cass, W. A., Zahniser, N. R., Flach, K. A., and Gerhardt, G. A. (1993) Clearance of exogenous dopamine in rat dorsal striatum and nucleus accumbens: role of metabolism and effects of locally applied uptake inhibitors. *J. Neurochem.* **61**, 2269–2278.
53. Garris, P. A., Walker, Q. D., and Wightman, R. M. (1997) Dopamine release and uptake rates both decrease in the partially denervated striatum in proportion to the loss of dopamine terminals. *Brain Res.* **753**, 225–234.
54. Fuxe, K. (1965) Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. III. The monoamine terminal. *Z. Zellforsch.* **65**, 573–596.
55. Fuxe, K. (1965) Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. IV. The distribution of monoamine terminals in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.* **64**, 39–85.
56. Steinbusch, H. W. M. (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat: cell bodies and terminals. *Neuroscience* **6**, 557–618.
57. Descarries, L. and Umbriaco, D. (1995) Ultrastructural basis of monoamine and acetylcholine function in the CNS. *Semin. Neurosci.* **7**, 309–318.
58. Séguéla, P., Watkins, K. C., and Descarries, L. (1989) Ultrastructural relationships of serotonin axon terminals in the cerebral cortex of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* **289**, 129–142.
59. Kosofsky, B. E. and Molliver, M. E. (1987) The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* **1**, 153–168.
60. Bunin, M. A. and Wightman, R. M. (1998) Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. *J. Neurosci.* **18**, 4854–4860.
61. Bunin, M. A., Prioleau, C., Mailman, R. B., and Wightman, R. M. (1998) Release and uptake rates of 5-hydroxytryptamine in the dorsal raphe and substantia nigra reticulata of the rat brain. *J. Neurochem.* **70**, 1077–1087.
62. Bunin, M. A. and Wightman, R. M. (1999) Paracrine neurotransmission in the CNS: involvement of 5-HT. *Trends Neurosci.* **22**, 377–382.
63. Moukhles, H., Bosler, O., Bolam, J. P., Vallée, A., Umbriaco, D., Geffard, M., and Doucet, G. (1997) Quantitative and morphometric data indicate precise cellular inter-



- actions between serotonin terminals and postsynaptic targets in rat substantia nigra. *Neuroscience* **76**, 1159–1171.
64. Descarries, L., Watkins, K. C., Garcia, S., and Beaudet, A. (1982) The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J. Comp. Neurol.* **207**, 239–254.
  65. Adell, A., Carceller, A., and Artigas, F. (1993) In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the Raphe nuclei of the rat: effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *J. Neurochem.* **60**, 1673–1681.
  66. Adell, A. and Artigas, F. (1998) A microdialysis study of the in vivo release of 5-HT in the median raphe nucleus of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **125**, 1361–1367.
  67. Héry, F., Faudon, M., and Ternaux, J. P. (1982) In vivo release of serotonin in two raphe nuclei (raphe dorsalis and magnus) of the cat. *Brain Res. Bull.* **8**, 123–129.
  68. Matos, F. F., Urban, C., and Yocca, F. D. (1996) Serotonin (5-HT) release in the dorsal raphe and ventral hippocampus: raphe control of somatodendritic and terminal 5-HT release. *J. Neural. Transm.* **103**, 173–190.
  69. Zhou, F. C., Tao, C. J., Segu, L., Patel, T., and Wang, Y. (1998) Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. *Brain Res.* **805**, 241–254.
  70. Pickel, V. M. and Chan, J. (1999) Ultrastructural localization of the serotonin transporter in limbic and motor compartments of the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* **19**, 7356–7366.
  71. Tao-Cheng, J. H. and Zhou, F. C. (1999) Differential polarization of serotonin transporters in axons versus soma-dendrites: an immunogold electron microscopy study. *Neuroscience* **94**, 821–830.
