

Université de Montréal

**Régulation de la fonction du récepteur dopaminergique
D2 dans les neurones dopaminergiques**

par

Claudia Jomphe

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Pharmacologie

Juillet 2006

© Claudia Jomphe, 2006



w
4
U58
2006
v. 129

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Régulation de la fonction du récepteur dopaminergique D2 dans les neurones
dopaminergiques

présentée par :
Claudia Jomphe

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr André DeLéan, président-rapporteur
Dr Louis-Éric Trudeau, directeur de recherche
Dr Richard Robitaille, membre du jury
Dr Paul Albert, examinateur externe
Dr Laurent Descarries, représentant du doyen de la FES

Résumé

Un dérèglement de la neurotransmission dopaminergique a été impliqué dans une variété de troubles neurologiques et psychiatriques incluant la maladie de Parkinson, la schizophrénie, la dépendance aux drogues et le syndrome de Tourette. Puisque le récepteur dopaminergique D2 participe comme autorécepteur à la régulation de la libération de dopamine, ainsi qu'aux effets modulateurs de la dopamine sur le système locomoteur et les systèmes centraux de récompense, la caractérisation des phénomènes impliqués dans la régulation de sa capacité à signaler favorisera une meilleure compréhension de son rôle dans les pathologies associées au système dopaminergique.

Dans un premier temps, nous avons évalué le rôle de l'épissage alternatif dans la fonction du récepteur D2 en tant qu'autorécepteur. En effet, le récepteur D2 existe sous deux isoformes, la forme courte D2S et la longue D2L, générées par épissage alternatif. Il a été récemment proposé que le D2S pourrait agir principalement comme autorécepteur présynaptique alors que le D2L serait responsable des effets postsynaptiques de la dopamine. Afin d'étudier la localisation, la régulation et le rôle physiologique de ces deux isoformes, nous avons transfecté de façon transitoire des neurones mésencéphaliques de rat en culture primaire. Les résultats obtenus suggèrent que les deux isoformes sont aussi efficaces l'une que l'autre à agir comme autorécepteur. Il semble donc que la capacité du D2S à agir comme autorécepteur préférentiel relève davantage de son expression favorisée dans les neurones dopaminergiques plutôt que d'une localisation ou d'un couplage différentiels entre les deux isoformes.

Étant donnée l'étroite association entre le système dopaminergique et celui de la neurotensine et les nombreuses données suggérant la capacité du récepteur NTS1 de la neurotensine à moduler l'activité du récepteur D2 de la dopamine; nous avons dans un deuxième temps, étudié cette interaction afin d'identifier les mécanismes impliqués. Nous avons utilisé un modèle de culture primaire de neurones dopaminergiques préparée à partir de souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente verte sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase, un modèle expérimental que nous avons d'abord développé et validé. Dans ce modèle de culture, les neurones dopaminergiques expriment

de façon endogène les récepteurs D2 et NTS1. La modulation de la fonction d'autorécepteur du récepteur D2 par le récepteur NTS1 a été évaluée à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques. Nos travaux ont permis de démontrer que la neurotensine, en se liant au récepteur NTS1, diminue la fonction de l'autorécepteur D2 par un mécanisme indépendant de sa capacité à augmenter le taux de décharge des neurones dopaminergiques et que cette interaction se produit par un mécanisme dépendant de la PKC et du Ca^{2+} . Finalement, l'interaction entre ces deux récepteurs s'est révélée bidirectionnelle puisque l'activation préalable du récepteur D2 a aussi réduit la capacité du récepteur NTS1 à signaler, c'est-à-dire à induire une mobilisation calcique dans ces neurones. En conclusion, nos travaux ont permis de mieux comprendre l'autorégulation des neurones dopaminergiques via l'autorécepteur D2 et de mettre en évidence un nouveau mécanisme de signalisation qui assure un contrôle rigoureux de la neurotransmission de la dopamine dans le cerveau.

Mots-clés : dopamine, neurotensine, épissage alternatif, autorécepteur, électrophysiologie.

Abstract

Deregulation of dopaminergic transmission has been implicated in a variety of neurological and psychiatric disorders, including Parkinson's disease, schizophrenia, drug dependence and Tourette's syndrome. Considering that the dopamine D2 receptor is implicated as an autoreceptor in the regulation of dopamine release and participates in the modulating effects of dopamine on the locomotor and central reward systems, characterization of the mechanisms underlying its functional regulation should provide a better comprehension of its role in the pathologies associated with the dopaminergic system.

First, we evaluated the contribution of alternative splicing in the distinct functions associated to D2 receptors. Indeed, alternative gene splicing generates two distinct isoforms of the dopamine D2 receptor referred to as D2_{long} (D2L) and D2_{short} (D2S). It was recently proposed that the D2S could act mainly as presynaptic autoreceptor whereas the D2L would be responsible for the postsynaptic effects of dopamine. We investigated whether this D2 isoform-specific autoreceptor function is linked to differences in the subcellular localization and/or signalling properties of the D2S and D2L using mesencephalic neurons transfected with enhanced green fluorescent protein-tagged receptors. Our results showed that EGFP-tagged D2S and D2L are both localized to the axonal and somatodendritic compartments of mesencephalic neurons. In addition, we demonstrated that EGFP-tagged D2S and D2L regulate cellular excitability, neurotransmitter release and basal levels of intracellular calcium with similar effectiveness. Overall, our morphological and electrophysiological studies suggest that the major D2 autoreceptor function attributed to D2S is likely explained by the predominant expression of this isoform in dopamine neurons rather than by distinct subcellular localization and signalling properties of D2S and D2L.

Given the close association between dopamine and neurotensin systems in the CNS and the evidence of the ability of the neurotensin NTS1 receptor to modulate the activity of

the D2 receptor, we next investigated the mechanisms underlying this form of heterologous desensitization. We used a primary culture model of dopamine neurons prepared from transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the tyrosine hydroxylase promoter, an experimental model that we initially developed and validated. In these cultures, DA neurons endogenously express both D2R and NTS1. The modulation of D2R function by NTS1 was evaluated using electrophysiological recordings. We found that NT, acting through a NTS1-like receptor, is able to reduce D2R autoreceptor function independently of its ability to enhance dopamine neuron firing, and that this interaction occurs through a PKC- and Ca^{2+} -dependent mechanism. Furthermore, prior activation of D2R reduces the ability of NTS1 to induce intracellular Ca^{2+} mobilization. In conclusion, our findings have led to a better understanding of the autoregulation of dopamine neurons through the D2 autoreceptor. In addition, they provide evidence for bidirectional interaction between D2R and NTS1 in dopamine neurons, a regulatory mechanism that could play a key role in control of the activity of these neurons.

Keywords: dopamine, neurotensin, alternative splicing, autoreceptor, electrophysiology.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	v
Liste des tableaux	xiv
Liste des figures	xv
Liste des abréviations.....	xviii
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
CHAPITRE 1. Le système dopaminergique.....	2
1.1 La dopamine.....	2
1.2 Anatomie du système dopaminergique	5
1.3 Pharmacologie des récepteurs dopaminergiques	9
1.4 Dysfonction du système dopaminergique	18
1.4.1 La maladie de Parkinson	18
1.4.2 La schizophrénie	23
1.4.3 La dépendance aux drogues d'abus.....	27
CHAPITRE 2. Le récepteur D2, un autorécepteur	29
2.1 Gène et structure	29
2.2 Différences fonctionnelles entre les isoformes	30
2.3 Autorécepteur D2.....	32
2.3.1 Régulation de l'excitabilité des neurones DA.....	34
2.3.2 Régulation de la synthèse et de la libération de dopamine	35
Conclusion	37
CHAPITRE 3. Interactions entre les systèmes dopaminergiques et neurotensinergiques	38
3.1 La neurotensine	38
3.2 Le système neurotensinergique.....	41
3.3 Pharmacologie des récepteurs à la neurotensine.....	42
3.4 Interactions entre les systèmes neurotensinergique et dopaminergique	48

3.5	Conclusion	50
CHAPITRE 4. Mécanismes de régulation des récepteurs à 7 passages transmembranaires		
51		
4.1	Mécanismes de régulation transcriptionnels	51
4.1.1	Activation de la transcription	52
4.1.2	Répression de la transcription	53
4.2	Mécanismes de régulation post-transcriptionnels	53
4.2.1	Déstabilisation de l'ARNm	54
4.2.2	Épissage alternatif	55
4.2.3	Édition des ARN	56
4.3	Mécanismes de régulation post-traductionnels	57
4.3.1	Phosphorylation	57
4.3.2	Palmytation	58
4.3.3	Glycosylation	60
4.3.4	Ubiquitination	61
4.3.5	Interaction protéine-protéine	62
4.4	Conclusion	64
CHAPITRE 5 Problématique		66
PRÉSENTATION DES ARTICLES		69
Contribution des co-auteurs		70
CHAPITRE 6 : Expression of D2 receptor isoforms in cultured neurons reveals equipotent autoreceptor function		72
SUMMARY		74
INTRODUCTION.....		75
METHODS.....		78
<i>Plasmids</i>		78
<i>Cell culture</i>		78
<i>Transfection.</i>		79

<i>Immunocytochemistry</i>	79
<i>Electrophysiology</i>	81
<i>Calcium imaging</i>	83
<i>Statistical analysis</i>	84
RESULTS	85
<i>Subcellular localization of dopamine D2S and D2L receptors.</i>	85
<i>D2S and D2L are equipotent in inhibiting firing rate.</i>	87
<i>D2S and D2L receptor isoforms can act presynaptically to inhibit neurotransmitter release.</i>	88
<i>D2S and D2L receptor isoforms do not induce calcium mobilization.</i>	90
DISCUSSION	91
ACKNOWLEDGEMENTS.....	95
REFERENCES	96
FIGURE LEGENDS.....	102
CHAPITRE 7 : Use of TH-EGFP transgenic mice as a source of identified Dopaminergic neurons for physiological studies in postnatal cellculture.	114
ABSTRACT.....	116
INTRODUCTION.....	117
MATERIALS AND METHODS	122
<i>Transgenic mice</i>	122
<i>Cell culture.</i>	122
<i>Immunocytochemistry.</i>	124
<i>Electrophysiology</i>	125
<i>Calcium imaging</i>	126
<i>Confocal imaging</i>	127
RESULTS	128
<i>Selectivity of EGFP expression in dopaminergic neurons increases over time in culture.</i>	128

<i>Electrophysiological characteristics cannot help identify cultured dopaminergic neurons.</i>	130
<i>Activation of somatodendritic dopamine D2 receptors inhibits firing rate.</i>	131
<i>Terminal D2 receptors inhibit neurotransmitter release in dopaminergic neurons.</i> ..	131
<i>Dopaminergic neurons show an increased firing rate in response to neurotensin.</i> ..	132
<i>Confocal imaging of EGFP-expressing dopaminergic neuron axon terminals with FM4-64.</i>	133
DISCUSSION	135
ACKNOWLEDGEMENTS	140
REFERENCES	141
FIGURE LEGENDS	146
CHAPITRE 8 : Bidirectional regulation of dopamine D2 and neurotensin NTS1 receptors in dopamine neurons	158
ABSTRACT	160
INTRODUCTION	161
MATERIALS AND METHODS	163
<i>Transgenic mice and cell culture.</i>	163
<i>Electrophysiology.</i>	163
<i>Calcium imaging.</i>	165
<i>Immunocytochemistry.</i>	166
<i>Statistical analysis.</i>	166
RESULTS	167
<i>Quinpirole-induced inhibition of DA neuron firing rate is dose-dependent and does not desensitize.</i>	167
<i>Activation of NT receptor reduces D2 autoreceptor function.</i>	168
<i>Modulation of D2R function by NT is independent of its ability to increase the firing rate of DA neurons.</i>	170
<i>The functional interaction between D2R and NTS1 requires calcium.</i>	171

<i>PKC is involved in the functional regulation of D2R by NTS1</i>	172
<i>Activation of D2R reduces the ability of NT to increase intracellular calcium in DA neurons</i>	172
DISCUSSION	175
REFERENCES	180
FIGURE LEGENDS	190
CHAPITRE 9. Considérations méthodologiques.....	201
9.1 Utilisation de la culture cellulaire	201
9.2 Transfection.....	204
9.3 Modèle de souris TH-EGFP.....	207
CHAPITRE 10. Equivalence des isoformes du récepteur D2 dans leur fonction d'autorécepteur : implications et perspectives.	209
CHAPITRE 11 Régulation bidirectionnelle des récepteurs D2 et NTS1 dans les neurones dopaminergiques ; implications et perspectives.....	215
BIBLIOGRAPHIE	I
ANNEXES	I
ANNEXE 1 : Role of neurotensin in CNS pathophysiology: what is the evidence? ...	II
Contribution des co-auteurs	III
ABSTRACT / RÉSUMÉ	V
1. Neurotensin and neurotensin receptors	VI
1.1. Biosynthesis, maturation, release and degradation of neurotensin	VI
1.2 Neurotensin localisation in the CNS	VII
1.3 Pharmacology of neurotensin receptors	IX
2. Major physiological roles of neurotensin in the CNS.....	XIII
2.1 Action of NT on the DA system	XIV
2.1.1 Neurotensinergic innervation of DAergic neurons	XIV
2.1.2. Effect of NT on DAergic neuron firing rate and DA release.....	XIV
2.1.3. Regulation of dopamine receptor function.....	XV

2.2 Action of NT on other neurotransmitter systems.....	XVII
2.2.1. Evidence for the effect of NT on cholinergic transmission	XVII
2.2.2. Effect of NT on serotonergic neurotransmission	XVIII
2.2.3. Effect of NT on GABAergic neurotransmission.....	XIX
2.2.4. Effect of NT on glutamate neurons.....	XIX
2.3 Neuroendocrine effects of NT.....	XX
2.4 Action on non-neuronal cells	XXI
3. Role of neurotensin in schizophrenia?.....	XXII
4. Implication of NT in drug abuse?	XXVII
5. Implications of NT in Parkinson disease?.....	XXX
6. Implication of NT in pain mechanisms?	XXXIV
7. Possible implication of neurotensin in other diseases.....	XXXVII
ANNEXE 2 : Calcium-dependent, D2 receptor-independent induction of c-fos by haloperidol in dopamine neurons	XCVIII
Problématique	XCIX
Contribution des co-auteurs	C
ABSTRACT.....	CII
1. INTRODUCTION.....	CIII
2. METHODS	CVI
2.1 <i>Cell culture</i>	CVI
2.2 <i>Immunocytochemistry</i>	CVII
2.3 <i>In situ hybridization</i>	CVIII
2.4 <i>RT-PCR</i>	CX
2.5 <i>Drugs</i>	CXI
2.6 <i>Statistics</i>	CXI
3. RESULTS.....	CXII
3.1 <i>Haloperidol induces Fos expression in VTA dopaminergic neurons</i>	CXII
3.2 <i>Lack of involvement of D2 receptors.</i>	CXIII

<i>3.3 Lack of involvement of sigma receptors.</i>	CXIV
<i>3.4 Implication of a PKA independent mechanism.</i>	CXV
<i>3.5 Haloperidol induces Fos expression by an activity-dependent mechanism.</i>	CXVI
<i>3.6 Fos induction by haloperidol requires calcium.</i>	CXVII
<i>3.7 KN-93 blocks the induction of c-fos caused by haloperidol in dopaminergic neurons.</i>	CXVII
4. DISCUSSION.....	CXIX
ACKNOWLEDGEMENTS.....	CXXVII
REFERENCES	CXXVIII
FIGURE LEGENDS.....	CXXXV

Liste des tableaux

Tableau 1 :

Propriétés pharmacologiques des récepteurs de la DA.....17

Tableau 2 :

Propriétés pharmacologiques des récepteurs de la NT.....47

Liste des figures

Figure 1.1 : Voies de synthèse des catécholamines.....	3
Figure 1.2 : Dégradation de la dopamine.....	4
Figure 1.3 : Principaux noyaux dopaminergiques du cerveau.....	6
Figure 1.4 : Voies dopaminergiques centrales chez le rat.....	8-9
Figure 1.5 : Mécanismes communs expliquant la pathogenèse de la maladie de Parkinson.....	22
Figure 1.6 : Modèle neurodéveloppemental de la schizophrénie.....	26
Figure 2.1 : Structure du gène du récepteur D2 humain.....	29
Figure 2.2 : Localisation cellulaire des récepteurs D2.....	33
Figure 3.1 : Représentation schématique du précurseur de la NT (pro-NT/NN) du rat et des peptides apparentés détectés dans les tissus exprimant de précurseur.....	40
Figure 6.1 : Overexpression of D2 receptor isoform in cultured mesencephalic neurons..	107
Figure 6.2 : Subcellular localization of D2S and D2L dopamine receptors.....	108
Figure 6.3 : D2S and D2L are equipotent in inhibiting firing rate.....	109
Figure 6.4 : Dose-response curve of the effect of the D2 agonist quipirole on the firing rate of transfected neurons.....	110
Figure 6.5 : Both D2S and D2L mediate presynaptic inhibition in single transfected neurons.....	111
Figure 6.6 : Both D2S and D2L decrease intracellular calcium concentration.....	112
Figure 7.1 : Selectivity of EGFP expression in dopaminergic neurons increases over time in culture.....	154
Figure 7.2 : Electrophysiological characteristics cannot help discriminate dopaminergic neurons in culture.....	155
Figure 7.3 : Activation of somatodendritic D2 receptors inhibit firing rate.....	156
Figure 7.4 : Terminal D2 receptors inhibit neurotransmitter release in dopaminergic neurons.....	157

Figure 7.5 : Dopaminergic neurons show an increased firing rate in response to neurotensin.....	158
Figure 7.6 : Neurotensin induces an increase in intracellular calcium in dopaminergic neurons.....	159
Figure 8.1 : Effect of quinpirole on the spontaneous firing of DA neurons	194
Figure 8.2 : Activation of NTS1 reduces the effect of quinpirole on firing rate	195
Figure 8.3 : The excitatory effect of NTS1 is not required for the functional regulation of D2R function.....	196
Figure 8.4 : The functional interaction between D2R and NTS1 requires calcium	197
Figure 8.5 : The functional interaction between D2R and NTS1 is PKC-dependent	198
Figure 8.6 : D2R inhibits the ability of NTS1 to increase intracellular calcium in DA neurons.....	199
Figure 11.1 : Principales hypothèses expliquant les mécanismes moléculaires à l'origine de l'interaction entre les récepteurs D2 et NTS1.....	216

Figure de l'annexe 1:

Figure 1 : Sagittal representation of neurotensinergic pathways in the rodent brain.....XCVII

Figures de l'annexe 2:

Figure 1 : Haloperidol induces c-fos in dopaminergic neurons in culture quinpirole.....CXXXVIII

Figure 2 : D2 receptor blockade by haloperidol is not necessary to induce c-fos expression
in dopaminergic neurons.....CXXXIX

Figure 3 : Haloperidol induces Fos expression by an activity-dependent mechanism that is
independent of PKA activation.....CXL

Figure 4 : Effect of calcium chelation or calmodulin-dependent kinase inhibition on Fos
expression induced by haloperidolCXLI

Liste des abréviations

- AA : acide arachidonique
- ARNm : acide ribonucléique messenger
- ATP : adénosine triphosphate
- ATV : aire tegmentaire ventrale
- CHO : *chinese hamster ovary cells*
- COMT : catécholamine-O-méthyltransférase
- DA : dopamine
- DOPAC: dihydroxyphenylacetic acid
- EGFP: *enhanced green fluorescent protein*
- GIRK: *G protein-coupled inward rectifier potassium channel*
- HEK293: *human embryonic kidney cells*
- HeLa: lignée cellulaire provenant du carcinome cervical de Henrietta Lacks
- HVA: acide homovanillique
- LTP : potentialisation à long terme (long term potentialisation)
- MAO : monoamine oxydase
- MAPK : *mitogen activated protein kinase*
- MFB : *medial forebrain bundle*
- NIH 3T3: lignée cellulaire dérivée de fibroblastes de souris
- PET: *positron emission tomography*
- PLC : phospholipase C
- PLD : phospholipase D
- PKA : protéine kinase A
- PKC : protéine kinase C
- NT : neurotensine
- NN : neuromédine
- NAc : noyau accumbens

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

Rp-cAMPS : adenosine 3', 5'-cyclic monophosphorothioate, Rp-isomer

SN : substance noire

SNc : substance noire compacte

SNC : système nerveux central

SPECT : *single-photon emission computerized tomography*

TH : tyrosine hydroxylase

*À tout ceux qui m'ont encouragé à
poursuivre mon rêve.*

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche le Dr Louis-Éric Trudeau qui m'a su me faire découvrir et apprécier la recherche fondamentale. Je le remercie tout particulièrement de sa disponibilité, son encadrement et de ses conseils judicieux.