  72. Jansson, A., Tinner, B., Steinbusch, H. W. M., Agnati, L. F., and Fuxe, K. (1998) On the relationship of 5-hydroxytryptamine neurons to 5-hydroxytryptamine 2A receptor-immunoreactive neuronal processes in the brain stem of rats. A double immunolabelling analysis. *Neuroreport* **9**, 2505–2511.
  73. Jansson, A., Tinner, B., Steinbusch, H. W. M., Agnati, L. F., and Fuxe, K. (1999) Relationships of the 5-hydroxytryptamine-immunoreactive nerve terminal network to 5-hydroxytryptamine 2A receptor-immunoreactive neuronal processes in the rat fore-brain. *Abstr. Soc. Neurosci.* **25**, 1204.
  74. Aghajanian, G. K. and McCall, R. B. (1980) Serotonergic synaptic input to facial motoneurons: localization by electron-microscopic autoradiography. *Neuroscience* **5**, 2155–2162.
  75. Schaffar, N., Jean, A., and Calas, A. (1984) Radioautographic study of serotonergic axon terminals in the rat trigeminal motor nucleus. *Neurosci. Lett.* **44**, 31–36.
  76. Cornea-Hébert, V., Riad, M., Wu, C., Singh, S., and Descarries, L. (1999) Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system of adult rat. *J. Comp. Neurol.* **409**, 187–209.
  77. Willins, D. L., Deutch, A. Y., and Roth, B. L. (1997) Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. *Synapse* **27**, 79–82.
  78. Wu, C., Yoder, E. J., Shih, J., Chen, K., Dias, P., Shi, L., et al. (1998) Development and characterization of monoclonal antibodies specific to the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *J. Histochem. Cytochem.* **46**, 811–824.
  - 78a. Cornea-Hébert, V., Riad, M., Wu, C., Singh, S., and Descarries, L. Copyright © (1999 Wiley-Liss, Inc.) Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system of adult rat. *J. Comparat. Neurol.*
  - 78b. Riad, M., Garcia, S., Watkins, K. C., et al. Copyright © (2000 Wiley-Liss, Inc.) Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain. *J. Comparat. Neurol.*
  79. Willins, D. L., Alsayegh, L., Berry, S. A., Backstrom, J. R., Sanders-Bush, E., Friedman, L., Khan, N., and Roth, B. L. (1998) Serotonergic antagonist effects on trafficking of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in vitro and in vivo. *Ann. NY Acad. Sci.* **861**, 121–127.

80. Willins, D. L., Berry, S. A., Alsayegh, L., Backstrom, J. R., Sanders-Bush, E., Friedman, L., and Roth, B. L. (1999) Clozapine and other 5-hydroxytryptamine-2A receptor antagonists alter the subcellular distribution of 5-hydroxytryptamine-2A receptors in vitro and in vivo. *Neuroscience* **91**, 599–606.
81. Riad, M., Tong, X. K., El Mestikawy, S., Hamon, M., Hamel, E., and Descarries, L. (1998) Endothelial expression of the 5-hydroxytryptamine 1B antimigraine drug receptor in rat and human brain microvessels. *Neuroscience* **86**, 1031–1035.
82. Riad, M., Garcia, S., Watkins, K. C., Jodoin, N., Doucet, E., Langlois, X., et al. Copyright © (2000 Wiley-Liss, Inc.) Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* **417**, 181–194.
83. Sari, Y., Lefèvre, K., Bancila, M., Quignon, M., Miquel, M. C., Langlois, X., Hamon, M., and Vergé, D. (1997) Light and electron microscopic immunocytochemical visualization of 5-HT1B receptors in the rat brain. *Brain Res.* **760**, 281–286.
84. Sari, Y., Miquel, M. C., Brisorgueil, M. J., Ruiz, G., Doucet, E., Hamon, M., and Vergé, D. (1999) Cellular and subcellular localization of 5-hydroxytryptamine 1B receptors in the rat central nervous system: immunocytochemical, autoradiographic and lesion studies. *Neuroscience* **88**, 899–915.