Le travail présenté n'aurait pu être réalisé sans l'aide des agents de recherche du laboratoire. Je voudrais donc souligner le travail d'Isabelle Jutras qui était présente à mes débuts au laboratoire et celui de Marie-Josée Bourque qui en plus de s'assurer du bon fonctionnement du laboratoire est une personne ressource toujours disponible.

Mille mercis à tous les collègues de laboratoire que j'ai eu la chance de côtoyer au fil des ans. Merci à Patrice, François et Annie, mes collègues de première heure qui ont réussi à faire régner un esprit de camaraderie et d'entraide au laboratoire. Merci à mes collègues actuels, en particulier Greg, Caro et Fannie qui ont su tendre l'oreille lors des moments difficiles.

La réalisation d'un projet de longue durée tel que le doctorat présente de nombreux défis qui s'accompagnent aussi d'un lot d'épreuves. Je voudrais donc remercier tous mes amis avec qui j'ai pu partager à la fois les moments de bonheur et ceux de détresse. Merci à ma famille qui ont fait de moi une personne persévérante et qui ont su m'inculquer la valeur d'un travail bien accompli.

Finalement, j'aimerais remercier mon tendre amoureux, celui qui sait me remettre les pieds sur terre et me faire réaliser que l'important avant tout c'est d'être heureux. Merci à tous pour cette générosité et cette amitié, sans vous l'accomplissement de ce projet de fou aurait été certainement plus pénible.

PREMIÈRE PARTIE
REVUE DE LA LITTÉRATURE

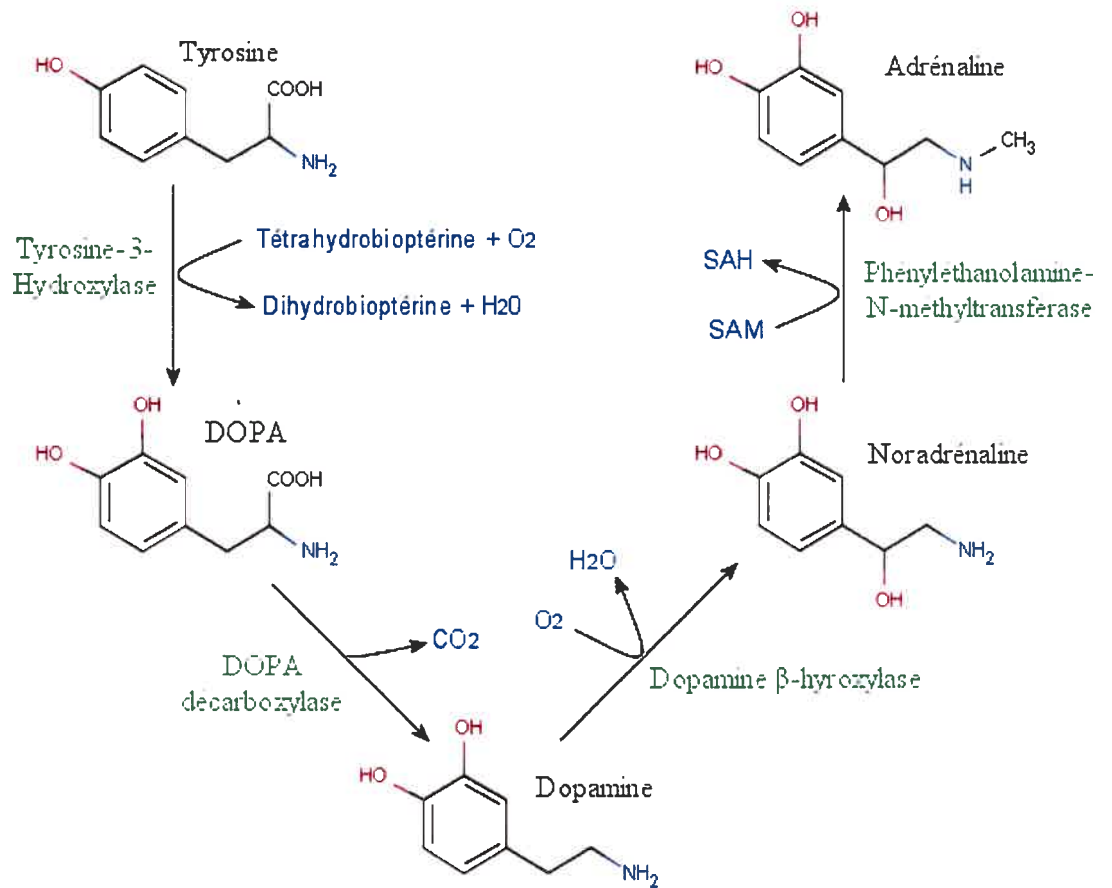
CHAPITRE 1. Le système dopaminergique

1.1 La dopamine

La dopamine est un neurotransmetteur appartenant à la famille des catécholamines, laquelle comprend également l'adrénaline et la noradrénaline. Ces neurotransmetteurs sont tous synthétisés à partir d'un précurseur commun : l'acide aminé L-tyrosine. La première étape et l'étape limitante dans la synthèse des catécholamines est l'hydroxylation de la L-tyrosine en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) sous l'action de l'enzyme tyrosine hydroxylase (Fig 1.1). Cette enzyme est d'ailleurs utilisée pour l'identification des neurones catécholaminergiques (Björklund & Hökfelt, 1984). La dopamine est ensuite formée suite à la conversion de la L-DOPA par la DOPA décarboxylase.

En plus de son rôle de neurotransmetteur, la dopamine sert de précurseur de l'adrénaline et la noradrénaline. L'hydroxylation de la dopamine par l'enzyme dopamine β -hydroxylase produit l'adrénaline. La dernière catécholamine à être biosynthétisée est la noradrénaline. Celle-ci résulte de l'ajout d'un groupement méthyl (-CH₃) sur la chaîne latérale de la molécule d'adrénaline sous l'action de la phénylethanolamine N-méthyltransférase (Feldman, Meyer, et al. 1997).

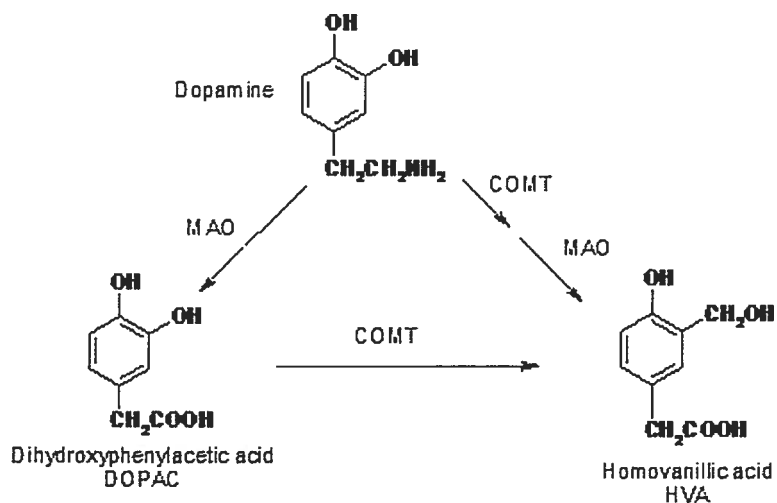
Figure 1.1 Voies de synthèse des catécholamines



Source : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Cat%C3%A9cholamine>

Une fois biosynthétisée, la DA est emmagasinée dans des vésicules synaptiques et sera libérée de façon calcium-dépendante. La transduction du signal est ensuite rapidement interrompue par la recapture de la DA dans la terminaison par le transporteur membranaire. À l'intérieur de la terminaison, la DA est ensuite convertie en DOPAC par la MAO. Par contre, la DA qui n'est pas recaptée sera métabolisée en DOPAC et en HVA par une action combinée de la MAO et de la COMT (Fig. 1.2).

Figure 1.2 Dégradation de la dopamine

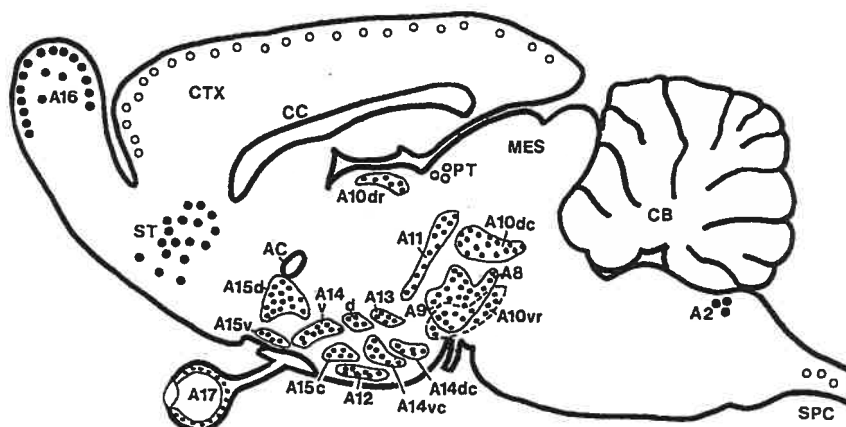


Source : http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/2003/nottingham_russell/2.html

1.2 Anatomie du système dopaminergique

La nomenclature des noyaux catécholaminergiques dans le SNC du rat a été proposée par Dahlstrom et Fuxe (Dahlstrom & Fuxe, 1964) et modifiée par la suite par Hökfelt et collaborateurs (Björklund & Hökfelt, 1984), est encore utilisée aujourd'hui. Selon cette nomenclature, il y a 10 noyaux dopaminergiques dans le cerveau (A8-A17). Les trois premiers noyaux se retrouvent dans le mésencéphale et correspondent au noyau rétrobulbaire (A8), à la substance noire (A9), nommée ainsi à cause de sa coloration résultant d'un fort contenu en fer et en neuromélanine, et à l'aire tegmentaire ventrale (ATV) (A10) (voir Fig. 1.3). Au niveau du diencéphale, au moins cinq groupes différents de cellules DA ont été identifiés : A11-A15. Sur la base de leur position dans des sections transversales, les corps cellulaires des cellules DA forment quatre groupes : A11 (noyau diencéphalique caudal localisé dans la matière grise périvericulaire du thalamus, de l'hypothalamus et du mésencéphale rostral), A12 (groupe de cellules DA du noyau arqué et de la partie adjacente du noyau périvericulaire), A13 (zona incerta) et A14 (groupe de cellules DA du noyau périvericulaire rostral). Des études subséquentes ont révélé la présence d'un autre groupe de cellules immunoréactives contre la TH et ont donc mené à l'identification du noyau A15 qui comprend les cellules DA situées dans la partie ventrale du lit du noyau de la strie terminale. Finalement, les corps cellulaires des neurones DA les plus rostraux dans le cerveau de rat se concentrent dans le tubercule olfactif et constituent le groupe A16. Le dernier groupe (A17) désigne les cellules DA de la rétine (revu dans (Sidhu, Laruelle, et al. 2003)).

Figure 1.3 Principaux noyaux dopaminergiques du cerveau.



Tiré de Sidhu, Laruelle et al., 2003, p260.

Ces noyaux sont à l'origine des trois principales voies du système dopaminergique : le système mésostrié, le système mésocorticolimbique, et le système tubéroinfundibulaire (Fig. 1.4). À l'origine, les projections des noyaux dopaminergiques du mésencéphale vers le télencéphale étaient subdivisées en deux systèmes : le système nigrostrié, prenant son origine dans la substance noire (A9), et le système mésolimbique dont l'origine se trouve dans l'ATV (A10) (Ungerstedt, 1971). Cependant des études plus récentes ont démontré que les projections de ces deux noyaux dopaminergiques se chevauchent dans plusieurs régions terminales, et donc le système dopaminergique englobant les neurones DA du mésencéphale se définit d'avantage comme une entité possédant un ordre topographique dans ses projections au système limbique, au striatum et au néocortex.

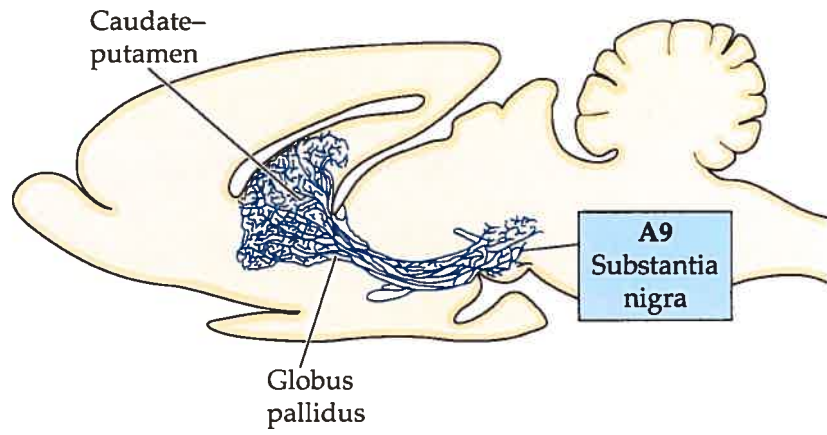
La SN (A9), l'ATV (A10) et une partie du noyau rétrobulbar (A8) sont à l'origine du système mésostrié. La partie dorsale de ce système, correspondant à la voie nigrostriée, se projette à travers le faisceau médian du télencéphale (medial forebrain bundle) et la capsule interne pour innerver le noyau caudé, le putamen et le globus pallidus (Feldman,

Meyer, et al. 1997). C'est d'ailleurs la dégénérescence de cette voie qui est à l'origine des troubles de locomotion observés dans la maladie de Parkinson. Le système mésostrié ventral comprend les projections au noyau accumbens, au tubercule olfactif et à la partie médiane du noyau caudé et du putamen.

Le système mésocorticolimbique prend aussi son origine dans le mésencéphale mais il est formé principalement des projections de l'ATV (A10) vers le septum, l'amygdale, l'hippocampe, le noyau de la bandelette diagonale de Broca, le noyau olfactif antérieur et certaines régions limbiques et corticales. Selon l'hypothèse dopaminergique classique de la schizophrénie, une hyperactivité du système mésocorticolimbique serait en cause (Feldman, Meyer, et al. 1997).

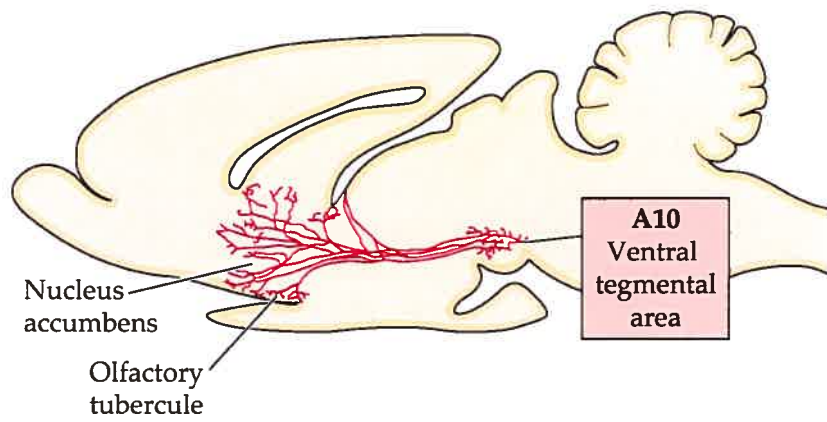
Le dernier système dopaminergique central est le système tubéroinfundibulaire. Les corps cellulaires du système dopaminergique tubéroinfundibulaire se situent dans le noyau arqué et le noyau périventriculaire (A12) et leurs axones innervent l'éminence médiane de même que le lobe antérieur et la pars intermedia de l'hypophyse (Björklund & Hökfelt, 1984). La dopamine libérée par les neurones de cette voie régule la sécrétion de prolactine par l'adénohypophyse.

(A)

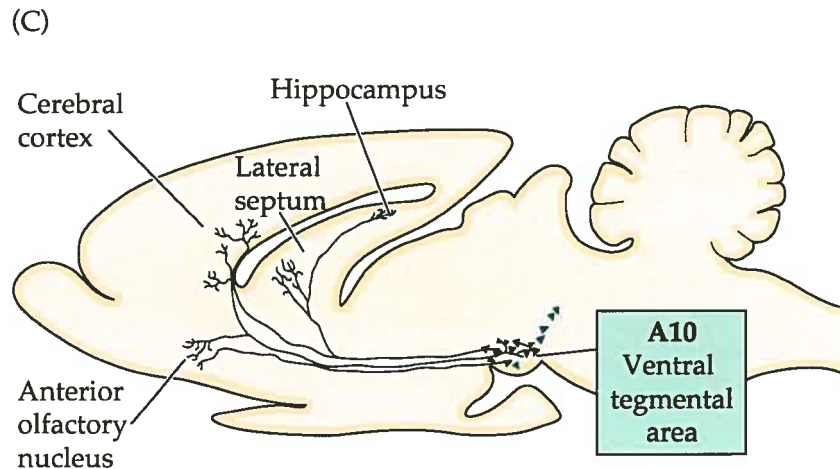


PSYCHOPHARMACOLOGY, Figure 5.7 (Part 1) © 2005 Sinauer Associates, Inc.

(B)



PSYCHOPHARMACOLOGY, Figure 5.7 (Part 2) © 2005 Sinauer Associates, Inc.



PSYCHOPHARMACOLOGY, Figure 5.7 (Part 3) © 2005 Sinauer Associates, Inc.

Figure 1.4 Voies dopaminergiques centrales chez le rat. Les corps cellulaires sont représentés par des triangles et les axones par des lignes pleines. (a) Voie mésostriée (nigrostriée) ; (b) voie mésostriée ventrale (mésolimbique); (c) voie mésocorticolimbique et (d) voie tubéroinfundibulaire.

1.3 Pharmacologie des récepteurs dopaminergiques

La dopamine produit son action en interagissant avec plusieurs récepteurs. La première démonstration de l'existence de récepteurs dopaminergiques dans le SNC provient d'études biochimiques réalisées en 1972 indiquant que la DA était en mesure de stimuler l'adénylyl cyclase (revu dans (Kebabian & Calne, 1979)). À ce jour, cinq sous-types de récepteurs à la DA ont été identifiés par clonage moléculaire. Ces récepteurs diffèrent quant à leur structure primaire et montrent des affinités distinctes pour certains agonistes et antagonistes dopaminergiques (revu dans (Missale, Nash, et al. 1998)) (Tableau 1). Leur

classification courante est basée sur les propriétés fonctionnelles de ces récepteurs. Les récepteurs appartenant à la classe D1 sont les sous-types D1 et D5, qui sont couplés à la protéine G_s et activent une adénylyl cyclase membranaire, une protéine à 12 domaines transmembranaires, pour stimuler la production d'AMPc dans le cytosol. La classe des récepteurs D2 comprend les sous-types D2, D3 et D4, qui se couplent aux protéines G inhibitrices G_i et G_o afin d'inhiber l'activité de l'adénylyl cyclase (Kebabian & Calne, 1979).

Le profil pharmacologique des récepteurs D1 et D5 ne permet pas de les distinguer. En effet, ces deux récepteurs de la classe D1 montrent une affinité similaire pour les antagonistes. Toutefois, ces composés montrent généralement une affinité légèrement plus grande pour le récepteur D1 que pour le récepteur D5 (Sunahara et al, 1991; Tiberi et al, 1991). Quant aux agonistes qui se lient à ces récepteurs, leur affinité pour les deux sous-types de récepteurs est presque identique. La différence la plus marquée est celle pour la DA elle-même, qui montre une affinité dix fois plus importante pour le récepteur D5 que pour le récepteur D1 (Sunahara et al, 1991).

Le récepteur D1 est le récepteur dopaminergique le plus fortement exprimé dans le cerveau (Dearry et al, 1990; Weiner et al, 1991; Fremeau et al, 1991). L'ARNm du récepteur D1 est abondant dans le striatum, le noyau accumbens et le tubercule olfactif, en plus d'être présent dans le système limbique, l'hypothalamus, le thalamus, ainsi que dans les cortex piriforme et entorhinal (Missale, Nash, et al. 1998). Par ailleurs, il y a aussi des régions où la protéine du récepteur D1 est abondante, notamment dans le noyau entopédunculaire et la substance noire réticulée (Gerfen et al, 1990; Le Moine et al, 1991), mais où aucun ARNm encodant ce récepteur n'a été détecté (Weiner et al, 1991; Fremeau et al, 1991; Fremeau et al, 1991). Ces observations suggèrent que, dans ces régions, le récepteur D1 est principalement localisé sur les projections axonales. Il a en effet été démontré que, dans ces noyaux, les récepteurs D1 sont situés sur les terminaisons de

neurones GABA exprimant la substance P et qui proviennent du striatum (Gerfen et al, 1990; Le Moine et al, 1991).

Le récepteur D1 est couplé à une protéine G_s et à la voie de l'adénylyl cyclase et de la PKA (Zhou et al, 1990; Monsma et al, 1990; Dearry et al, 1990). Les autres voies de signalisation possiblement couplées à ce récepteur incluent l'activation de la PLC, l'activation de canaux calciques (Cohen et al, 1992; Surmeier et al, 1995), l'inhibition de l'échangeur Na^+/H^+ (Felder et al, 1990; 1993) et l'inhibition de l'activité de la Na^+ , K^+ -ATPase (Laitinen, 1993; Chen & Lokhandwala, 1993; Shahedi et al, 1995). Il a aussi été démontré récemment que le récepteur D1 peut moduler la transmission glutamatergique en se couplant directement avec les récepteurs NMDA, des récepteurs de type canaux ioniques (Lee et al, 2002).

Bien que le récepteur D1 se couple préférentiellement à une protéine G_s , dans les systèmes hétérologues, cette protéine est peu présente dans le striatum où l'expression du récepteur D1 est abondante. Il semble plutôt que dans cette structure, l'activation de l'anénylyl cyclase par le récepteur D1 soit le résultat d'un couplage avec la protéine G_{oif} (Herve et al, 1993). Puisqu'il n'existe ni agoniste ni antagoniste sélectif au récepteur D1, la génération de souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur D1 ou exprimant un récepteur D1 muté et non fonctionnel a permis d'évaluer plus précisément l'implication de ce récepteur dans les fonctions physiologiques associées au système dopaminergique, tels que la locomotion, les comportements motivés et la cognition. Les souris avec une délétion du gène du récepteur D1 montrent une hyperactivité dans certains environnements, des troubles de mémoire spatiale et une mémoire de rétention anormale de la réponse de peur (Sidhu, Laruelle, et al. 2003). De plus, l'effet psychostimulant associé à la cocaïne et à l'amphétamine est absent chez les souris déficientes en récepteur D1. Par contre, la capacité de ces drogues à provoquer la dépendance n'est pas altérée (Sidhu, Laruelle, et al. 2003). Finalement, il a été démontré que la phase lente de la LTP ne peut être induite dans l'hippocampe de ces souris.

Le récepteur D5 a été identifié en utilisant la séquence codante du récepteur D1 comme sonde d'hybridation (Sunahara et al. 1991). Le récepteur D5 possède une homologie de séquence de 60% avec le récepteur D1 et cette homologie augmente à 80% en considérant uniquement les passages transmembranaires (Sidhu, Laruelle, et al. 2003). Puisque les régions transmembranaires contiennent les principaux déterminants de la liaison pour ce type de récepteur couplé aux protéines G (RCPG), il n'est pas étonnant que ces deux récepteurs montrent des pharmacologies presque identiques. Cependant, il existe des différences évidentes quant à l'abondance et au profil d'expression régional entre les récepteurs D5 et D1. En effet, le récepteur D5 est de 10 à 100 fois moins abondant et son expression est beaucoup plus diffuse dans le cerveau comparativement au récepteur D1 (Ariano et al, 1997; Ciliax et al, 2000). L'ARNm du récepteur D5 a été initialement détecté dans des régions où le récepteur D1 n'est que faiblement exprimé, comme l'hippocampe, le noyau mamillaire latéral et le noyau parafasciculaire du thalamus (Tiberi et al, 1991; Meador-Woodruff et al, 1992). D'autres études ont par la suite montré la présence de l'ARNm du récepteur D5 dans plusieurs autres régions du cerveau, notamment le cortex cérébral, le striatum, le noyau accumbens, le tubercule olfactif, l'hippocampe et l'hypothalamus (Huntley et al, 1992; Rappaport et al, 1993; Choi et al, 1995). Par ailleurs, le développement d'anticorps spécifiques dirigés contre le récepteur D5 a permis de déterminer plus précisément sa localisation cellulaire. Les études d'immunocytochimie et de microscopie électronique indiquent que les deux sous-types de récepteurs de la famille D1 ne montrent pas la même localisation cellulaire lorsque exprimés dans le même noyau. Par exemple, dans le striatum les deux récepteurs sont exprimés par les neurones épineux moyens tandis que le récepteur D5 est aussi exprimé par les interneurones cholinergiques (Bergson et al, 1995; Wong et al, 1999; Khan et al, 2000). Ces différences quant à la localisation régionale et cellulaire suggèrent que bien que les récepteurs D1 et D5 ne sont pas redondants sur le plan fonctionnel, même s'ils montrent un profil pharmacologique similaire.

L'appartenance du récepteur D5 à la famille des récepteurs D1 d'abord fondée sur l'homologie de séquence avec le récepteur D1 mais aussi sur sa capacité à activer l'adénylyl cyclase par son couplage à une protéine Gs. Par ailleurs, une des différences majeures entre le récepteur D5 et D1 est la capacité du récepteur D5 à activer l'adénylyl cyclase indépendamment de sa liaison à l'agoniste (Tiberi & Caron, 1994). Les études de délétion et de mutagenèse dirigée ont permis l'identification de certains résidus dans la troisième boucle intracellulaire et la queue C-terminale qui confèrent cette activité constitutive au récepteur D5. Les autres voies de signalisation possiblement couplées au récepteur D5 incluent certains canaux calciques régulés par la PKA (Sidhu, Laruelle, et al. 2003). Il a aussi été démontré dans des systèmes d'expression hétérologue que l'activation du récepteur D5 inhibe l'activité de la PLC (White et al, 1999) et celle de la PLD2 (Yang et al, 2005). Les rôles physiologiques associés au récepteur D5 ne sont pas encore très bien connus, dû au manque de ligands sélectifs. Il n'est donc pas encore possible pharmacologiquement d'activer ou de bloquer sélectivement les récepteurs D1 ou D5 *in vivo*. Des approches génétiques ont été utilisées pour contourner le problème. La réduction de l'expression du récepteur D5 par des antisens ou l'inactivation du gène chez les souris ont mis en évidence un rôle du récepteur D5 dans la régulation du comportement sexuel (Kudwa et al, 2005) et dans la réponse locomotrice induite par les agonistes dopaminergiques (Dziewczapolski et al, 1998). Finalement, l'inactivation du gène du récepteur D5 produit une hypertension chez les souris (Hollon et al, 2002).

Le récepteur D2 représente le prototype des récepteurs appartenant à la deuxième classe de récepteurs à la DA. Le récepteur D2 se retrouve principalement dans le striatum, le tubercule olfactif et le noyau accumbens. L'ARNm du récepteur D2 est aussi présent dans les cortex préfrontal, cingulaire, temporal et enthorinal, ainsi qu'au niveau de l'amygdale et de l'hippocampe. On le détecte aussi dans l'hypothalamus, la substance noire compacte et l'ATV, où il est exprimé par les neurones dopaminergiques (Meador-Woodruff et al, 1989; Weiner et al, 1991; Bouthenet et al, 1991). Par son couplage avec les protéines

$G_{i/o}$, le récepteur D2 module directement l'activité de l'adénylyl cyclase dans tous les environnements cellulaires étudiés. Toutefois le couplage du récepteur D2 à d'autres effecteurs peut différer d'un environnement cellulaire à l'autre. En effet, il semble que dans certains systèmes d'expression hétérologue, l'activation du récepteur D2 induit une mobilisation calcique, tandis que dans d'autres environnements cellulaires comme dans les cellules lactotrophes, l'effet net de la stimulation du récepteur D2 est une diminution des niveaux de calcium intracellulaire résultant d'une inhibition de canaux calciques (revu dans (Missale et al, 1998). Un des effets bien connu du récepteur D2 est l'activation de conductances potassiques, qui résulte d'une interaction directe entre la sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine $G_{i/o}$ et le canal K^+ de type GIRK et se traduit dans les neurones par une hyperpolarisation (Kim et al, 1995; Davila et al, 2003; Beckstead et al, 2004). Les autres effets cellulaires produits par le récepteur D2 incluent l'activation de la PKC, la potentialisation de la relâche d'acide arachidonique (Piomelli et al, 1991; Schinelli et al, 1994), l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ (Ganz et al, 1990; Neve et al, 1992; Felder et al, 1993) et l'activation des MAP kinases (Choi et al, 1999). Cependant, il est difficile de savoir si ces derniers effets sont le résultat d'une modulation directe par les sous-unités α ou $\beta\gamma$ de la protéine G ou s'ils dépendent d'une action indirecte ou de «cross-talk» entre les différentes voies de signalisation intracellulaire (Sidhu et al, 2003).

Le récepteur D2 qui est exprimé entre autres par les neurones dopaminergiques de l'ATV et de la SN, joue un rôle prépondérant dans la régulation de la transmission dopaminergique (Mercuri et al, 1997; L'hirondel et al, 1998). Le récepteur D2 a une fonction d'autorécepteur et régule directement la libération de dopamine (May & Wightman 1989; Benoit-Marand et al, 2001) (voir section 2.3). Ce récepteur exerce aussi une fonction endocrine en régulant la synthèse et la libération de prolactine (Sibley & Neve, 1997). Par ailleurs, le récepteur D2 avec le récepteur D1 est impliqué dans le contrôle de la locomotion. En effet, l'inactivation pharmacologique ou génétique du récepteur D2 provoque une réduction de l'activité locomotrice et de l'initiation de mouvement (Sidhu et

al, 2003). Finalement, puisque le récepteur D2 se retrouve dans les régions associées aux systèmes centraux de récompense, il n'est pas étonnant qu'il soit impliqué dans les comportements motivés et dans le développement de la dépendance aux drogues d'abus (Missale et al, 1998).

L'utilisation de la séquence du récepteur D2 comme sonde d'hybridation a permis d'isoler le récepteur D3, le second récepteur appartenant à de la famille des récepteurs D2 de la dopamine (Sokoloff et al, 1990). Dans le cerveau, ce récepteur est exprimé principalement dans les régions limbiques incluant le noyau accumbens, le tubercule olfactif et les îlots de Calleja (Le Moine et al, 1990; Bouthenet et al, 1991; Landwehrmeyer et al, 1993a; 1993b). L'ARNm du récepteur D3 a aussi été retrouvé dans la substance noire compacte et l'ATV, où il est exprimé par une minorité de neurones DA comparativement au récepteur D2, de même que dans le cervelet (O'Malley et al, 1992; Diaz et al, 1994). Une des propriétés générales de la classe des récepteurs de la famille D2 est la capacité d'inhiber l'activité de l'adénylyl cyclase. Bien que le récepteur D3 soit membre de cette famille, il semble que sa capacité à inhiber l'adénylyl cyclase soit faible et restreinte à certaines lignées cellulaires (Missale et al, 1998). L'évidence la plus convainquante jusqu'à maintenant est l'inhibition de l'adénylyl cyclase de type 5 par le récepteur D1 observée dans les cellules HEK (Robinson & Caron, 1997). Les autres voies de signalisation couplées au récepteur D3 comprennent notamment la régulation de courants Ca^{2+} et K^+ , la stimulation de la mitogenèse, la stimulation de l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ et l'activation de la PLD (Cussac et al, 1999; Kuzhikandathil & Oxford 1999; Everett & Senogles 2004). Bien qu'une certaine proportion de neurones DA exprime le récepteur D3, les études réalisées chez les souris dont le gène du récepteur D3 a été inactivé ont démontré que ce récepteur n'est pas en mesure d'agir comme autorécepteur (Koeltzow et al, 1998). Les comportements locomoteurs de ces souris suggèrent que le récepteur D3 joue un rôle dans l'inhibition de la locomotion (Sidhu et al, 2003).

Le récepteur D4 est le dernier des récepteurs de la famille des récepteurs D2 à avoir été identifié (Van Tol et al, 1991). Le récepteur D4 est fortement exprimé dans le cortex frontal, l'amygdale, l'hippocampe, l'hypothalamus et le mésencéphale (Van Tol et al, 1991; O'Malley et al, 1992). Des niveaux significatifs de l'ARNm du récepteur D4 ont aussi été détectés dans la rétine (Cohen et al, 1992). Un anticorps dirigé contre le récepteur D4 a permis de localiser sa présence dans certains neurones GABAergiques du globus pallidus, de la substance noire réticulée et dans le noyau réticulaire du thalamus (Mrzljak et al, 1996). Les voies de signalisation associée au récepteur D4 incluent l'inhibition de l'adénylyl cyclase (Cohen et al, 1992; Tang et al, 1994; McHale et al, 1994; Chio et al, 1994; McAllister et al, 1995), l'inhibition de courants calciques (Seabrook et al, 1994), la potentialisation de la relâche d'acide arachidonique (Chio et al, 1994), l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ (Chio et al, 1994) et l'inhibition de canaux K^+ (Pillai et al, 1998; Liu et al, 1999). Par ailleurs, il a été récemment démontré que dans les cellules CHO, le récepteur D4 peut activer la voie des MAPK par un mécanisme impliquant la transactivation du récepteur au PDGF (Oak et al, 2001). Les récepteurs D4 ont attiré beaucoup d'intérêt dernièrement du fait de leur rôle potentiel dans la schizophrénie. En effet, une augmentation de la densité de récepteurs D4 dans le striatum a été observée post-mortem dans le cerveau de schizophrènes. Un autre argument favorable à une implication du récepteur D4 dans la schizophrénie est la plus grande affinité de l'antipsychotique atypique clozapine pour le récepteur D4 que pour le récepteur D2. Toutefois, les antagonistes sélectifs pour le récepteur D4 jusqu'à maintenant développés se sont révélés inefficaces dans les études cliniques (revu dans (Helmeste & Tang 2000)).

Tableau 1- Propriétés pharmacologiques des récepteurs de la DA

	<i>Famille D1</i>		<i>Famille D2</i>		
	<i>D1</i>	<i>D5</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>	<i>D4</i>
<i>Structure du gène</i>	Séquence ne contient pas d'introns		Séquence contient de 3 à 6 introns. Variants d'épissage		
<i>Structure de la protéine</i>	RCPG avec une longue queue C-terminale et une 3 ^e boucle intracellulaire courte.		RCPG avec une queue C-terminale courte et une longue 3 ^e boucle intracellulaire.		
<i>Couplage à la protéine G</i>	G _{as} et G _{o1f}	G _{as}	G _{αi/0}		
<i>Voies de signalisation</i>	↑AMPc PLC et ↑IP ₃ Canaux Ca ²⁺ ↓ p. Na ⁺ /H ⁺ ↓ Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	↑AMPc ↓PLC ↓PLD2	↓AMPc ↑Canaux K ⁺ ↓Canaux Ca ²⁺ ↑AA ↑ p. Na ⁺ /H ⁺ ↑ PKC ↑ MAPK	↓AMPc ↑Canaux K ⁺ ↓Canaux Ca ²⁺ ↑AA ↑ p. Na ⁺ /H ⁺ ↑ MAPK ↑PLD	↓AMPc ↑AA ↑ p. Na ⁺ /H ⁺ ↑ MAPK
<i>Agonistes sélectifs</i>	SKF-38393		Quinpirole	Quinpirole 7-OH-DPAT	Quinpirole
<i>Antagonistes sélectifs</i>	SCH-23390		Domperidone L-714,626	Nafadotride	Clozapine L-745,870

Modifié de (Civelli et al, 1993)

1.4 Dysfonction du système dopaminergique

1.4.1 La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui se manifeste principalement par des troubles du mouvement. Cette affection touche près de 1% de la population de plus de 65 ans (Lang & Lozano 1998a, 1998b). Cliniquement, les patients atteints de Parkinson présentent généralement les symptômes cardinaux suivants : bradikinésie, tremblement au repos, rigidité musculaire et instabilité posturale. Par ailleurs, un certain nombre de patients souffrent aussi de troubles autonomiques et cognitifs.

Les principaux symptômes associés à la maladie de Parkinson sont le résultat de la neurodégénérescence sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire compacte (SNc). L'apparition des symptômes coïncide avec une perte de 60% des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée et une déplétion de 80% de la quantité de DA dans le putamen et (revu dans (Schulz & Falkenburger 2004). La seconde caractéristique histopathologique de cette maladie est la présence de corps de Lewy. Les corps de Lewy sont des inclusions cytoplasmiques composées de diverses protéines incluant la parkin, α -synucléine, l'ubiquitine, la synphiline et des neurofilaments. Ils se retrouvent notamment dans les neurones dopaminergiques résistants à la dégénérescence (Forno, 1996). Les principaux facteurs de risque associées à la maladie de Parkinson sont l'âge avancé, le sexe masculin et la race caucasienne. Les autres facteurs de risques sont ceux liés à l'environnement et à la génétique (Broussolle & Thobois, 2002).

Il existe des formes familiales de la maladie de Parkinson, qui sont attribuées à une mutation de certains gènes, dont ceux de l' α -synucléine, de la parkin, de UCHL-L1 (ubiquitin carboxy-terminal hydroxylase L1) et de PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) (revu dans (Moore et al, 2005). La transmission des gènes possédant ces mutations peut avoir lieu de façon autosomale dominante (α -synucléine et UCHL-L1) ou récessive

(parkine et PINK). Bien que les formes monogéniques de la maladie aient une importante composante génétique et qu'elles diffèrent médicalement et pathologiquement des formes sporadiques de Parkinson, toutes les formes de Parkinson possèdent des caractéristiques communes, dont la dégénérescence des neurones DA de la voie nigrostriée (Hardy et al, 2003). Ceci suggère que des mécanismes pathogènes communs peuvent être à l'origine de la pathologie.

L'observation de symptômes de type Parkinsonien chez de jeunes adultes de la Californie a mené à la découverte du MPTP, à l'origine vendu comme un substitut d'héroïne (Langston et al, 1983). Les recherches expérimentales ont ensuite révélé que le MPTP exerçait un effet neurotoxique puissant et sélectif sur les neurones dopaminergiques (Snyder & D'Amato, 1986). Cette toxine et d'autres toxines agissant sélectivement sur les neurones dopaminergiques (ex. 6-OH-DA) ont permis l'établissement de modèles animaux de Parkinson. Les études réalisées à l'aide de ces modèles de Parkinson et celles étudiant la fonction des gènes impliqués dans les formes héréditaires ont permis de mettre en évidence deux principales hypothèses expliquant la dégénérescence des neurones DA à l'origine de la maladie : le stress oxydatif, causé notamment par une dysfonction de la mitochondrie, et l'accumulation de protéines mal repliées par suite d'une dysfonction du système de dégradation dépendant de l'ubiquitine (revu dans (Moore et al, 2005).

En effet, les études post-mortem de cerveaux provenant de patients atteints de la forme sporadique de Parkinson ont systématiquement révélé des dommages causés par le stress oxydatif dans la substance noire zone compacte (SNc) (Jenner, 2003). Le stress oxydatif produit des dommages aux lipides, aux protéines et à l'ADN et donc compromet l'intégrité des neurones vulnérables et contribue à la dégénérescence neuronale. La source de cette augmentation du stress oxydatif n'est pas encore clairement établie, mais une hypothèse possible met en cause une dysfonction mitochondriale, de même que la production excessive de peroxyde d'hydrogène et d'espèces réactives de l'oxygène consécutif à une augmentation du métabolisme de la dopamine (Jenner, 2003).