85. Oleskevich, S., Descarries, L., Watkins, K. C., Séguéla, P., and Daszuta, A. (1991) Ultrastructural features of the serotonin innervation in adult rat hippocampus: an immunocytochemical description in single and serial thin sections. *Neuroscience* **42**, 777–791.
86. Burnet, P. W., Mead, A., Eastwood, S. L., Lacey, K., Harrison, P. J., and Sharp, T. (1995) Repeated ECS differentially affects rat brain 5-HT1A and 5-HT2A receptor expression. *Neuroreport* **6**, 901–904.
87. Fernandes, C., McKittrick, C. R., File, S. E., and McEwen, B. S. (1997) Decreased 5-HT1A and increased 5-HT2A receptor binding after chronic corticosterone associated with a behavioural indication of depression but not anxiety. *Psychoneuroendocrinology* **22**, 477–491.
88. Ichikawa, J., Kuroki, T., Dai, J., and Meltzer, H. Y. (1998) Effect of antipsychotic drugs on extracellular serotonin levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Eur. J. Pharmacol.* **351**, 163–171.
89. Jagadeesh, S. R. and Subhash, M. N. (1998) Effect of antidepressants on intracellular Ca<sup>++</sup> mobilization in human frontal cortex. *Biol. Psychiatry* **44**, 617–621.
90. Maes, M., Libbrecht, I., van Hunsel, F., Campens, D., and Meltzer, H. Y. (1999) Pindolol and mianserin augment the antidepressant activity of fluoxetine in hospitalized major depressed patients, including those with treatment resistance. *J. Clin. Psychopharmacol.* **19**, 177–182.
91. Staley, J. K., Malison, R. T., and Innis, R. B. (1998) Imaging of the serotonergic system: interactions of neuroanatomical and functional abnormalities of depression. *Biol. Psychiatry* **44**, 534–549.
92. Du, L., Bakish, D., Lapierre, Y. D., Ravindran, A. V., and Hrdina, P. D. (2000) Association of polymorphism of serotonin 2A receptor gene with suicidal ideation in major depressive disorder. *Am. J. Med. Genet.* **96**, 56–60.
93. Plein, H. and Berk, M. (2000) Changes in the platelet intracellular calcium response to serotonin in patients with major depression treated with electroconvulsive therapy: state or trait marker status. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **15**, 93–98.
94. Fink, G., Sumner, B. E., McQueen, J. K., Wilson, H., and Rosie, R. (1998) Sex steroid control of mood, mental state and memory. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **25**, 764–775.
95. Fink, G., Sumner, B., Rosie, R., Wilson, H., and McQueen, J. (1999) Androgen actions on central serotonin neurotransmission: relevance for mood, mental state and memory. *Behav. Brain Res.* **105**, 53–68.

96. De Vry, J. (1995) 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology (Berl.)* **121**, 1–26.
97. Hamon, M. (1997) The main features of central 5-HT<sub>1A</sub> receptors, in *Serotonergic Neurons and 5-HT Receptors in the CNS* (Baumbarten, H. G. and Göthert, M., eds.), *Handbook Experimental Pharmacology* 129, Springer-Verlag, Berlin, pp. 239–268.
98. Blier, P. and de Montigny, C. (1999) Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive and panic disorders. *Neuropsychopharmacology* **21**, 91S–98S.
99. Riad, M., Doucet, E., Hamon, M., and Descarries, L. (1999) 8-OH-DPAT internalizes 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in serotonin neurons of nucleus raphe dorsalis. *Soc. Neurosci. Abstr.* **25**, 1466.
100. Le Poul, E., Laaris, N., Doucet, E., Laporte, A. M., Hamon, M., and Lanfumey, L. (1995) Early desensitization of somato-dendritic 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **352**, 141–148.
101. Bjelke, B. (1994) Volume transmission: experimental evidence for chemical communication via extracellular fluid pathways in the dopamine and  $\beta$ -endorphin neurons of the brain, *Academic Thesis*, Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, Stockholm.