La mitochondrie est le siège de la respiration cellulaire, un processus de réactions d'oxydo-réduction associé à la production d'ATP. Une dysfonction de la mitochondrie pourrait donc contribuer à la dégénérescence des neurones par la diminution de la production d'ATP et aussi par les dommages causés par une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène. Plusieurs manifestations d'une dysfonction ou d'une réduction de l'activité du complexe 1 (NADH déshydrogénase) de la chaîne respiratoire chez les patients présentant la forme sporadique de Parkinson appuient cette hypothèse (revu dans (Moore et al, 2005). De plus, des études épidémiologiques suggèrent que certains pesticides ou toxines qui inhibent le complexe 1, tels que le MPTP et le paraquat, peuvent causer le Parkinson (Thiruchelvam et al, 2000 ; Sherer et al, 2002 ; Dauer & Przedborski 2003). Même si aucun lien direct n'a été identifié entre le complexe 1 et une forme monogénique de Parkinson, il existe une relation entre la dysfonction mitochondriale et les formes héréditaires de Parkinson. En effet, il semble qu'une des conséquences d'une inhibition du complexe 1 de la chaîne respiratoire soit l'accumulation d'inclusions positives pour la protéine α -synucléine (Forno et al, 1988 ; Betarbet et al, 2000 ; Manning-Bog et al, 2002). Finalement, certains produits de gènes retrouvés dans les formes monogéniques de Parkinson semblent également impliqués dans la régulation de la fonction des mitochondries dont la protéine Parkin (revu dans (Moore et al, 2005).

D'autre part, des données récentes suggèrent qu'une dysfonction du système de dégradation dépendant de l'ubiquitine puisse aussi être à l'origine de la pathogenèse moléculaire des formes familiale et sporadique de la maladie de Parkinson (Giasson & Lee 2003; Moore et al, 2003). Cette hypothèse est supportée notamment par les problèmes de structure et de fonction du protéasome observés dans la SNc des patients atteints de la forme sporadique du Parkinson (McNaught et al, 2002; 2003). De plus, il a été démontré que l'inhibition de la fonction du protéasome par injection systémique d'époxomicine chez le rat provoque l'apparition des caractéristiques typiques de la maladie de Parkinson, incluant la mort sélective des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée (McNaught

et al, 2004). Toutefois, l'observation la plus convaincante impliquant une dysfonction du protéasome dans la pathogenèse du Parkinson est certainement l'association de la protéine parkin avec certaines formes familiales de la pathologie. En effet, on croit que les mutations dans la protéine parkin peuvent altérer la régulation de la dégradation dépendante de l'ubiquitine par le protéasome et donc causer une accumulation aberrante de protéines et éventuellement la mort neuronale (Chung et al, 2001).

En résumé, la dysfonction mitochondriale, le stress oxydatif et un déficit dans la fonction du protéasome peuvent être à l'origine de la pathogenèse à la fois des formes familiales et sporadiques de la maladie de Parkinson. Les mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs et peuvent être liées les unes aux autres à de multiples niveaux (Fig.1.5).

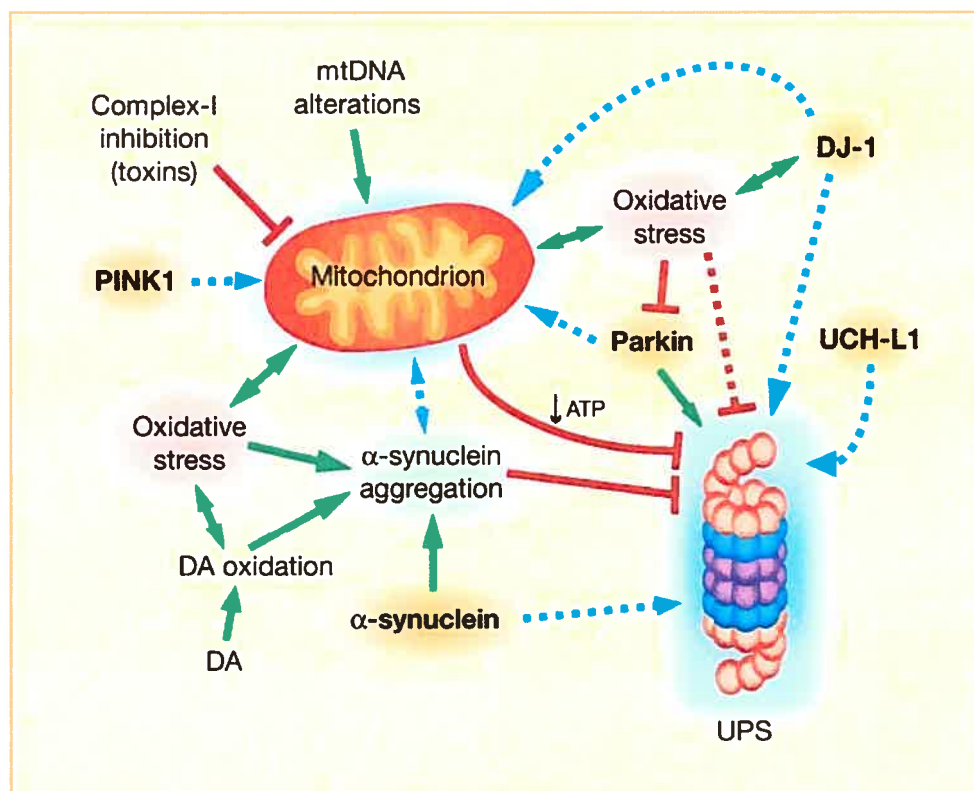


Figure 1.5 : Mécanismes communs expliquant la pathogenèse de la maladie de parkinson. Les mutations observées dans cinq gènes encodant les protéines α -synucléine, parkin, UCH-L1, PINK1 et DJ-1 sont associées aux formes familiales de Parkinson via différentes voies menant à une dysfonction mitochondriale ou interférant avec le processus de dégradation dépendant de l'ubiquitine. L'agrégation de l' α -synucléine est favorisée par des mutations, le stress oxydatif et l'oxydation de la DA interférant avec le protéasome et possiblement avec celle de la mitochondrie. Les effets inhibiteurs sont représentés par les lignes rouges. Les flèches vertes indiquent les relations entre les composantes, et les bleues, les relations présumées.

Tirée de Moore et al. 2005.

1.4.2 La schizophrénie

La schizophrénie est une pathologie psychiatrique d'évolution chronique qui affecte près de 1% de la population à travers le monde. Elle a pour conséquences une altération de la perception de la réalité, des troubles cognitifs, et un dysfonctionnement social et comportemental important. Le début de la maladie se situe habituellement entre la fin de l'adolescence et le début de l'âge adulte. La schizophrénie est caractérisée cliniquement par la présence, en proportion variable, de symptômes de trois types : les symptômes psychotiques ou « positifs », les symptômes « négatifs » et des troubles cognitifs (révisé dans (Wong & Van Tol 2003). Les symptômes psychotiques incluent la présence d'hallucinations, d'idées délirantes et de troubles de la pensée. Les symptômes négatifs sont ainsi nommés car ils reflètent le déclin de fonctions normales et se traduisent par de graves perturbations dans l'interaction sociale, une pauvreté du discours, un affect plat, de l'anhédonie et de l'apathie (Wong & Van Tol 2003). Les troubles cognitifs associés à la schizophrénie affectent l'attention et la mémoire. Les symptômes négatifs et cognitifs sont davantage chroniques tandis que les symptômes psychotiques sont plutôt épisodiques (Wong & Van Tol 2003).

Bien que l'étiologie de la schizophrénie demeure encore relativement mal définie, un certain nombre de théories explicatives ont été proposées. La théorie classique est l'hypothèse dopaminergique de la schizophrénie. Cette hypothèse suggère qu'une hyperactivité de la neurotransmission dopaminergique mésolimbique soit à la base de la pathogenèse de la schizophrénie (Snyder et al, 1974 ; Carlsson 1988). La corrélation entre les doses thérapeutiques des antipsychotiques et leur affinités respectives pour les récepteurs D2 (Seeman, 1987 ; Miyamoto et al, 2001), ainsi que le fait que certains agonistes dopaminergiques indirects (cocaïne, L-dopa et amphétamines) puissent provoquer des psychoses chez des sujets sains et des symptômes psychotiques chez les schizophrènes (Carlsson, 1988) sont les premières données sur lesquelles se base cette théorie.

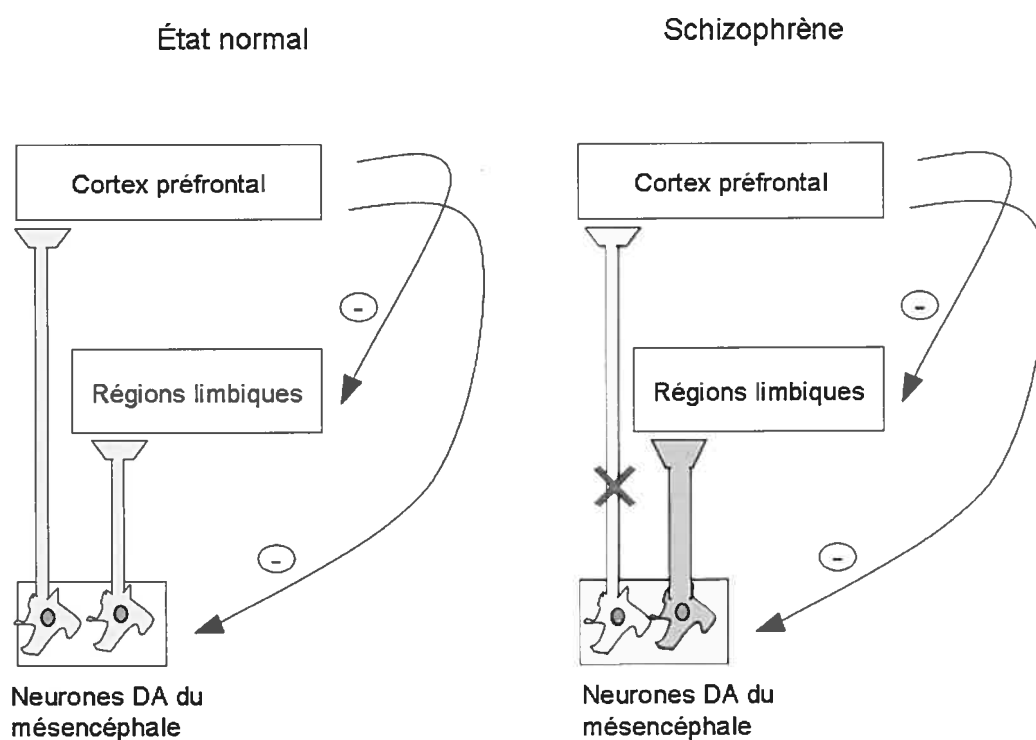
L'hypothèse dopaminergique est aussi supportée par les études d'imagerie qui ont démontré l'existence d'une dysfonction dopaminergique chez des patients schizophrènes. En effet, les études réalisées en TEP (Tomographie par émission de positons) et TEM (Tomographie par émission monophotonique ont montré que la libération de DA par suite d'une stimulation à l'amphétamine est augmentée chez les schizophrènes comparativement à un groupe de sujets témoins (Laruelle et al, 1996 ; Breier, Su, et al. 1997 ; Abi-Dargham et al, 1998).

Il faut noter toutefois qu'une dysfonction dopaminergique ne permet pas d'expliquer tous les symptômes associés à la schizophrénie. L'inefficacité des antipsychotiques à soulager les symptômes négatifs a entraîné le développement de nouvelles hypothèses quant à l'étiologie de la schizophrénie. Récemment, les études cliniques et le développement de nouveaux marqueurs neuroanatomiques ont mené à l'hypothèse voulant que la schizophrénie soit davantage une maladie neurodéveloppementale (Weinberger 1987; Sawa & Snyder 2002). L'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie a été proposée par Weinberger et suggère que la maladie résulte d'anomalies du développement et de la maturation du système nerveux. Les facteurs environnementaux, en association avec une prédisposition génétique, interfèreraient avec l'élaboration et la formation des structures cérébrales depuis la vie intra-utérine jusqu'au début de l'âge adulte. Ces anomalies auraient une répercussion sur l'architecture cérébrale, mais aussi sur le fonctionnement des populations neuronales sécrétant les neurotransmetteurs impliqués dans la symptomatologie de la schizophrénie.

Selon ce modèle l'apparition des symptômes cliniques serait la conséquence d'un déséquilibre entre la transmission dopaminergique corticale et sous-corticale. Les symptômes psychotiques ou positifs résulteraient d'une hyperactivité de la voie dopaminergique mésolimbique, tandis qu'une diminution de l'activité des terminaisons dopaminergiques qui innervent le cortex préfrontal expliquerait les symptômes négatifs (Weinberger 1987). Pour expliquer cette régulation opposée des deux systèmes

dopaminergiques, il a été proposé que l'hypoactivité de la voie mésocorticale engendre une levée de la rétroaction négative normalement exercée sur la voie mésolimbique (Fig. 1.6) Puisque des changements neurochimiques ont aussi été observés dans d'autres systèmes de neurotransmission (glutamatergique et sérotoninergique) et que les antipsychotiques peuvent dans certains cas avoir une bonne affinité pour des récepteurs n'appartenant pas à la famille des récepteurs D2 de la DA, d'autres hypothèses ont aussi été proposées. Une de ces hypothèses explique les symptômes observés chez les schizophrènes par une hypofonction des récepteurs NMDA. Selon cette hypothèse, les troubles comportementaux et cognitifs sont le résultat d'une libération excessive de neurotransmetteurs excitateurs causée par une hypofonction des récepteurs NMDA (Olney, Newcomer, 1999). Par ailleurs, l'observation que le LSD, un hallucinogène, puisse mimer certains symptômes associés à la pathologie est à l'origine de l'hypothèse prônant une implication du système sérotoninergique (Aghajanian & Marek, 2000). Néanmoins, l'hypothèse neurodéveloppementale de la pathogenèse de la schizophrénie demeure l'hypothèse prévalente à ce jour.

Figure 1.6 Modèle neurodéveloppemental de la schizophrénie



Modifié de (Weinberger 1987)

1.4.3 La dépendance aux drogues d'abus

La dépendance aux drogues peut se définir comme un désordre chronique qui se manifeste sous forme d'une contrainte psychologique et/ou physique qui force l'individu affecté à maintenir sa consommation de drogue sans pouvoir en contrôler ou en réduire la prise. Les drogues provoquant une dépendance produisent toutes une euphorie en activant les centres du plaisir du cerveau. Cet effet euphorisant est associé à une augmentation des concentrations régionales de DA dans le NAc (Di Chiara & Imperato 1988; Wise & Rompre 1989) et apparaît essentiel pour que ces drogues renforcent le comportement de prise de drogue et le développement de la dépendance (Koob & Le Moal 2001; Robinson & Berridge 2003). D'où l'importance du système dopaminergique méso-cortico-limbique, qui comprend les projections vers le NAc et le cortex préfrontal, et facilite l'encodage des associations apprises, nécessaires au développement de la dépendance (Jay 2003). En revanche, une fois qu'une personne est dépendante à une drogue, le besoin incontrôlable qu'elle a de s'en procurer et le phénomène de rechute résulterait plutôt d'une forme pathologique de plasticité (Pierce & Kalivas 1997; Wolf 1998; Thomas et al, 2001; Winder et al, 2002).

Une des découvertes les plus importantes pour la compréhension des comportements motivés est l'observation faite par James Olds et Peter Milner (Olds & Milner 1954) que la stimulation électrique intracrânienne de certaines régions du cerveau peut produire le renforcement positif d'un comportement. Ce type d'expérience a permis d'identifier les principales structures anatomiques composant le système de récompense central. Les projections prenant leur origine dans l'aire tegmentaire ventrale libèrent de la DA à travers le circuit en réponse à divers événements motivants (revu dans (Kalivas & Volkow 2005). Les drogues d'abus agissent sur le système de récompense central et augmentent la libération de DA notamment dans le NAc.

Les psychostimulants comme la morphine et l'amphétamine activent directement les neurones DA. La cocaïne se lie au transporteur membranaire (DAT) de la DA et bloque sa recapture. L'amphétamine stimule la libération de DA en favorisant le transport inverse du DAT et augmentant la redistribution de la DA vésiculaire vers le cytosol (Sulzer et al,

2005). La nicotine augmente la libération de DA en se liant de façon sélective à la famille de récepteurs nicotiques de l'acétylcholine. Ces récepteurs de type canal ionique sont exprimés par les neurones dopaminergiques de l'ATV et leur activation augmente l'excitabilité des neurones dopaminergiques (Di Chiara & Imperato 1988; Stolerman & Jarvis 1995). Finalement, les opiacés dont font partie l'héroïne et la morphine stimulent la libération de DA par un effet indirect. Le renforcement positif induit par les opiacés est le résultat de leur action sur les récepteurs μ -opiacés présents sur les interneurones GABA de l'ATV (Di Chiara & North 1992). L'activation de ces récepteurs présynaptiques inhibe la libération de GABA, ce qui a pour effet de lever l'inhibition de l'activité des neurones DA produite par les interneurones.

CHAPITRE 2. Le récepteur D2, un autorécepteur

2.1 Gène et structure

Le récepteur D2 a été isolé par homologie de séquence en utilisant la séquence codante du récepteur β 2-adrénérgique comme sonde d'hybridation (Bunzow et al, 1988). L'isolation de l'ADNc du récepteur D2 chez le rat et chez l'humain a ensuite permis la caractérisation de la structure du gène (Grandy et al, 1989) (Fig 2.1). La transcription du gène du récepteur D2 génère deux isoformes par épissage alternatif de l'exon 6. L'isoforme longue (D2L, 444 a.a.) diffère de l'isoforme courte (D2S, 415 a.a.) par la présence d'une portion de 29 acides aminés dans sa troisième boucle intracellulaire (Dal Toso et al, 1989; Monsma et al, 1989).

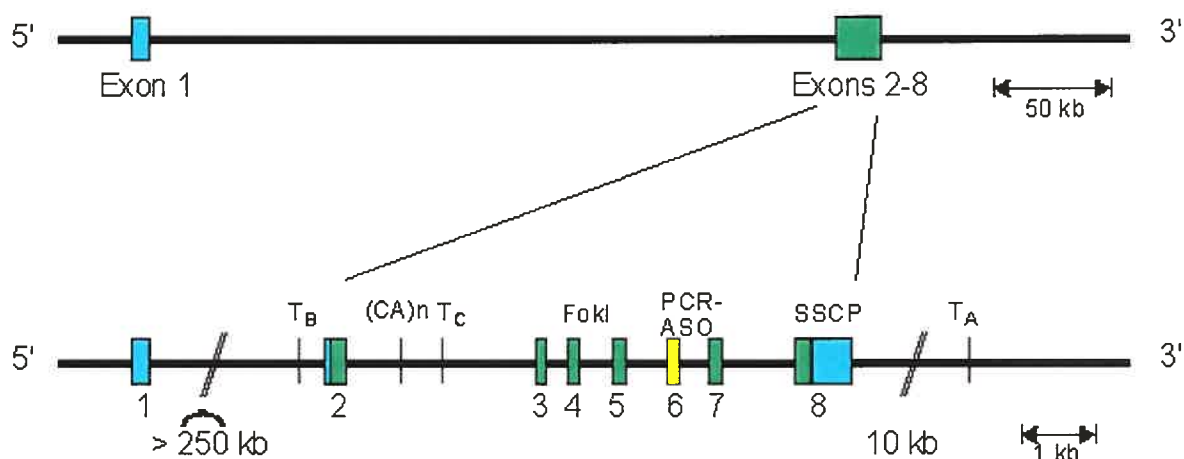


Figure 2.1. Structure du gène du récepteur D2 humain. Le gène du récepteur D2 contient 8 exons; le premier exon est séparé du second par un intron de 250 kb. Deux produits de transcription sont générés par épissage alternatif de l'exon 6.

Source : <http://javelin.commed.unsw.edu.au/karen/thesis/intro2.htm>

2.2 Différences fonctionnelles entre les isoformes

Puisque les deux isoformes du récepteur D2 diffèrent par une insertion dans la troisième boucle intracellulaire, une région importante dans le couplage du récepteur à la protéine G et à ses effecteurs, l'existence de variants d'épissage pourrait avoir un rôle fonctionnel. Plusieurs groupes de recherche ont donc tenté d'identifier des différences entre les deux isoformes quant à leur couplage aux protéines G, leur efficacité de couplage à divers effecteurs et leur régulation. Plus récemment, la génération de souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur D2 ou seulement la forme courte a permis d'évaluer la contribution de chacune des isoformes aux effets comportementaux associés à ce récepteur.

Bien que les deux isoformes montrent un profil pharmacologique semblable (Castro & Strange, 1993; Leysen et al, 1993), plusieurs études réalisées dans des systèmes d'expression hétérologue suggèrent qu'il existe des différences dans leur couplage aux protéines G. Ces études ont indiqué que le D2S et le D2L montrent des capacités différentes à inhiber l'activité de l'adénylyl cyclase (Montmayeur et al, 1993; Senogles, 1994; Guiramand et al, 1995) et à moduler certains canaux sensibles au voltage (Liu et al, 1994; Liu et al, 1996; Wolfe & Morris, 1999). Il semblerait toutefois que l'insertion de 29 acides aminés ne serait pas suffisante pour déterminer la spécificité de couplage d'une isoforme avec un sous-type de protéine G (Kendall & Senogles, 2006).

Certaines différences ont aussi été notées dans les mécanismes empruntés par les deux isoformes pour activer la voie des MAPK (Choi et al, 1999; Kim et al, 2004). L'activation de la voie des MAPK par le D2S et le D2L implique les sous-unités $\beta\gamma$ de la protéine G. Toutefois, dans le premier cas, l'activation des MAPKs requiert l'internalisation du récepteur tandis que le D2L active cette même voie par transactivation de récepteurs à activité tyrosine kinase (récepteurs aux PDGF ou EGF) (Kim et al, 2004). Finalement, il a aussi été démontré que les variants d'épissage du récepteur D2 peuvent être différemment régulés par la PKC. La mobilisation calcique induite dans les cellules Ltk par

l'activation de D2S, mais non de D2L, est inhibée par l'activation de la PKC (Liu et al, 1992).

Les données les plus convaincantes supportant un rôle fonctionnel distinct pour chacune des isoformes du récepteur D2 proviennent d'études comparatives sur les modèles de souris n'exprimant aucune des isoformes (D2^{-/-}) ou uniquement l'isoforme courte (D2L^{-/-}). Ces études ont permis de démontrer un rôle préférentiel du récepteur D2L dans les réponses post-synaptiques associés généralement au récepteur D2, telles que la stimulation de la réponse locomotrice et la catalepsie induite par les antipsychotiques (Wang et al, 2000; Usiello et al, 2000). En revanche, le récepteur D2S, qui est exprimé de façon préférentielle par les neurones dopaminergiques du mésencéphale (Montmayeur et al, 1991; Khan et al, 1998), est associé à la fonction d'autorécepteur (Wang et al, 2000; Centonze et al, 2002; Lindgren et al, 2003). En effet, chez les souris qui expriment uniquement le récepteur D2S, les fonctions présynaptiques reliées à la régulation de la libération de dopamine et à l'effet inhibiteur d'un agoniste D2 sur l'activité locomotrice sont préservées. Finalement, il a été démontré toujours à l'aide de ces modèles de souris transgéniques, que les deux isoformes du récepteur D2 participent différemment à la régulation de la transmission GABAergique et glutamatergique dans le striatum. En effet, alors que les deux isoformes participent également à l'inhibition présynaptique de la transmission GABAergique, le récepteur D2S serait plus efficace à inhiber la libération du glutamate dans le striatum (Centonze et al, 2004).

Par contre, on ignore toujours comment les deux isoformes peuvent à la fois être aussi efficaces à inhiber la libération de GABA, mais réguler différemment la libération de glutamate dans le striatum, ou encore l'activité des neurones dopaminergiques du mésencéphale. Serait-ce lié à une expression différentielle des deux isoformes où simplement dû au fait que le couplage du D2S aux voies de signalisation qui régulent la libération de glutamate et de dopamine soit plus efficace dans certaines populations neuronales que d'autres? Il est important d'évaluer ces possibilités afin de déterminer

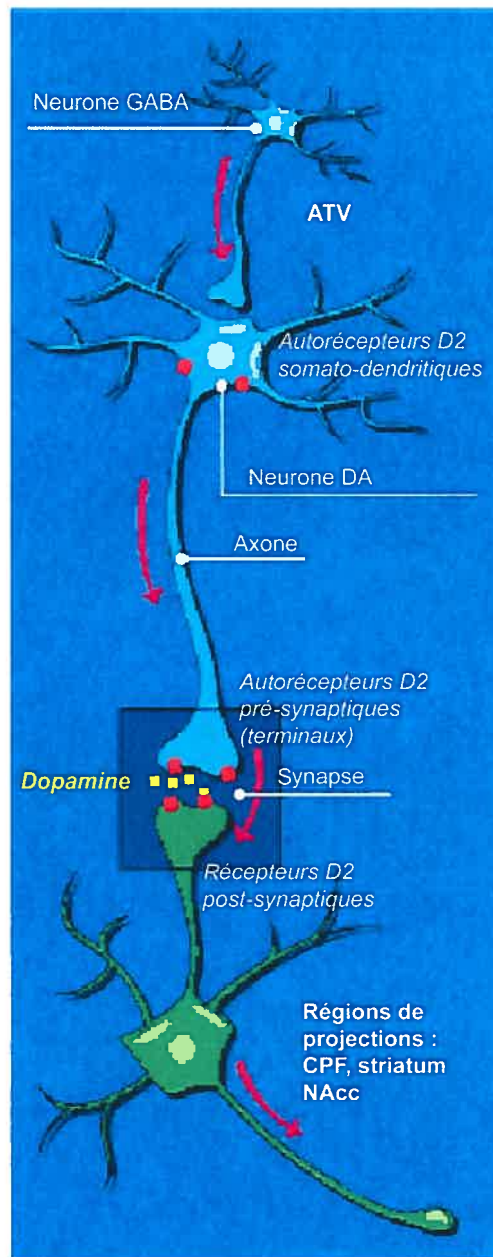
pourquoi le récepteur D2S est plus efficace que le D2L comme récepteur présynaptique et plus particulièrement pourquoi il paraît être l'autorécepteur préférentiel des neurones dopaminergiques.

2.3 Autorécepteur D2

La plupart des neurones possèdent des autorécepteurs situés non seulement sur leurs terminaisons axonales mais aussi sur leur corps cellulaire et leurs dendrites. L'activation de ces autorécepteurs terminaux ou somatodendritiques fait partie d'une boucle de rétroaction négative et produit une autoinhibition de la neurotransmission. Pour les neurones DA, il a été suggéré que les récepteurs D2 et D3 pourraient jouer ce rôle puisqu'ils sont tous deux exprimés par les neurones DA (Tepper et al, 1997; Diaz et al, 2000). Toutefois, il a été clairement démontré que des neurones DA de souris n'exprimant pas le récepteur D2, mais exprimant le récepteur D3, ne montrent pas d'autoinhibition en réponse à la DA ou à l'agoniste quinpirole (Mercuri et al, 1997; L'hirondel et al, 1998), tandis que ces réponses sont conservées chez des souris dont le récepteur D3 a été inactivé (Koeltzow et al, 1998).

Selon qu'ils sont situés sur les terminaisons axonales ou les corps cellulaire et dendrites, les autorécepteurs D2 réguleront différemment les neurones DA : les récepteurs somatodendritiques réduisent l'excitabilité cellulaire, tandis que les autorécepteurs terminaux inhibent la synthèse et la libération de DA (illustré à la figure 2.2).

Figure 2.2 Localisation cellulaire des récepteurs D2.



Modifié de <http://www.assemblee-nationale.fr/rap-ocst/drogues/i3641-15.asp>

2.3.1 Régulation de l'excitabilité des neurones DA

Aghajanian et Bunney (Aghajanian & Bunney, 1977) ont été parmi les premiers à démontrer par des enregistrements extracellulaires *in vivo* que la stimulation des autorécepteurs avec la DA produit une inhibition de la fréquence de décharge des neurones DA (revu dans (Mercuri et al, 1992). Les agonistes dopaminergiques directs (apomorphine, bromocriptine) et indirects (levodopa, amphétamine et cocaïne) sont aussi en mesure d'inhiber l'activité spontanée des neurones DA. Il a été démontré que cette inhibition est tributaire de l'activation des autorécepteurs D2 somatodendritiques puisque les antipsychotiques (antagonistes D2) bloquent cette réponse (Mercuri et al, 1992).

L'action de la DA et des divers agents dopaminergiques étudiés *in vitro* a permis de démontrer que l'effet inhibiteur de ces agents sur l'excitabilité cellulaire des neurones DA est associé à une hyperpolarisation de la membrane. En effet, les enregistrements électrophysiologiques réalisés sur différentes préparations de neurones DA (neurones dissociés aigus, en culture ou dans une tranche de mésencéphale) ont tous montré une hyperpolarisation des neurones DA causée par une augmentation d'une conductance K^+ en réponse à la DA (Lacey et al, 1987; Mercuri et al, 1989; Roeper et al, 1990; Chiodo & Kapatos, 1992). Cette réponse est bloquée par les antagonistes D2 et absente dans les neurones DA provenant de souris n'exprimant pas le récepteur D2 (Mercuri et al, 1997). La caractérisation plus détaillée de la conductance K^+ activée par le D2 dans les neurones de la SNc dissociés a montré que celle-ci est sensible à un traitement à la toxine pertussique (Uchida et al, 2000), suggérant que l'effet inhibiteur sur la fréquence de décharge des neurones DA soit le résultat de l'activation de canaux K^+ de type GIRK (G protein-coupled inward rectifier K^+ channel) par l'autorécepteur D2.

2.3.2 Régulation de la synthèse et de la libération de dopamine

La première démonstration d'une modulation de la synthèse de DA par les autorécepteurs présynaptiques de la DA a présentée en 1972 par le groupe de Carlsson (Kehr et al, 1972). Ces auteurs ont constaté que lorsque la propagation des potentiels d'action dans les neurones DA de la voie nigrostriée est interrompue par une axotomie, le taux d'hydroxylation de la tyrosine est augmenté dans les terminaisons DA du striatum. Depuis cette observation, il a été démontré que les autorécepteurs D2 terminaux exercent une régulation de type rétroaction négative sur la synthèse de la dopamine. La synthèse de dopamine est régulée par l'activité de l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH) et l'activité de cette enzyme dépend de son état de phosphorylation (revu dans Feldman et al, 1997). Dans un modèle de synaptosomes et en tranches de striatum, il a été démontré que l'activation des autorécepteurs D2 diminue l'incorporation de phosphate par la TH et que ces changements de phosphorylation de la TH coïncident avec une diminution de son activité (revu dans Wolf & Roth, 1990). Par ailleurs, l'inhibition de l'activité de l'adénylyl cyclase et de la PKA par le récepteur D2 pourrait être en partie responsable de cet effet sur la synthèse de DA (Onali et al, 1988; 1992).

En plus de réguler la synthèse de DA, les autorécepteurs D2 terminaux régulent la neurotransmission dopaminergique en inhibant la libération de DA dans les régions de projection (Cass & Zahniser, 1991; Stamford et al, 1991; Kennedy et al, 1992). La régulation présynaptique de la libération de DA exercée par le récepteur D2 implique l'activation d'une conductance K^+ (Bowyer & Weiner, 1989; Zahniser et al, 1992). Des données récentes suggèrent cependant que les récepteurs D2 présynaptiques pourraient également réguler la neurotransmission DA en interagissant directement avec les vésicules ou des protéines impliquées dans l'exocytose (Congar et al, 2002; Binda et al, 2005).

La libération de DA par les neurones DA a lieu non seulement au à partir des terminaisons dans les régions de projection, mais aussi dans les régions du cerveau où sont

localisés les corps cellulaires des neurones DA (Fortin et al, 2006; revu dans Adell & Artigas, 2004). Comme mentionné à la section précédente, la DA libérée dans les noyaux DA exerce un rôle de neuromodulation en activant les autorécepteurs D2 somatodendritiques. Cependant, cette libération est aussi régulée mais de façon moins importante, par les autorécepteurs D2. En effet, les études réalisées en voltamétrie ont démontré que l'effet inhibiteur d'un agoniste D2 sur la libération de DA stimulée électriquement est 2 à 3 fois moins important dans la SNc que dans le striatum et que cet effet est même totalement absent dans l'ATV (Iravani et al, 1996; Cragg & Greenfield, 1997). Il semble donc que l'autoinhibition exercée par les récepteurs D2 joue un rôle beaucoup moins significatif dans la régulation de la libération somatodendritique comparativement à la libération axonale de DA.

Conclusion

La découverte des variants d'épissage du récepteur D2 a ouvert un nouveau champ de recherche. Plusieurs groupes ont en effet tenté d'identifier des différences entre les deux isoformes. Les données les plus convaincantes supportant un rôle fonctionnel distinct pour chacune des isoformes du récepteur D2 proviennent d'études comparatives sur les modèles de souris n'exprimant aucune des isoformes ($D2^{-/-}$) ou uniquement l'isoforme courte ($D2L^{-/-}$). Ces études ont conclu à un rôle d'autorécepteur préférentiel pour le récepteur D2S (Wang et al, 2000; Uziel et al, 2000). Puisque les neurones DA expriment les deux isoformes et qu'il a été démontré qu'ils peuvent réguler de façon aussi efficace la libération de GABA, comment peut-on expliquer que le récepteur D2S soit l'autorécepteur préférentiel dans les neurones dopaminergiques? Cette question, qui demeure sans réponse pour le moment soulève plusieurs hypothèses : il est possible que dans les neurones dopaminergiques, seul le récepteur D2S soit exprimé dans l'axone ou encore qu'il se couple plus efficacement aux conductances qui régulent l'excitabilité des neurones DA ou aux voies de signalisation qui régulent la libération de dopamine. Il se peut également que la fonction d'autorécepteur préférentiel du récepteur D2S soit simplement la conséquence de son expression prédominante dans les neurones DA. L'expression de chacune des isoformes de façon indépendante dans les neurones s'avère donc essentielle pour déterminer les mécanismes expliquant le rôle préférentiel d'autorécepteur du D2S.

D'autre part, l'efficacité des autorécepteurs D2 à réguler l'activité des neurones dopaminergiques peut être influencé par d'autres systèmes de neurotransmission. En effet, les neurones dopaminergiques possèdent sur les corps cellulaires et dendrites plusieurs récepteurs appartenant à la famille des récepteurs à 7 passages transmembranaires dont des récepteurs neurotensinergiques (Palacios & Kuhar, 1981; Quirion et al, 1985). Étant donné le nombre croissant de données relatant des phénomènes d'hétérodésensibilisation entre RCPG et l'existence d'une interaction *in vivo* entre le récepteur D2 de la dopamine et le récepteur NTS1 de la neurotensine, il est serait intéressant d'investiguer les mécanismes post-traductionnels impliqués dans cette régulation.

CHAPITRE 3. Interactions entre les systèmes dopaminergiques et neurotensinergiques

De nombreuses évidences suggèrent une étroite association entre les systèmes dopaminergique et neurotensinergique dans le SNC. En effet, une adondance de fibres neurotensinergiques a été démontré dans les noyaux riches en neurones dopaminergiques tel que la substance noire et l'ATV dans le cerveau de rat. De plus, il a été démontré que la neurotensine, en agissant sur son récepteur de haute affinité, réduit les effets physiologiques et comportementaux associés au récepteur dopaminergique D2 dont sa capacité à agir comme autorécepteur. Toutefois, les mécanismes impliqués dans cette régulation sont encore inconnus.

Afin de mieux comprendre les interactions possibles entre les récepteurs D2 et NTS1, je présenterai d'abord la neurotensine, le système neurotensine ainsi que les récepteurs et les voies de signalisation activées par ce peptide. Ensuite, les évidences à l'égard des interactions entre les systèmes dopaminergiques et neurotensinergiques seront présentées. Il est à noter que les thèmes abordés dans ce chapitre ont déjà fait l'objet d'un article de synthèse (annexe 1). Dans un but de concision, seulement les points importants seront repris ici. Toutefois, nous référons le lecteur à l'annexe 1 pour de plus amples informations.

3.1 La neurotensine

La neurotensine (NT) est un peptide de 13 acides aminés qui a été isolé en 1973 (Carraway & Leeman, 1973) pour ses propriétés hypotensives. La neurotensine est à la fois présente dans le système nerveux central (SNC) et en périphérie dans le système gastro-intestinal (Uhl et al, 1977; Reinecke, 1985) où comme les autres neuropeptides, elle agit comme neuromodulateur.

La neurotensine est un neuropeptide qui est synthétisé sous la forme d'un précurseur inactif, lequel contient aussi la neuromedin N (NN), un peptide de six acides aminés

apparenté à la NT (Dobner et al, 1987; Kislauskis et al, 1988) (voir Fig. 3.1). Le précurseur de la NT/NN contient quatre paires de résidus basiques (Lys-Arg). La protéolyse à ces sites par les endoprotéases de la famille des prohormones convertases (Steiner et al, 1992), génère la NT active. Au cerveau, la principale prohormone convertase impliquée dans ce processus est la PC2 puisqu'elle se retrouve dans toutes les régions où la NT est présente (Villeneuve et al, 2000a; 2002). Bien que l'expression des prohormones convertases PC1 et PC5A soit plus restreinte, ces enzymes endoprotéolytiques ont aussi la capacité de cliver le précurseur NT/NN (Rovere et al, 1996; Villeneuve et al, 2000a; 2000b) et peuvent contribuer aux différences régionales observées dans les proportions de la NT et de la NN à travers les structures du cerveau (Kitabgi et al, 1991).

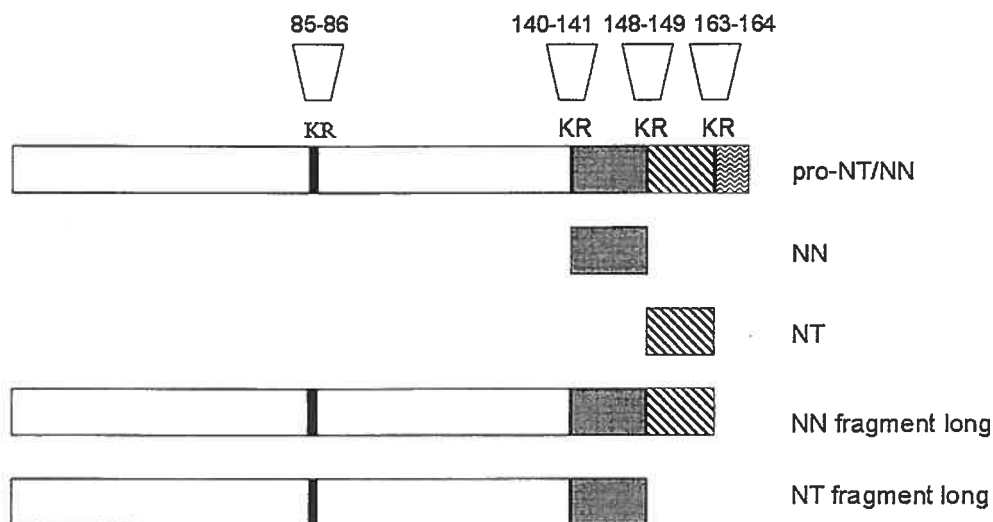


Fig 3.1. Représentation schématique du précurseur de la NT (pro-NT/NN) du rat et des peptides apparentés détectés dans les tissus exprimant de précurseur. Le précurseur pro-NT/NN est constitué de 169 acides aminés, dont quatre paires de résidus basiques Arg-Lys (KR). Une combinaison de différents peptides est générée par le clivage complet ou incomplet de ces sites dibasiques et leur expression est variable dans les tissus qui expriment le précurseur pro-NT-NN. Dans le cerveau, les formes NT et NN prédominent tandis que la NT et la forme longue de la NN sont celles qui prédominent dans l'intestin.

Modifiée de Barbero et al, 1998 (JBC, 273 (39) : 25339-46).