102. MacMillan, S. A. J., Mark, M. A., and Duggan, A. W. (1998) The release of  $\beta$ -endorphin and the neuropeptide-receptor mismatch in the brain. *Brain Res.* **794**, 127–136.
103. Elde, R., Arvidsson, U., Riedl, M., Vulchanova, L., Lee, J. H., Dado, R., et al. (1995) Distribution of neuropeptide receptors. New views of peptidergic neurotransmission made possible by antibodies to opioid receptors. *Ann. NY Acad. Sci.* **757**, 390–404.
104. Bowers, C. W. (1994) Superfluous neurotransmitters? *Trends Neurosci.* **17**, 315–320.
105. Commons, K. G. and Milner, T. A. (1996) Cellular and subcellular localization of delta opioid receptor immunoreactivity in the rat dentate gyrus. *Brain Res.* **738**, 181–195.
106. Hamel, E. and Beaudet, A. (1987) Opioid receptors in rat neostriatum: radioautographic distribution at the electron microscopic level. *Brain Res.* **401**, 239–257.
107. Wang, H., Moriwaki, A., Wang, J. B., Uhl, G. R., and Pickel, V. M. (1996) Ultrastructural immunocytochemical localization of  $\mu$  opioid receptors and Leu<sup>5</sup>-enkephalin in the patch compartment of the rat caudate-putamen nucleus. *J. Comp. Neurol.* **375**, 659–674.
108. Pieribone, V. A., Xu, Z. Q., Zhang, X., Grillner, S., Bartfai, T., and Hökfelt, T. (1995) Galanin induces a hyperpolarization of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in the brainstem slice. *Neuroscience* **64**, 861–874.
109. Zoli, M., Agnati, L. F., Fuxe, K., and Bjelke, B. (1989) Demonstration of NPY transmitter receptor mismatches in the central nervous system of the male rat. *Acta Physiol. Scand.* **135**, 201–202.
110. Caberlotto, L., Tinner, B., Bunnemann, B., Agnati, L. F., and Fuxe, K. (1998) On the relationship of neuropeptide Y Y1 receptor-immunoreactive neuronal structures to the neuropeptide Y-immunoreactive nerve terminal networks. A double immunolabelling analysis in the rat brain. *Neuroscience* **86**, 827–845.
111. Fuxe, K., Tinner, B., Caberlotto, L., Bunnemann, B., and Agnati, L. F. (1997) NPY Y1 receptor like immunoreactivity exists in a subpopulation of beta-endorphin immunoreactive nerve cells in the arcuate nucleus: a double immunolabelling analysis in the rat. *Neurosci. Lett.* **225**, 49–52.
112. Dumont, Y., Fournier, A., Quirion, R., et al. (1996) Autoradiographic distribution of [<sup>125</sup>I]Leu<sup>31</sup>,Pro<sup>34</sup>]PYY and [<sup>125</sup>I]PYY<sup>3-36</sup> binding sites in the rat brain evaluated with two newly developed Y1 and Y2 receptor radioligands. *Synapse* **22**, 139–158.
113. Pickel, V. M., Beck-Sickinger, A. G., Chan, J., and Weiland, H. A. (1998) Y1 receptors in the nucleus accumbens: ultrastructural localization and association with neuropeptide Y. *J. Neurosci. Res.* **52**, 54–68.
114. Liu, H., Brown, J. L., Jasmin, L., Maggio, J. E., Vigna, S. R., Mantyh, P. W., and Basbaum, A. I. (1994) Synaptic relationship between substance P and the substance P

- receptor: light and electron microscopic characterization of the mismatch between neuropeptides and their receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1009–1013.
115. McLeod, A. L., Krause, J. E., Cuello, A. C., and Ribeiro-da-Silva, A. (1998) Preferential synaptic relationships between substance P-immunoreactive boutons and neurokinin 1 receptor sites in the rat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15,775–15,780.