Une fois sous sa forme active, la NT est empaquetée dans les vésicules à cœur dense (Iversen et al, 1978; Zupanc, 1996) et sécrétée par un processus dépendant du calcium (Iversen et al, 1978; Maeda & Frohman, 1981; Kitabgi et al, 1990). L'action de la NT est terminée principalement par la protéolyse de sa portion C-terminale qui contient l'hexapeptide responsable de son activité biologique (Vincent et al, 1994). Plusieurs endopeptidases de la famille des métalloprotéases peuvent contribuer à l'inactivation physiologique de la NT dont l'endopeptidase neutre 24.11 (EC3.4.24.11) (Almenoff et al, 1981), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Skidgel et al, 1984), l'endopeptidase 24.15 (EC3.4.24.15) (Orlowski et al, 1983) et l'endopeptidase 24.16 (EC3.4.24.16) (Checler et al, 1986). Toutefois l'expression ubiquitaire de l'endopeptidase 24.16 en fait l'endopeptidase prépondérante dans l'inactivation de la NT (Checler et al, 1988; 1989; Dauch et al, 1992).

3.2 Le système neurotensinergique

Les neurones qui synthétisent la NT ainsi que leur projections sont distribués de façon diffuse à travers tout le SNC. Dans le cerveau de rat, quelques circuits neuronaux neurotensinergiques ont été identifiés : (1) des cellules du noyau central de l'amygdale au noyau du lit de la strie terminale (Uhl & Snyder, 1979), à la substance noire latérale (Vankova et al, 1992) et au noyau ventromédian de l'hypothalamus (Kiyama et al, 1986); (2) de l'hippocampe projetant à travers le cortex cingulaire vers le cortex frontal (Roberts et al, 1981); (3) des cellules des noyaux arqué et paraventriculaire de l'hypothalamus au lobe intermédiaire de l'hypophyse (Goedert et al, 1985); (4) des cellules de l'aire tegmentaire ventrale au noyau accumbens, à la bande diagonale de Broca, au cortex préfrontal et à l'amygdale (Kalivas & Miller, 1984; Seroogy et al, 1987); (5) des cellules se trouvant dans le noyau endopiriforme et le cortex prépiriforme vers le noyau olfactif antérieur, le noyau de la bande diagonale de Broca, et le noyau dorsomédian du thalamus (Inagaki et al, 1983a;

1983b); (6) des cellules de l'aire périaqueductale grise et du noyau du faisceau solitaire vers le noyau du raphé (Beitz, 1982); (7) des cellules des régions préoptique et latérale de l'hypothalamus vers l'aire tegmentaire ventrale (Zahm et al, 2001); (8) du subiculum aux corps mammillaires (Kiyama et al, 1986; Jarvie et al, 1988); du noyau du lit de la strie terminale au noyau parabrachial (Moga et al, 1989) (Fig. 1 de l'annexe 1). En plus des circuits neurotensinergiques provenant ou innervant l'aire tegmentaire ventrale, une grande concentration de NT est retrouvée dans certaines régions associées à des projections du système dopaminergiques telles que le noyau caudé, le globus pallidus et le putamen (Uhl et al, 1977; Jennes et al, 1982; voir Binder et al, 2001 pour une synthèse). Dans la moëlle épinière, des neurones synthétisant la NT ont été retrouvés dans la substantia gelatinosa (Jennes et al, 1982).

3.3 Pharmacologie des récepteurs à la neurotensine

Les actions centrales et périphériques de la NT sont produites par suite de la liaison du peptide à des récepteurs spécifiques exprimés par les cellules cibles. À ce jour, trois récepteurs à la NT ont été clonés : NTS1, NTS2 et NTS3/sortilin (Hermans & Maloteaux, 1998; Vincent et al, 1999; Mazella, 2001) (Tableau 2). Les récepteurs NTS1 et NTS2 appartiennent à la famille des récepteurs à 7 passages transmembranaires (Tanaka et al, 1990; Vita et al, 1993; Chalon et al, 1996; Mazella et al, 1996) et se distinguent pharmacologiquement quant à leur affinité pour la NT et leur sensibilité à la lévocabastine, un antagoniste de l'histamine (Schotte et al, 1986).

Le récepteur NT de type 1 est souvent considéré comme étant le récepteur de haute-affinité et est peu sensible à la lévocabastine (Schotte et al, 1986). Chez le rat, l'ARNm du récepteur NTS1 a été détecté principalement dans les neurones du septum, de la substance noire, de l'aire tegmentaire ventrale, de la zona incerta, du noyau suprachiasmatique, ainsi

que dans les cortex préfrontal, entorhinal et rétrosplénial (Elde et al, 1990; Nicot et al, 1994). D'autre part, la présence du récepteur NTS1 a été observée par immunohistochimie dans les terminaisons nerveuses au niveau du noyau caudé, du putamen, du lit du noyau de la strie terminale, du tubercule olfactif, de même que du septum latéral, de l'amygdale, du noyau latéral de l'habénula et du noyau accumbens (Boudin et al, 1996; Fassio et al, 2000).

Le récepteur NTS1 de la neurotensine est couplé par une protéine G_q à la voie de la phospholipase C (Hernandez-Lopez et al, 2000) et de l' IP_3 (Hermans & Maloteaux, 1998; Vincent et al, 1999). Les autres voies de signalisation possiblement activées par ce récepteur incluent la production de GMPc, d'AMPc, d'acide arachidonique (Canonica et al, 1985; Gailly, 1998), l'activation de la voie des MAP kinases (Poinot-Chazel et al, 1996; Ehlers et al, 2000; Martin et al, 2002) et l'inhibition de l'activité d'Akt (Liu et al, 2004). Suite à une exposition prolongée à la neurotensine, le récepteur NTS1 est internalisé. L'internalisation du récepteur NTS1 a été bien décrite à la fois dans le SNC et dans des lignées cellulaires exprimant le NTS1 (revu dans Beaudet et al, 1994; voir aussi Hermans et al, 1997; Vandembulcke et al, 2000; Nguyen et al, 2002). Les effets associés au récepteur NTS1 sont bloqués par le SR48692, un antagoniste non-peptidique sélectif (Gully et al, 1993), et par le SR142948A, un antagoniste non sélectif qui se lie à la fois au NTS1 et au NTS2 (Gully et al, 1997). La génération de souris dont le gène du récepteur NTS1 a été inactivé (Remaury et al, 2002; Leonetti et al, 2004) a permis d'attribuer au récepteur NTS1 les effets de la NT sur la régulation de la température corporelle, la coordination motrice et la motilité gastro-intestinale. Il a aussi été suggéré que le récepteur NTS1 puisse contribuer à l'effet analgésique de la NT (Pettibone et al, 2002; Sarret et al, 2005), mais ce rôle demeure controversé (Remaury et al, 2002).

Le récepteur NTS2 est un récepteur de moins grande affinité pour la NT que le récepteur NTS1. De plus, la lévocabastine peut déplacer la liaison de la NT à ce récepteur (Schotte et al, 1986). À la différence du récepteur de haute-affinité à la NT, l'expression du récepteur NTS2 est largement distribuée dans tout le cerveau. Chez le rat, les régions

montrant une forte densité des niveaux d'ARNm et de la protéine sont des régions reconnues pour recevoir une innervation neurotensinergique dense telles que le lit du noyau de la strie terminale, le bulbe olfactif, la substance noire, l'aire tegmentaire ventrale et la substance grise périacqueducatale (Walker et al, 1998; Lepee-Lorgeoux et al, 1999; Sarret et al, 2003b). Cependant, certaines régions où le récepteur NTS2 est fortement exprimé ne reçoivent pas d'innervation neurotensinergique, comme le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet (Sarret et al, 2003b). Ceci suggère que d'autres ligands endogènes puissent activer ce récepteur (Sarret et al, 1998). Au niveau cellulaire, l'expression du récepteur NTS2 a été initialement observée à la fois dans les neurones (Walker et al, 1998) et les astrocytes (Nouel et al, 1997; Walker et al, 1998; Nouel et al, 1999). Toutefois, des expériences de marquage immunocytochimique réalisées récemment sur des tranches de cerveau ont révélé la présence du NTS2 uniquement dans les neurones (Sarret et al, 2003b). La divergence des observations pourrait être attribuable au fait que dans le second cas c'est la protéine qui a été détectée tandis que les premières observations rapportent soit la localisation de l'ARNm ou des sites de liaison.

Les propriétés pharmacologiques et les voies de signalisation associées au récepteur NTS2 demeurent encore controversées. En particulier, on ignore toujours si la NT agit comme un agoniste, un agoniste inverse ou encore un antagoniste de ce récepteur. Selon l'espèce à partir de laquelle le récepteur a initialement été isolé (Mazella et al, 1996) ou le système cellulaire utilisé pour évaluer la signalisation du récepteur (oocytes, cellules CHO, cellules COS-7 et cellules HEK293), différents résultats ont été rapportés. La seule observation commune à toutes les études est l'action agoniste du SR48692 (Botto et al, 1997; Yamada et al, 1998; Vita et al, 1998; Richard et al, 2001; Sarret et al, 2002), à l'origine décrit comme étant un antagoniste non-peptidique avec une plus grande affinité pour le récepteur NTS1 comparativement au récepteur NTS2 (Gully et al, 1993). Par ailleurs, il semble que la NT et la lévocabastine peuvent agir comme agoniste (Sarret et al, 1998) ou comme antagoniste (Vita et al, 1998; Richard et al, 2001) selon l'espèce. En effet, dans les lignées cellulaires exprimant le récepteur NTS2 humain, le SR48692 stimule la

mobilisation calcique et la production d'IP₃ tandis que la NT et la levocabastine préviennent ces réponses. Il est possible que le profil d'action de la NT sur le récepteur NTS2 soit directement lié à l'activité du récepteur. Il semble que le récepteur NTS2 humain montre une activité constitutive (Richard et al, 2001; Holst et al, 2004) alors qu'aucune évidence d'activité constitutive n'a été rapporté pour le récepteur NTS2 de rongeurs. À ce jour, la donnée la plus convaincante supportant un rôle d'agoniste de la NT sur le récepteur NTS2 humain et de rat est la capacité de la NT de provoquer l'internalisation du récepteur (Botto et al, 1998; Sarret et al, 2002; Gendron et al, 2004). L'internalisation du récepteur NTS2 est associée à l'activation de ERK1/2, mais non à la mobilisation calcique (Gendron et al, 2004).

Le troisième type de récepteur à la NT (NTS3), initialement identifié comme la protéine intracellulaire sortilin, est unique parmi les récepteurs aux neuropeptides, parce qu'il ne comporte qu'un seul domaine transmembranaire (Mazella et al, 1998). Le récepteur NTS3/sortilin, tout comme le récepteur NTS1, lie la NT avec une forte affinité. Le récepteur NTS3 est exprimé par les neurones, les cellules gliales ainsi que les adipocytes (Chabry et al, 1993; Morris et al, 1998; Nouel et al, 1999). Chez le rat, les régions du cerveau où l'expression de l'ARNm et de la protéine du récepteur NTS3/sortilin est la plus importante incluent le cortex piriforme, l'hippocampe, les îlots de Calleja, les noyaux médian et latéral du septum, les noyaux thalamiques, le noyau supraoptique, la substance noire et les cellules de Purkinje du cortex cérébelleux (Sarret et al, 2003a). En plus de lier la NT, le récepteur NTS3/sortilin peut interagir avec une variété de ligands tel que la protéine RAP (receptor-associated protein) (Petersen et al, 1997; Tauris et al, 1998) et la lipoprotéine lipase (LpL) (Nielsen et al, 1999). Il est donc possible que le récepteur NTS3/sortilin participe à des fonctions qui n'impliquent pas le système neurotensinergique. Les rôles physiologiques associés au récepteur NTS3/sortilin sont encore relativement peu connus. La preuve la plus convaincante du fait que le récepteur NTS3/sortilin puisse agir comme un véritable récepteur est la démonstration de son implication dans la migration des cellules microgliales humaines induite par la NT (Martin et al, 2003). Le récepteur

NTS3/sortilin peut également être impliqué dans la croissance de certaines lignées de cellules cancéreuses (Dal Farra et al, 2001) de même que dans la modulation de la signalisation de la NT en agissant comme récepteur de clairance (Chabry et al, 1993; Navarro et al, 2001; Morinville et al, 2004).

Récemment, un quatrième récepteur a été proposé, dont la pertinence physiologique demeure cependant à déterminer. Ce récepteur, le SorLA/LR11, est un récepteur à un seul passage transmembranaire apparenté au récepteur NTS3/sortilin (Jacobsen et al, 2001). Dans le système nerveux central, il est exprimé dans les neurones, mais sa contribution aux effets de la NT reste à identifier. Il a été suggéré que ce récepteur, en se liant au précurseur de l'amyloïde, régule le transport de cette protéine vers les divers compartiments intracellulaires ainsi que sa protéolyse (Andersen et al, 2005).

Tableau 2- Propriétés pharmacologiques des récepteurs à la NT

<i>Sous-type de récepteur</i>	<i>NTS1</i>	<i>NTS2</i>	<i>NTS3/sortilin</i>
<i>Classification du récepteur</i>	RCPG	RCPG	Récepteur à un seul passage transmembranaire
<i>Affinité pour la NT</i>	Kd = 1.0-0.3 nM	Kd = 3-10 nM	Kd = 1.0-0.3 nM
<i>Agonistes</i>	NT(8-13) NT NN Xenopsin	NT NN Xenospin SR48692 Levocabastine	NT Sortilin RAP
<i>Antagonistes</i>	SR48692 SR142948A	NT SR142948A Lévocabastine	Propeptide de la sortilin

Modifié de (Binder et al, 2001)

3.4 Interactions entre les systèmes neurotensinergique et dopaminergique

Diverses données anatomiques suggèrent l'existence d'interactions fonctionnelles entre les systèmes neurotensinergique et dopaminergique du cerveau. Dans le mésencéphale, la modulation exercée par la NT sur le système dopaminergique est en relation étroite avec l'innervation neurotensinergique des noyaux dopaminergiques. En effet, les neurones DA du mésencéphale contenus dans l'ATV et la SN sont largement innervés par les axones de neurones produisant la NT (Jennes et al, 1982; Zahm et al, 2001). De plus, les études de liaison ont montré que les récepteurs à la NT se retrouvent spécifiquement à la surface des neurones DA de ces régions (Palacios & Kuhar, 1981; Quirion et al, 1982; 1985) et que ces récepteurs correspondent aux récepteurs de haute-affinité NTS1 (Nicot et al, 1995; Boudin et al, 1998). En plus de ces données anatomiques, la similarité des effets de la NT et des antagonistes des récepteurs D2 dans le cerveau est une autre preuve d'une interaction possible entre la NT et les neurones DA du mésencéphale.

Les effets de la NT sur les neurones DA du VTA et de la SN sont ceux qui ont été les plus étudiés. L'activation des récepteurs NTS1 produit une opposition à l'auto-inhibition de la DA et une dépolarisation des neurones DA (Mercuri et al, 1993; Wu & Wang, 1995; Wu et al, 1995; Farkas et al, 1996; Cathala & Paupardin-Tritsch, 1997; Nalivaiko et al, 1998). La NT augmente donc l'excitabilité générale des neurones DA, ce qui se traduit par une augmentation de la libération de DA dans les régions de projection. Il a été démontré en effet que la NT stimule la libération de DA dans des tranches de striatum, de noyau accumbens et aussi de rétine (de Quidt & Emson, 1983). Selon le modèle expérimental et le site d'injection de la NT, l'effet net sur la transmission DA pourra se traduire soit par une augmentation soit par une diminution de la relâche de DA. Par exemple, la détection électrochimique *in vivo* à l'aide d'une électrode de fibre de carbone a permis d'observer une hausse des niveaux de DA présents dans le noyau accumbens suite à une injection d'une faible dose de NT dans l'ATV (Steinberg et al, 1995; Sotty et al, 1998) ou par voie cérébroventriculaire (Blaha & Phillips, 1992). Par contre, en microdialyse, la

perfusion de NT dans le noyau accumbens a plutôt conduit à une diminution locale de la relâche de DA par un mécanisme impliquant l'activation du récepteur GABA_A (Tanganelli et al, 1994). Par ailleurs, la microdialyse intraventriculaire d'un antisérum contre la NT résulte en un effet inverse sur la libération de DA dans le noyau accumbens (Wagstaff et al, 1994). Dans les régions de projection dopaminergique, la NT s'oppose aux effets de la DA par des mécanismes à la fois pré et post-synaptiques. Dans une région donnée, l'effet net sur les taux de dopamine dépendra donc de la localisation des récepteurs de la NT (Binder et al, 2001). Une des causes de divergence entre les différentes études quant aux effets de la NT sur la libération de DA est la concentration de NT utilisée; à forte concentration un effet de diffusion est possible.

Un certain nombre de données indirectes suggèrent que la NT puisse également réguler les neurones DA en modulant la fonction des autorécepteurs D2 (Binder et al, 2001). Il a été démontré *in vivo* et *in vitro* que la NT diminue l'affinité du récepteur D2 pour la DA et les agonistes dopaminergiques (von Euler et al, 1989; Fuxe et al, 1992; Tanganelli et al, 1993; Li et al, 1995). Cette modulation de l'affinité se reflète par une augmentation de la constante de dissociation (K_d) sans changement du nombre total des sites de liaison au récepteur D2 (B_{max}) (Agnati et al, 1983; von Euler et al, 1990a;1990b;1991). L'interaction entre la NT et le récepteur D2 a également été évaluée en mesurant la libération de DA dans le striatum. La perfusion de NT dans cette région diminue la capacité des agonistes DA de moduler les niveaux basaux de DA, une observation compatible avec l'existence d'une interaction fonctionnelle entre la NT et les récepteurs D2. Cependant, les connaissances actuelles ne permettent pas de préciser si cette interaction implique directement les terminaisons axonales ou non (Diaz-Cabiale et al, 2002). La modulation de la fonction du récepteur D2 par la NT a aussi été étudiée en électrophysiologie. Les enregistrements de l'activité électrique des neurones DA suggèrent que la NT et le récepteur D2 peuvent réguler de façon opposée la même conductance potassique (Farkas et al, 1997). Selon ce modèle, la NT préviendrait simplement l'activation des canaux potassiques par les récepteurs D2 en les bloquant. Cependant, les

enregistrements extracellulaires de l'activité des neurones DA du mésencéphale ont montré que la NT est en mesure de réduire l'auto-inhibition induite par les agonistes D2, même à des concentrations auxquelles elle ne provoque pas d'augmentation de la fréquence de décharge (Shi & Bunney, 1990; 1992a; Nalivaiko et al, 1998; Werkman et al, 2000). Cette observation ne supporte pas l'hypothèse de la régulation d'un canal potassique comme effecteur commun aux deux récepteurs.

3.5 Conclusion

La neuromodulation exercée par la NT sur le système dopaminergique semble en partie impliquer une régulation de la fonction de l'autorécepteur D2. Puisque les neurones DA du mésencéphale expriment principalement le récepteur NTS1 (Nicot et al, 1995; Boudin et al, 1998) et qu'il existe une forte co-localisation entre l'expression de ce récepteur et de l'autorécepteur D2 dans ces neurones (Delle Donne et al, 2004), il a été suggéré que l'activation du NTS1 puisse directement altérer la fonction du récepteur D2. Bien que plusieurs hypothèses aient été proposées, les mécanismes moléculaires responsables de l'interaction entre les récepteurs D2 et NTS1 dans les neurones DA restent à identifier.

La régulation hétérologue de la signalisation d'un RCPG par un autre récepteur de cette même famille est un phénomène maintenant bien accepté. Ces mécanismes de régulation sont davantage des mécanismes post-traductionnels qui peuvent impliquer le récepteur lui-même ou encore son couplage à la protéine G. Le «cross-talk» entre récepteurs peut aussi être conséquent à un effet opposé sur un même effecteur. Les différents mécanismes de régulation de la fonction des récepteurs à 7 passages transmembranaires sont présentés au chapitre suivant.