  116. Jakab, R. L., Hazrati, L. N., and Goldman, R. P. (1996) Distribution and neurochemical character of substance P receptor (SPR)-immunoreactive striatal neurons of the macaque monkey: accumulation of SP fibers and SPR neurons and dendrites in “striocapsules” encircling striosomes. *J. Comp. Neurol.* **369**, 137–149.
  117. Baude, A. and Shigemoto, R. (1998) Cellular and subcellular distribution of substance P receptor immunoreactivity in the dorsal vagal complex of the rat and cat: a light and electron microscope study. *J. Comp. Neurol.* **402**, 181–196.
  118. Zerari, F., Karpitskiy, V., Krause, J., Descarries, L., and Couture, R. (1998) Astroglial distribution of neurokinin-2 receptor immunoreactivity in the rat spinal cord. *Neuroscience* **84**, 1233–1246.
  119. Zerari, F., Karpitskiy, V., Krause, J., Descarries, L., and Couture, R. (1997) Immunoelectron microscopic localization of NK-3 receptor in the rat spinal cord. *Neuroreport* **8**, 2661–2664.
  120. Duggan, A. W., Schaible, H. G., Hope, P. J., and Lang, C. W. (1992) Effect of peptidase inhibition on the pattern of intraspinally released immunoreactive substance P detected with antibody microprobes. *Brain Res.* **579**, 261–269.
  121. Beck, H., Schrock, H., and Sandkuhler, J. (1995) Controlled superfusion of the rat spinal cord for studying non-synaptic transmission: an autoradiographic analysis. *J. Neurosci. Methods* **58**, 193–202.
  122. Hope, P. J., Jarrott, B., Schaible, H. G., Clarke, R. W., and Duggan, A. W. (1990) Release and spread of immunoreactive neurokinin A in the cat spinal cord in a model of acute arthritis. *Brain Res.* **533**, 292–299.
  123. Jennes, L., Stumpf, W. E., and Kalivas, P. W. (1982) Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.* **210**, 211–224.
  124. Moyses, E., Rostene, W., Vial, M., Leonard, K., Mazella, J., Kitabgi, P., Vincent, J. P., and Beaudet, A. (1987) Distribution of neurotensin binding sites in rat brain: a light microscopic radioautographic study using monoiodo [<sup>125</sup>I]Tyr<sup>3</sup>-neurotensin. *Neuroscience* **22**, 525–536.
  125. Boudin, H., Pelaprat, D., Rostene, W., and Beaudet, A. (1996) Cellular distribution of neurotensin receptors in rat brain: immunohistochemical study using an anti-peptide antibody against the cloned high affinity receptor. *J. Comp. Neurol.* **373**, 76–89.
  126. Boudin, H., Pelaprat, D., Rostene, W., Pickel, V. M., and Beaudet, A. (1998) Correlative ultrastructural distribution of neurotensin receptor proteins and binding sites in the rat substantia nigra. *J. Neurosci.* **18**, 8473–8484.
  127. Botto, J. M., Sarret, P., Vincent, J. P., and Mazella, J. (1997) Identification and expression of a variant isoform of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor in the mouse central nervous system. *FEBS Lett.* **400**, 211–214.
  128. Nouel, D., Sarret, P., Vincent, J. P., Mazella, J., and Beaudet, A. (1999) Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors. *Neuroscience* **94**, 1189–1197.
  129. Vincent, J. P., Mazella, J., and Kitabgi, P. (1999) Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 302–309.
  130. Dana, C., Vial, M., Leonard, K., Beauregard, A., Kitabgi, P., Vincent, J. P., Rostene, W., and Beaudet, A. (1989) Electron microscopic localization of neurotensin binding sites in the midbrain tegmentum of the rat. I. Ventral tegmental area and the interfascicular nucleus. *J. Neurosci.* **9**, 2247–2257.