CHAPITRE 4. Mécanismes de régulation des récepteurs à 7 passages transmembranaires

Les récepteurs à 7 passages transmembranaires sont d'abord des protéines et donc soumis à plusieurs mécanismes de régulation, qui interviennent au cours de leur biosynthèse, mais aussi une fois exprimés à leur site d'action membranaire. Ces mécanismes de régulation se divisent en trois grandes catégories : les mécanismes de régulation transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels. Les mécanismes de régulation appartenant aux deux premières catégories exercent un important contrôle de la densité d'expression des récepteurs en régulant d'une part l'expression génique et d'autre part, les niveaux d'ARNm. Les mécanismes de régulation post-traductionnels entrent en jeu une fois la protéine synthétisée. Ils peuvent intervenir lors du transport de la protéine vers son compartiment cellulaire ou une fois que la protéine a intégré la membrane. Les mécanismes de régulation post-traductionnels qui se produisent lors du transport du RCPG vers la membrane interviennent davantage dans la régulation de leur conformation tridimensionnelle et leur adressage. Les mécanismes qui impliquent les RCPG à la membrane participent à la régulation de leur efficacité à signaler, entre autres lors une activation prolongée avec l'agoniste. Dans les prochaines sections, ces mécanismes de régulation seront décrits et leur impact sur l'expression et la fonction des RCPG expliqué.

4.1 Mécanismes de régulation transcriptionnels

Le premier mécanisme de contrôle déterminant le niveau d'expression d'une protéine est la régulation de l'expression génique. Le contrôle de l'expression génique s'exerce principalement sur la transcription. L'initiation de la transcription d'un gène est régulée par les éléments de réponse contenus dans le promoteur du gène. La liaison des facteurs de transcription à leurs éléments de réponse résulte en une activation ou une répression de la transcription selon l'élément de réponse. La régulation spatiale et

temporelle de la transcription est un mécanisme important au maintien de l'homéostasie et peut même être au cœur de l'interaction entre les récepteurs.

4.1.1 Activation de la transcription

Pour les hormones stéroïdiennes, les rétinoïdes, les hormones thyroïdiennes et les autres agents qui agissent en se liant aux récepteurs nucléaires, la régulation de la transcription demeure le principal mécanisme d'action leur permettant d'exercer leurs effets physiologiques. Les réponses produites par les récepteurs aux catécholamines, dont les récepteurs dopaminergiques D2, sont sensibles aux hormones qui agissent sur les récepteurs nucléaires.

Bien que l'effet des hormones sur l'expression des RCPG ait été étudié surtout pour les récepteurs β -adrénergiques, cette régulation peut s'appliquer à tous les RCPG, qui possèdent, dans leur promoteur, des éléments de réponses à ces hormones (Morris & Malbon, 1999). Le récepteur D2 de la dopamine compte parmi les RCPG possédant un élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) dans son promoteur (Valdenaire et al, 1994). Il a été démontré que la présence de ce morphogène stimule l'expression du récepteur D2 (Samad et al, 1997; Valdenaire et al, 1998).

En plus des différentes hormones mentionnées précédemment, l'activation de seconds messagers peut aussi participer à la régulation de la transcription génique des RCPG. Cette régulation peut d'ailleurs être associée à un mécanisme de rétroaction positive ou encore être la conséquence d'un «cross-talk» entre les voies de signalisation de deux récepteurs. Un bon exemple de rétroaction positive est la régulation du gène encodant le récepteur β 2-adrénergique par le produit généré par son effecteur l'adénylyl cyclase, c'est-à-dire l'AMPc. En effet, le promoteur de gène du récepteur β 2-adrénergique possède un élément de réponse à l'AMPc (CRE) (Morris & Malbon, 1999). Tout comme le récepteur

β 2-adrénérique, le récepteur D2 de la dopamine possède un élément de réponse à l'AMPc dans son promoteur (Montmayeur & Borrelli, 1991). Puisque le récepteur D1 de la dopamine est couplé de façon positive à l'adénylyl cyclase et qu'il peut être co-exprimé avec le récepteur D2 (Lester et al, 1993; Aizman et al, 2000), l'activation du récepteur D1 peut favoriser la transcription du récepteur D2, ce qui aura un effet négatif sur la production d'AMPc.

4.1.2 Répression de la transcription

La régulation génique est souvent associée à l'activation de la transcription étant donné les nombreux exemples d'activation transcriptionnelle de plusieurs RCPG en réponse aux hormones thyroïdiennes, sexuelles ou les glucocorticoïdes. Bien que moins répandue et beaucoup moins connue que l'activation, la répression de la transcription a été observée pour quelques RCPG, dont les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ de la sérotonine, les récepteurs muscariniques M₂ et M₃ et le récepteur α _{2A}-adrénérique (Morris & Malbon, 1999). Toutefois, aucun exemple d'une telle régulation n'a été rapporté en ce qui concerne le récepteur dopaminergique D2.

4.2 Mécanismes de régulation post-transcriptionnels

La régulation de l'expression génique n'est pas le seul mécanisme contrôlant l'expression d'une protéine. Plusieurs mécanismes post-transcriptionnels régulent les niveaux d'ARNm. La présence de certaines séquences consensus ou la polyadénylation de l'ARNm influenceront à la fois sa demi-vie et sa stabilité. Par ailleurs, la liaison de protéines liant spécifiquement les acides ribonucléiques joue un rôle dans plusieurs étapes de la maturation de l'ARNm incluant la translocation et l'épissage. L'épissage alternatif est

un autre mécanisme post-traductionnel qui est toutefois davantage associé à la diversification des protéines qu'au contrôle des niveaux d'expression des ARNm.

4.2.1 Déstabilisation de l'ARNm

Une propriété commune à plusieurs RCPG est le phénomène de régulation à la baisse par suite d'une exposition prolongée à un agoniste. Bien que la dégradation protéolytique des récepteurs soit l'un des mécanismes prépondérant expliquant ce phénomène, plusieurs données suggèrent que ce mécanisme n'est pas le seul en cause. En effet, il a été démontré qu'une exposition chronique à l'agoniste peut diminuer significativement les niveaux d'ARNm de plusieurs RCPG dont le récepteur muscarinique M1 (Lee et al, 1994), les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques (Mitchusson et al, 1998; Morris & Malbon, 1999) et le récepteur AT₁ de l'angiotensine (Nickenig et al, 2002). La réduction des niveaux basaux d'ARNm peut impliquer la répression de la transcription du gène, comme il a été décrit précédemment, mais il peut aussi être tributaire de la dégradation sélective des ARNm. Les changements régulés de la stabilité des ARNm sont dépendants de la présence de séquences consensus (élément riche en nucléotide A+U) principalement dans la région 3' non traduite (Cleveland & Yen, 1989; Atwater et al, 1990). Les séquences consensus interagissent avec des protéines qui ont la capacité de se lier de façon spécifique à l'ARNm pour déstabiliser la molécule d'ARNm, probablement en modifiant l'accessibilité du transcrit aux nucléases (Cleveland & Yen, 1989; Atwater et al, 1990), ce qui entraîne une modification de la vitesse de dégradation de l'ARNm. Bien que ce phénomène ait été caractérisé pour le récepteur β_2 -adrénergique (Morris & Malbon, 1999), il n'est pas encore clair qu'il représente un mécanisme général s'appliquant à une majorité des RCPG. À ce jour, aucune étude n'a évalué la régulation du récepteur D2 sous cet angle.

4.2.2 Épissage alternatif

Un gène est transcrit en ARN pré-messager, lequel subit ensuite une maturation pour devenir l'ARN messager (ARNm). C'est au cours de la maturation qu'a lieu l'épissage alternatif. L'épissage consiste en l'excision des introns (séquences non codantes) de l'ARN pré-messager, au terme duquel seuls les exons (parties codantes) sont réunis dans l'ARN messager mature. Il y a épissage alternatif lorsque, pour un même gène, l'élimination des introns est différente. L'épissage alternatif permet donc de créer plusieurs types de molécules d'ARN messagers différents à partir d'un même gène engendrant ainsi une diversité de protéines possédant des structures et des fonctions distinctes.

L'épissage alternatif a été observé pour la première fois pour le récepteur D2 de la dopamine (Monsma et al, 1989) et depuis, l'existence de variants d'épissage a été rapportée pour plusieurs RCPG (Minneman, 2001). Lorsque cette modification post-transcriptionnelle des RCPG se produit au niveau de la troisième boucle intracellulaire ou de la queue C-terminale, elle peut produire des variants d'épissage montrant des différences quant à la spécificité de liaison des ligands (Minneman, 2001; Wellendorph et al, 2002; Elton & Martin, 2003); à leur mode de transduction du signal (Pierce & Regan, 1998; Pindon et al, 2002); à leur activité constitutive (Minneman, 2001); à leur efficacité de couplage avec la protéine G (Minneman, 2001; Pindon et al, 2002); à leur localisation (Minneman, 2001); à leurs interactions protéine-protéine impliquant les domaines intracellulaires (Minneman, 2001); à leur internalisation (Parent et al, 2001) et à leur désensibilisation (Pierce & Regan, 1998; Minneman, 2001). Par contre, lorsque l'épissage alternatif implique les régions 5' ou 3' non traduites, cela peut provoquer des différences dans l'efficacité de traduction (Nomura et al, 2001; Jiang & Lucy, 2001; Elton & Martin, 2003) ou dans la stabilité de l'ARNm des récepteurs (Hellwinkel et al, 2001).

Pour le récepteur dopaminergique D2, l'épissage différentiel de l'exon 6 génère deux isoformes qui diffèrent par la présence d'une séquence de 29 acides aminés dans la

troisième boucle intracellulaire. L'abondance relative de l'ARNm encodant chacune des isoformes a été évaluée à l'aide de diverses méthodes (PCR, Northern Blot, hybridation *in situ*). Malgré certaines variations, il semble que l'isoforme longue du récepteur D2 soit généralement plus abondante dans le cerveau que la forme courte du récepteur (Giros et al, 1989; Artymyshyn et al, 1992) à l'exception des noyaux dopaminergiques où la situation inverse a été observée (Montmayeur et al, 1991). Par ailleurs, l'abondance prépondérante de l'ARNm du D2S dans les noyaux dopaminergiques coïncide avec son expression protéique (Khan et al, 1998). Il semble donc qu'il y ait une régulation de l'épissage alternatif dans les neurones dopaminergiques, favorisant l'expression du récepteur D2S. Toutefois, les mécanismes à l'origine de cette régulation demeurent inconnus.

4.2.3 Édition des ARN

L'édition des ARN désigne un ensemble de modifications qui génèrent des ARN possédant une séquence de nucléotides différente de celle encodée par le gène. L'édition des ARNm peut prendre deux formes soit l'insertion ou la délétion, ce qui modifie le nombre de nucléotides, soit la conversion ou la substitution de nucléotides (ex. C → U), ce qui change l'identité du nucléotide (revu dans Benne, 1996). Ces phénomènes sont à l'origine des variants de certains récepteurs comme le 5-HT_{2C}. En effet, l'édition du pré-ARNm de ce récepteur par la famille d'adénosine déaminase spécifique à l'ARN double brin (ADAR1, ADAR2) peut conduire à la substitution de résidus adénosine pour des résidus guanosine à quatre sites spécifiques dans la deuxième boucle intracellulaire. La conséquence fonctionnelle de l'édition de l'ARNm pour le récepteur 5-HT_{2C} est une diminution de la capacité du récepteur à activer la phospholipase C suggérant une diminution de l'efficacité de couplage entre le récepteur et la protéine G (Niswender et al, 1998). Ce type de phénomène n'a toutefois pas été décrit pour les récepteurs dopaminergiques.

4.3 Mécanismes de régulation post-traductionnels

Les RCPG comme toutes les protéines transmembranaires peuvent subir des modifications post-traductionnelles. Les modifications post-traductionnelles sont en général des modifications covalentes qui impliquent des groupements fonctionnels des chaînes latérales ou des extrémités N- et C-terminales des protéines. En ce qui concerne les RCPG, ces modifications peuvent avoir lieu lors de leur biosynthèse ou encore directement à leur site d'action membranaire. Dans le premier cas, ces modifications réguleront la conformation et l'adressage des récepteurs à la membrane. Tandis que celles qui impliquent directement le RCPG à la membrane seront davantage impliquées dans la régulation de sa fonction et de sa dégradation.

4.3.1 Phosphorylation

Les récepteurs à 7 passages transmembranaires sont des substrats à la fois pour les sérine/thréonine protéines kinases telles que la PKA, PKC et les GRK (G-protein receptor kinases) et les tyrosines kinases (Morris & Malbon, 1999). La phosphorylation des récepteurs sur des résidus sérine ou thréonine est un phénomène associé à leur désensibilisation, tandis que la phosphorylation des résidus tyrosine créerait plutôt une interface d'interaction protéine-protéine, permettant au récepteur de recruter diverses molécules adaptatrices.

La phosphorylation des RCPG peut être produite par deux types de sérine/thréonine protéines kinases : les protéines kinases activées par les seconds messagers, dont la PKA et la PKC, et les kinases spécifiques aux récepteurs couplés aux protéines G (GRKs). La phosphorylation des RCPG par ces kinases est suffisante pour produire un découplage entre le récepteur et la protéine G et provoquer la désensibilisation du récepteur. Les protéines kinases activées par les seconds messagers peuvent phosphoryler les RCPG, que ceux-ci soient couplés ou non à l'agoniste; on dit donc qu'elles provoquent une désensibilisation de

type hétérologue. La PKC est impliquée dans la désensibilisation hétérologue de nombreux RCPG, tels que le récepteur muscarinique M1 (Haga et al, 1996), le récepteur de la vasopressine (Zhang et al, 1996), le récepteur de l'angiotensine II (Oppermann et al, 1996) et le récepteur de la somatostatine sst2A (Hipkin et al, 2000). Puisqu'il a été démontré que l'activation de la PKC augmente la phosphorylation et l'internalisation du récepteur D2 (Rogue et al, 1990; Namkung & Sibley, 2004), il est probable que cette protéine kinase participe aussi à la désensibilisation hétérologue de ce récepteur.

À l'opposé, les GRKs phosphorylent uniquement les RCPG activés par l'agoniste; elles provoquent une désensibilisation homologue des récepteurs (Bjorklof et al, 2002). En ce qui concerne le récepteur dopaminergique D2, il a été démontré qu'il est régulé principalement par la GRK2 (Iwata et al, 1999; Ito et al, 1999). Par ailleurs, les GRKs peuvent recruter les arrestines. Les arrestines en se liant au récepteur phosphorylé (sur les sites consensus des GRKs) provoquent un découplage encore plus efficace entre le récepteur et la protéine G. De plus, la liaison des arrestines initie l'internalisation des récepteurs (par la voie dépendante de la clathrine) (Bjorklof et al, 2002). Ces récepteurs seront dirigés vers les lysosomes pour être dégradés ou seront recyclés à la membrane.

La phosphorylation de résidus sérine/thréonine est donc à l'origine de la désensibilisation fonctionnelle des RCPG et représente un mécanisme par lequel la signalisation du récepteur D2 peut être régulée.

4.3.2 Palmitoylation

La liaison covalente d'acides gras à la chaîne peptidique a été décrite pour la première fois en 1951. La palmitoylation est l'une de ces modifications lipidiques des protéines qui se produit de façon post-traductionnelle. La palmitoylation est un processus dynamique par lequel un résidu palmitate se lie par thioestérification aux protéines et permet ainsi leur l'ancrage à la face cytosolique de la membrane plasmique. Dans les cas des protéines transmembranaires tel que les RCPG, la palmitoylation permet la relocalisation

d'un segment intracellulaire par un attachement à la membrane (Morello &Bouvier, 1996; Qanbar &Bouvier, 2003).

La rhodopsine a été le premier RCPG pour lequel on a démontré une palmylation (O'Brien &Zatz, 1984). Depuis, la palmylation de résidus cystéine présents dans la queue carboxy-terminale est un phénomène qui a été décrit pour un bon nombre de RCPG dont les récepteurs α_{2A} et β_2 -adrénergiques, les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}, le récepteur mGLUR4 du glutamate et les récepteurs dopaminergiques D1 et D2 (Morello &Bouvier, 1996). En ce qui concerne le récepteur D2, l'incorporation de palmitate sur le dernier résidu cystéine de la queue c-terminale a été observé à la fois pour l'isoforme court (Grunewald et al, 1996) et l'isoforme longue du récepteur (Ng et al, 1994).

La palmylation est une modification covalente qui peut se produire de façon constitutive ou dynamique. Dans le cas du récepteur D2, seule la palmylation constitutive a été décrite. La palmylation constitutive a lieu lors de la biosynthèse de la protéine et constitue l'un des mécanismes qui régule l'expression de récepteurs fonctionnels à la membrane (Qanbar &Bouvier, 2003). Bien que cela n'ait pas encore été démontré pour le récepteur D2 spécifiquement, l'élimination des sites de palmylation par mutagenèse dirigée de certains RCPG, dont les récepteurs H2 de l'histamine, CCR5 des chemokines, V2 de la vasopressine, ainsi que les récepteurs δ opiacés, provoque leur rétention dans les compartiments intracellulaires (Qanbar &Bouvier, 2003). Il semble donc que la palmylation est importante pour la maturation des RCPG.

La palmylation fait aussi l'objet d'une régulation dynamique, une fois que le récepteur a intégré la membrane. En effet, il a été démontré notamment pour les récepteurs β_2 -adrénergique, α_{2A} -adrénergique, muscarinique M2 et le récepteur 5-HT_{4A} de la sérotonine que l'état de palmylation du récepteur est étroitement lié à son activation par l'agoniste. L'activation des RCPG par leur agoniste respectif augmente l'incorporation de [³H]palmitate. Toutefois, ce phénomène n'est pas été observé pour tous les RCPG étudiés.

4.3.3 Glycosylation

Dans le réticulum endoplasmique les protéines destinées à intégrer la membrane comme les RCPG, peuvent subir différentes modifications covalentes dont l'addition d'oligosaccharides sur la chaîne peptidique. L'addition d'oligosaccharides sur certains acides aminés de la chaîne peptidique est appelée glycosylation. La glycosylation des protéines peut être de deux types : la *N*-glycosylation et la *O*-glycosylation, selon que l'addition d'oligosaccharides soit sur une fonction amine d'un résidu asparagine ou sur une fonction hydroxyl d'un résidu sérine ou thréonine. (Moran et al, 1994).

Le processus d'*O*-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique pour se poursuivre dans l'appareil de Golgi. Ce type de modification a peu été étudié jusqu'à maintenant en ce qui concerne les RCPG. Aucune séquence consensus n'a été identifiée et ce n'est que tout dernièrement que l'on a noté ce type de modification dans les domaines extracellulaires de certains RCPG comme le récepteur V2 de la vasopressine et le récepteur δ opiacé (Zhang et al, 1996). Le rôle de ce type de modification dans l'expression à la membrane et dans la fonction des RCPG demeure donc à déterminer. Toutefois, nous pouvons penser que la présence d'*O*-glycosylation dans la portion extracellulaire du récepteur va influencer la conformation qu'il adoptera à la membrane.

Contrairement au processus d'*O*-glycosylation, la *N*-glycosylation a été étudiée pour un grand nombre de RCPG et un motif consensus a été déterminé (NXS/T) (Hipkin et al, 2000). L'élimination des sites de *N*-glycosylation par mutagenèse dirigée ou par des approches biochimiques a eu un impact différent selon le RCPG à l'étude. Pour certains récepteurs dont le récepteur β_2 -adrénergique du hamster, le récepteur de la thyrotropine humaine, le récepteur dopaminergique D5 humain, le récepteur EP3 de la prostaglandine E2 et le récepteur AT_{1a} humaine de l'angiotensine II, il a été démontré que la présence de *N*-glycosylations est requise pour l'expression du récepteur à la membrane plasmique (Oppermann et al, 1996). Par contre, la mutation des sites de *N*-glycosylation ne semble pas

affecter l'expression du récepteur de l'histamine H₂ canin, ni celle du récepteur de l'hormone parathyroïde et du récepteur V₂ de la vasopressine (Oppermann et al, 1996). Bien que ce type de modification ne paraisse pas déterminant pour la fonction de la plupart des RCPG, il y a certains récepteurs pour dont la *N*-glycosylation est nécessaire à une liaison efficace du ligand. Parmi ces récepteurs notons les récepteurs TP du tromboxane A₂ et EP₃ α du PGE₂ (Minneman, 2001).