131. Woulfe, J. and Beaudet, A. (1992) Neurotensin terminals form synapses primarily with neurons lacking detectable tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the rat substantia nigra and ventral tegmental area. *J. Comp. Neurol.* **321**, 163–176.
132. Dournaud, P., Boudin, H., Schonbrunn, A., Tannenbaum, G. S., and Beaudet, A. (1998) Interrelationships between somatostatin sst2A receptors and somatostatin-containing axons in rat brain: evidence for regulation of cell surface receptors by endogenous somatostatin. *J. Neurosci.* **18**, 1056–1071.
133. Checler, F., Barelli, H., Kitabgi, P., and Vincent, J. P. (1988) Neurotensin metabolism in various tissues of central and peripheral origins: ubiquitous involvement of a novel neurotensin degrading metalloendopeptidase. *Biochimie* **70**, 75–82.
134. Vincent, B., Beaudet, A., Dauch, P., Vincent, J. P., and Checler, F. (1996) Distinct properties of neuronal and astrocytic endopeptidase 3.4.24.16: a study on differentiation, subcellular distribution, and secretion processes. *J. Neurosci.* **16**, 5049–5059.
135. Villeneuve, P., Seidah, N. G., and Beaudet, A. (1999) Immunohistochemical distribution of the prohormone convertase PC5-A in rat brain. *Neuroscience* **92**, 641–654.
136. Barbero, P., Rovere, C., De Bie, I., Seidah, N., Beaudet, A., and Kitabgi, P. (1998) PC5-A-mediated processing of pro-neurotensin in early compartments of the regulated secretory pathway of PC5-transfected PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 25,339–25,346.
137. Hedlund, P. B., Yanaihara, N., and Fuxe, K. (1992) Evidence for specific N-terminal galanin fragment binding sites in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **224**, 203–205.
138. Hedlund, P. B., Finnman, U. B., Yanaihara, N., and Fuxe, K. (1994) Galanin-(1-15), but not galanin-(1-29), modulates 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the dorsal hippocampus of the rat brain: possible existence of galanin receptor subtypes. *Brain Res.* **634**, 163–167.
139. Maes, M., Lin, A. H., Bonaccorso, S., Goossens, F., Van Gastel, A., Pioli, R., Delmeire, L., and Scharpe, S. (1999) Higher serum prolyl endopeptidase activity in patients with post-traumatic stress disorder. *J. Affect. Disord.* **53**, 27–34.
140. Noble, F., Smadja, C., Valverde, O., Maldonado, R., Coric, P., Turcaud, S., Fournie-Zaluski, M. C., and Roques, B. P. (1997) Pain-suppressive effects on various nociceptive stimuli (thermal, chemical, electrical and inflammatory) of the first orally active enkephalin-metabolizing enzyme inhibitor RB 120. *Pain* **73**, 383–391.
141. Fuxe, K., Li, X. M., Tanganelli, S., Hedlund, P., O'Connor, W. T., Ferraro, L., Ungerstedt, U., and Agnati, L. F. (1995) Receptor-receptor interactions and their relevance for receptor diversity. Focus on neuropeptide/dopamine interactions. *Ann. NY Acad. Sci.* **757**, 365–376.
142. Breslin, N. A., Suddath, R. L., Bissette, G., Nemeroff, C. B., Lowrimore, P., and Weinberger, D. R. (1994) CSF concentrations of neurotensin in schizophrenia: an investigation of clinical and biochemical correlates. *Schizophr. Res.* **12**, 35–41.
143. Lindström, L. H., Widerlöv, E., Bissette, G., and Nemeroff, C. (1988) Reduced CSF neurotensin concentration in drug-free schizophrenic patients. *Schizophr. Res.* **1**, 55–59.
144. Sharma, R. P., Janicak, P. G., Bissette, G., and Nemeroff, C. B. (1997) CSF neurotensin concentrations and antipsychotic treatment in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Am. J. Psychiatry* **154**, 1019–1021.
145. Lahti, R. A., Cochrane, E. V., Roberts, R. C., Conley, R. R., and Tamminga, C. A. (1998) [<sup>3</sup>H]Neurotensin receptor densities in human postmortem brain tissue obtained from normal and schizophrenic persons. An autoradiographic study. *J. Neural. Transm.* **105**, 507–516.
146. Wolf, S. S., Hyde, T. M., Saunders, R. C., Herman, M. M., Weinberger, D. R., and Kleinman, J. E. (1995) Autoradiographic characterization of neurotensin receptors in the entorhinal cortex of schizophrenic patients and control subjects. *J. Neural. Transm. General Section* **102**, 55–65.
147. Kinkead, B., Binder, E. B., and Nemeroff, C. B. (1999) Does neurotensin mediate the effects of antipsychotic drugs? *Biol. Psychiatry* **46**, 340–351.

148. Berrettini, W. H., Doran, A. R., Kelsoe, J., Roy, A., and Pickar, D. (1987) Cerebrospinal fluid neuropeptide Y in depression and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **1**, 81–83.
149. Widerlöv, E., Lindström, L. H., Wahlestedt, C., and Ekman, R. (1988) Neuropeptide Y and peptide YY as possible cerebrospinal fluid markers for major depression and schizophrenia, respectively. *J. Psychiatr. Res.* **22**, 69–79.
150. Westrin, A., Ekman, R., and Traskman-Bendz, L. (1999) Alterations of corticotropin releasing hormone (CRH) and neuropeptide Y (NPY) plasma levels in mood disorder patients with a recent suicide attempt. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **9**, 205–211.
151. Caberlotto, L. and Hurd, Y. L. (1999) Reduced neuropeptide Y mRNA expression in the prefrontal cortex of subjects with bipolar disorder. *Neuroreport* **10**, 1747–1750.
152. Caberlotto, L., Jimenez, P., Overstreet, D. H., Hurd, Y. L., Mathé, A. A., and Fuxe, K. (1999) Alterations in neuropeptide Y levels and Y1 binding sites in the Flinders Sensitive Line rats, a genetic animal model of depression. *Neurosci. Lett.* **265**, 191–194.
153. Peters, J., Van Kammen, D. P., Gelernter, J., Yao, J., and Shaw, D. (1990) Neuropeptide Y-like immunoreactivity in schizophrenia. Relationships with clinical measures. *Schizophr. Res.* **3**, 287–294.
154. Iritani, S., Kuroki, N., Niizato, K., and Ikeda, K. (2000) Morphological changes in neuropeptide Y-positive fiber in the hippocampal formation of schizophrenics. *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **24**, 241–249.
155. Mathé, A. A. (1999) Neuropeptides and electroconvulsive treatment. *J. Ect.* **15**, 60–75.
156. Antonijevic, I. A., Murck, H., Bohlhalter, S., Frieboes, R. M., Holsboer, F., and Steiger, A. (2000) Neuropeptide Y promotes sleep and inhibits ACTH and cortisol release in young men. *Neuropharmacology* **39**, 1474–1481.
157. Kramer, M. S., Cutler, N., Feighner, J., Shrivastava, R., Carman, J., Sramek, J. J., et al. (1998) Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* **281**, 1640–1645.
158. Rupniak, N. M. and Kramer, M. S. (1999) Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 485–490.
159. DeWied, D. and Jolles, J. (1982) Neuropeptides derived from proopiomelanocortin: behavioural, physiological and neurochemical aspects. *Physiol. Rev.* **62**, 976–1059.
160. Burbach, J. P., Wang, X. C., Ten Haaf, J. A., and De Wied, D. (1984) Substances resembling C-terminal vasopressin fragments are present in the brain but not in the pituitary gland. *Brain Res.* **306**, 384–387.
161. Vawter, M. P., De Wied, D., and Van Ree, J. M. (1997) Vasopressin fragment, AVP-(4-8), improves long-term and short-term memory in the hole board search task. *Neuropeptides* **31**, 489–494.