Le récepteur D₂ est une protéine hautement glycosylée (Jarvie et al, 1988; Grigoriadis et al, 1988; Clagett-Dame &McKelvy, 1989). Il semble par ailleurs que la *N*-glycosylation des isoformes du récepteur D₂ diffère. Il a été démontré qu'une proportion des récepteurs D₂L n'est que partiellement glycosylée dans les cellules CHO, provoquant ainsi leur rétention dans les compartiments intracellulaires. À l'opposé, la forme courte du récepteur D₂ est rapidement glycosylée dans sa forme mature (Fishburn et al, 1995). Bien que la différence entre les deux isoformes se situe au niveau de leur troisième boucle intracellulaire, il semble que ces deux variants d'épissage peuvent adopter des conformations différentes de leurs boucles extracellulaires.

4.3.4 Ubiquitination

L'ubiquitine est une protéine ubiquitaire de 76 résidus, qui se lie de façon covalente avec les protéines via un lien isopeptide. L'ubiquitine s'est révélée récemment être un important régulateur de la stabilité des protéines. L'ubiquitination a été associée à la dégradation régulée des protéines par le protéosome. Plus récemment, il a été suggéré que l'ubiquitine pourrait jouer un rôle dans l'endocytose et l'adressage des protéines membranaires (Wojcikiewicz, 2004).

L'ubiquitination des RCPG peut avoir lieu de façon constitutive ou suite à la stimulation par l'agoniste. Plusieurs RCPG, tels que les récepteurs opiacés, les récepteurs du facteur relâchant de la thyrotropine (TRH) et certaines formes mutantes de la rhodopsine, peuvent être ubiquitinylés constitutivement, indépendamment de leur activation par

l'agoniste (Wojcikiewicz, 2004). L'ubiquitination constitutive des ces récepteurs aurait pour fonction de diriger vers la dégradation les récepteurs qui adoptent une conformation tridimensionnelle aberrante lors de leur synthèse (Wojcikiewicz, 2004). Jusqu'à maintenant, l'exemple le mieux connu demeure le récepteur δ opiacé. Il a été démontré en effet que les récepteurs δ opiacés qui adoptent une conformation tertiaire inadéquate sont acheminés du réticulum endoplasmique vers le cytosol, où ils sont déglycosylés, polyubiquitinylés et dégradés par le protéosome (Petaja-Repo et al, 2001).

L'ubiquitination agoniste-dépendante a été observée pour un nombre relativement restreint de récepteurs. Le récepteur adrénergique β_2 est l'un des récepteurs pour lequel ce phénomène a été décrit (Shenoy et al, 2001). Lefkowitz et collègues ont montré que le récepteur adrénergique β_2 , de même que la β -arrestine 2, sont rapidement polyubiquitinylés en réponse à l'agoniste. Par contre, la polyubiquitination du récepteur n'est pas requise pour son internalisation. Il semblerait plutôt qu'elle permettrait l'adressage des récepteurs internalisés vers les lysosomes où ils seront dégradés (Shenoy et al, 2001). Toutefois, le mécanisme de cet adressage demeure encore inconnu.

Pour l'instant, aucune étude ne s'est penchée directement sur la régulation de la dégradation des récepteurs D2 par l'ubiquitine. L'étude de ce phénomène pour plusieurs RCPG permettra de confirmer si l'ubiquitination est un phénomène général ou si elle s'applique uniquement à des cas particuliers.

4.3.5 Interaction protéine-protéine

Les RCPG n'interagissent pas uniquement avec les protéines G hétérotrimériques mais aussi avec les protéines accessoires GIP (Bockaert et al, 2004). Ces protéines assurent d'importantes fonctions et sont impliquées dans (1) l'adressage des RCPG vers le bon compartiment subcellulaire; (2) l'association des RCPG avec les molécules d'échafaudage permettant l'assemblage fonctionnel du complexe de signalisation; (3) la régulation de

l'adressage vers et en provenance de la membrane plasmique, et (4) la régulation fine de la signalisation des GPCR (Bockaert et al, 2004). Les GIP se divisent en trois grandes catégories : les protéines membranaires, les protéines solubles interagissant avec la queue C-terminale et celles qui interagissent avec la 3^e boucle intracellulaire du récepteur. En ce qui concerne les récepteurs dopaminergiques dont fait partie le récepteur D2, nous parlerons plus spécifiquement des protéines DRIP (dopamine receptor-interacting proteins).

Il est maintenant bien connu que les RCPG peuvent former des homodimères ou des hétéromères et que cette interaction entre deux récepteurs peut conduire à des modifications quant à leur pharmacologie, leur signalisation intracellulaire ou encore leur adressage (Bouvier, 2001). Le récepteur dopaminergique D2 est l'un de ceux pour lequel des partenaires d'hétérodimérisation ont été identifiés. Il a été démontré que ce récepteur peut interagir directement avec le récepteur SSTR5 de la somatostatine (Rocheville et al, 2000), le récepteur cannabinoïde CB1 (Kearn et al, 2005) et le récepteur A2A de l'adénosine (Fuxe et al, 1998; Hillion et al, 2002; Canals et al, 2003; Kamiya et al, 2003). Dans le dernier cas, il semble que l'interaction entre le récepteur D2 et celui de l'adénosine puisse être à l'origine de la désensibilisation hétérologue du récepteur D2 (Yang et al, 1995; Salim et al, 2000; Hillion et al, 2002).

Parmi les DRIP transmembranaires identifiées à ce jour, il y a aussi le canal potassique de type Kir3 (Lavine et al, 2002). En effet, il a été démontré à la fois *in vitro* et *in vivo* que le récepteur D2 peut former un complexe avec le canal Kir3, un effecteur direct de ce récepteur, et ce même en absence d'agoniste (Lavine et al, 2002). Toutefois, l'impact de ce préassemblage entre le récepteur D2 et son effecteur, le canal Kir3, sur sa signalisation demeure à déterminer.

La deuxième catégorie de DRIP comprend des protéines cytosoliques qui interagissent avec des domaines présents dans la queue C-terminale des récepteurs dopaminergiques. Un exemple de protéine qui interagit avec la queue C-terminale du récepteur D2 est la protéine NCS-1 (neuronal calcium sensor 1). L'interaction entre le

récepteur D2 et NCS-1 régule la capacité à signaler de ce récepteur. En effet, il a été démontré que l'association de NCS-1 à la queue C-terminale du récepteur diminue sa phosphorylation et son internalisation en présence d'agoniste (Kabbani et al, 2002).

Finalement, la dernière catégorie de DRIP inclue des protéines qui interagissent avec les récepteurs au niveau de leur 3^e boucle intracellulaire. La 3^e boucle intracellulaire tout comme la portion C-terminale d'un RCPG est une région cruciale dans l'interaction du récepteur avec la protéine G. Les interactions des GIP avec les RCPG à ce niveau auront donc des conséquences à tout le moins sur la signalisation du récepteur. Puisque le récepteur dopaminergique D2 existe sous deux isoformes se distinguant par la présence d'un segment de 29 acides aminés dans la 3^e boucle intracellulaire (Bunzow et al, 1988; Monsma et al, 1989), beaucoup d'études ont analysé les différences entre ces isoformes quant au couplage avec la protéine G. Elles ont permis entre autres, l'identification de plusieurs protéines interagissant avec la 3^e boucle intracellulaire du récepteur D2. Il a été démontré que la filamine A (ABP 280), la protéine 4.1 de la famille des protéines associées au cytosquelette, la spinophiline et la protéine de liaison à la phosphatase-1 peuvent se lier à la 3^e boucle intracellulaire du récepteur D2 pour en réguler l'adressage à la membrane (Bockaert et al, 2004). La calmoduline et la protéine Par-4, deux nouvelles DRIP (dopamine receptor interacting protein) (Bofill-Cardona et al, 2000; Park et al, 2005) semblent plutôt jouer un rôle dans l'activation de la protéine G par le récepteur.

4.4 Conclusion

Le récepteur dopaminergique D2 appartient à la grande famille des récepteurs à 7 passages transmembranaires. Ces protéines transmembranaires sont soumises à plusieurs mécanismes de régulation au cours de leur biosynthèse, mais aussi une fois parvenus dans leur site d'action membranaire. Dans le cas des RCPG, ces mécanismes de régulation influenceront directement la capacité du récepteur à signaler. Bien que des mécanismes de régulation transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels aient été décrit pour

plusieurs RCPG, l'impact de ces mécanismes de régulation sur la fonction du récepteur dopaminergique D2 n'est pas encore bien connu.

D'une part, on ignore toujours comment les variants d'épissage du récepteur D2 pourraient avoir des rôles physiologiques distincts. Le récepteur D2 est le premier RCPG pour lequel des variants d'épissage ont été identifiés. Depuis, plusieurs études ont réussi à démontrer certaines différences entre les deux isoformes, mais ce n'est que dernièrement qu'une distinction entre leur rôle physiologique a pu être établie. Il semble que l'isoforme courte du récepteur D2 soit l'autorécepteur préférentiel, tandis que l'isoforme longue serait responsable des effets post-synaptiques. Toutefois, les connaissances actuelles sur ce sujet ne permettent pas de conclure quant aux mécanismes responsables de ce rôle préférentiel d'autorécepteur associé au récepteur D2S.

D'autre part, il a été démontré que la fonction du récepteur D2 peut être régulée par des mécanismes de désensibilisation. Malgré que le récepteur D2 se désensibilise peu en réponse à un agoniste, il semble qu'il possède des sites de reconnaissance pour certaines sérine/thréonine kinases, dont GRK2 et PKC. Bien que l'interaction entre le récepteur D2 et le système neurotensinergique soit un fait établi, il reste encore à déterminer quels mécanismes de régulation post-traductionnels pourraient expliquer la réduction de la capacité du récepteur D2 à signaler.

CHAPITRE 5 Problématique

Le récepteur dopaminergique D2 représente une importante cible thérapeutique. En effet, il existe une corrélation entre l'efficacité des antipsychotiques et leur affinité pour le récepteur D2 (Creese et al, 1976; Seeman et al, 1976). Par ailleurs, des agonistes du récepteur D2 sont utilisés dans le traitement de la maladie de Parkinson et de certaines tumeurs adénohypophysaires. Puisque la régulation de la signalisation à travers le récepteur D2 est cruciale pour le traitement de ces pathologies, il s'avère important de caractériser les mécanismes impliqués dans la régulation fonctionnelle du récepteur D2 en condition physiologique.

Récemment, les études comparatives réalisées sur les souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur D2 ($D2^{-/-}$) ou seulement l'isoforme courte de ce récepteur ($D2L^{-/-}$) ont démontré que la fonction d'autorécepteur est associée principalement au récepteur D2S. Par contre, les mécanismes responsables du rôle sélectif du récepteur D2S comme autorécepteur demeurent à identifier.

Nous avons émis deux hypothèses pouvant expliquer la différence fonctionnelle entre les deux isoformes du récepteur D2 :

- 1) Les deux isoformes montrent une localisation subcellulaire différente. Seule l'isoforme courte est présente dans les axones.
- 2) La seconde possibilité est que le récepteur D2S se couple plus efficacement aux conductances qui régulent l'excitabilité neuronale et la libération de neurotransmetteur.

Afin d'identifier les mécanismes responsables du rôle préférentiel du récepteur D2S comme autorécepteur, j'ai exprimé chacun des isoformes séparément dans des neurones du mésencéphale en culture primaire à l'aide de la méthode de co-précipitation au calcium de phosphate. Les vecteurs utilisés pour l'expression des isoformes encodaient des versions des récepteurs fusionnés à la EGFP à leur extrémité N-terminale.

Dans un premier temps, la localisation subcellulaire des récepteurs EGFP-D2S et EGFP-D2L a été étudiée à l'aide de marquages immunocytochimiques. L'expression des isoformes a été détectée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la EGFP et leur localisation dans les compartiments somatodendritique et axonal a été évaluée à l'aide d'anticorps dirigés contre des marqueurs somatodendritique (MAP2) ou axonal (Ankyrin B) respectivement.

Afin de vérifier la seconde hypothèse, la capacité de chacune des isoformes à agir comme autorécepteur somatodendritique ou terminal a été évaluée. Le rôle d'un autorécepteur somatodendritique est de réguler l'excitabilité des neurones tandis que les autorécepteurs terminaux régulent directement la capacité des neurones à libérer un neurotransmetteur. La fonction d'autorécepteur somatodendritique a été évaluée à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques mesurant la fréquence de décharge des neurones transfectés. Les neurones en culture primaire exprimant soit le récepteur EGFP-D2S ou EFDP-D2L ont été identifiés par épifluorescence avant les enregistrements. La fonction d'autorécepteur terminal a été évaluée par électrophysiologie à l'aide d'enregistrements de courants autaptiques induits dans les neurones transfectés. Les courants autaptiques peuvent se mesurer quand un neurone isolé produit des contacts synaptiques sur lui-même (autapses). Dans ce modèle, la stimulation électrique du neurone induit la libération de neurotransmetteur détectable par des courants post-synaptiques autaptiques. La modulation de l'amplitude de ces courants est un indice de régulation terminale par un autorécepteur.

Dans un autre ordre d'idée, je me suis intéressée à d'autres mécanismes pouvant réguler la capacité du récepteur dopaminergique D2 à agir comme autorécepteur. Certaines données *in vivo* suggèrent que la neurotensine via l'activation de son récepteur de haute affinité (Fassio et al, 2000), réduit les effets comportementaux associés à l'activation du récepteur D2 dont sa capacité à agir comme autorécepteur. Il semble donc que le récepteur NST1 exerce une régulation de la capacité du récepteur D2 à signaler. Par contre, on ne sait toujours pas comment cette régulation fonctionnelle s'exerce.

Deux hypothèses ont été émises quant aux mécanismes responsables de cette interaction. Tout d'abord, il est possible que l'interaction entre les récepteurs D2 et NTS1 résulte de leurs effets opposés sur un même effecteur (canaux potassiques). La seconde hypothèse est que la régulation fonctionnelle du récepteur D2 par le récepteur NTS1 soit la conséquence d'un phénomène de désensibilisation hétérologue.

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons étudié les neurones dopaminergiques en culture primaire qui expriment de façon endogène les récepteurs D2 et NTS1, préparé à partir du mésencéphale de souris EGFP-TH. Ces souris expriment la EGFP sélectivement dans les neurones dopaminergiques permettant leur identification en épifluorescence avant les expériences physiologiques. La régulation de la capacité du récepteur D2 à signaler, a été évaluée en mesurant par des enregistrements électrophysiologiques, l'habileté d'un agoniste D2 à inhiber la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques.

Il est bien connu que les récepteurs D2 et NTS1 ont des effets opposés sur l'activité des neurones dopaminergiques. Dans le but de déterminer si l'effet excitateur de la neurotensine est nécessaire à l'interaction entre les récepteurs NTS1 et D2, j'ai évalué la régulation fonctionnelle du récepteur D2 par le NTS1 en bloquant l'effet excitateur associé à l'activation du NTS1. Dans un deuxième temps, à l'aide d'agents pharmacologiques sélectifs j'ai étudié l'implication de plusieurs messagers seconds dans l'interaction entre ces deux récepteurs.

DEUXIÈME PARTIE

PRÉSENTATION DES ARTICLES

Contribution des co-auteurs

En tant que premier auteur de chacun des trois articles présentés dans cette thèse, je suis la principale contributrice de l'ensemble de ces travaux. J'ai ainsi pris en charge la majorité des expériences, l'analyse des résultats de même que la rédaction des articles. Ces travaux ont été effectués sous la direction du Dr Louis-Éric Trudeau qui m'a aidé dans la conception du design expérimental en plus de participer activement à l'interprétation des résultats et à la rédaction des articles. D'autres personnes ont aussi contribué à chacun des articles.

Le premier article a été réalisé avec la collaboration du Dr Mario Tibéri qui nous a fourni les vecteurs d'expression des deux isoformes du récepteur D2. Nous le remercions également pour ses précieux commentaires lors de la révision de l'article.

Plusieurs personnes ont contribué au second article. Marie-Josée Bourque, en plus de s'occuper de la gestion de la colonie de souris, a réalisé les enregistrements électrophysiologiques des figures 7.3 et 7.5. Elle a également effectué les expériences d'imagerie calcique illustrés par la figure 7.6 et contribué à la rédaction de l'article.

Gabriel Fortin a effectué les expériences d'imagerie d'exocytose de la figure 7.7. Il a également contribué à la rédaction du second article.

Fannie St-Gelais a effectué la caractérisation électrophysiologique des neurones dopaminergiques illustrée par la figure 7.2. Elle a aussi contribué à la rédaction du second article.

Quant aux Drs Okano et Kobayashi, ils nous ont fourni les souris TH-EGFP, sans lesquelles nous n'aurions pas pu développer le modèle expérimental décrit dans le second article.

Le dernier article a été réalisé à l'aide du modèle décrit et validé dans le second article. La contribution des Dr Okano et Kobayashi à ce travail donc est essentiellement la

même que celle mentionnée pour le travail précédent, c'est-à-dire la génération des souris TH-EGFP.

Finalement, le dernier article inclut des données obtenues par Pierre-Luc Lemelin lors d'un stage d'été. Ces expériences d'imagerie calcique sont illustrées par la figure 8.6.

**CHAPITRE 6 : Expression of D2 receptor isoforms in
cultured neurons reveals equipotent autoreceptor
function**

EXPRESSION OF D2 RECEPTOR ISOFORMS IN
CULTURED NEURONS REVEALS EQUIPOTENT
AUTORECEPTOR FUNCTION

Claudia Jomphe¹, Mario Tiberi² and Louis-Eric Trudeau¹

Neuropharmacology. 2006 Apr;50(5):595-605.

¹Department of pharmacology, Center for Research in Neurological Sciences,
Faculty of Medicine, Université de Montréal

²Ottawa Health Research Institute & Departments of Medicine/Cellular and
Molecular Medicine/Psychiatry, Faculty of Medicine, University of Ottawa

SUMMARY

Alternative splicing of the dopamine D2 receptor gene produces two distinct isoforms referred to as D2_{long} (D2L) and D2_{short} (D2S). In mesencephalic dopamine neurons, inhibition of the firing rate through activation of somatodendritic D2 receptors and blockade of neurotransmitter release through stimulation of terminal D2 receptors represent major roles of D2 autoreceptors. Recently, data obtained from D2L-deficient mice suggested that D2S acts as the preferential D2 autoreceptor. In the present study, we investigate whether this D2 isoform-specific autoreceptor function is linked to differences in the subcellular localization and/or signaling properties of the D2S and D2L using mesencephalic neurons transfected with enhanced green fluorescent protein (Jomphe et al., 2005)-tagged receptors. Our results show that EGFP-tagged D2S and D2L are localized to the axonal and somatodendritic compartments of mesencephalic neurons. In addition, we demonstrate that EGFP-tagged D2S and D2L regulate cellular excitability, neurotransmitter release and basal levels of intracellular calcium with similar effectiveness. Overall, our morphological and electrophysiological studies suggest that the major D2 autoreceptor function attributed to D2S is likely explained by the predominant expression of this isoform in dopamine neurons rather than by distinct subcellular localization and signaling properties of D2S and D2L.

Key words: dopamine, D2 receptor, firing, presynaptic, alternative splicing.

INTRODUCTION

Deregulation of dopaminergic transmission has been implicated in a variety of neurological and psychiatric disorders including Parkinson's disease, schizophrenia, drug dependence and Tourette's syndrome (Missale et al., 1998). Dopamine acts through five transmembrane G-protein coupled receptors (Conner et al., 2004). The dopamine receptors can be divided in two subclasses: D1-like (D1 and D5) and D2-like (D2, D3 and D4)(Missale et al., 1998). The dopamine D2 receptor plays a key role in the regulation of dopaminergic transmission (Mercuri et al., 1997;L'hirondel et al., 1998). It acts as the primary autoreceptor leading to rapid inhibition of dopamine release (May and Wightman, R. M., 1989; Benoit-Marand et al., 2001).

Alternative gene splicing generates two distinct isoforms of the dopamine D2 receptor referred to as D2_{long} (D2L) and D2_{short} (D2S) (Bunzow, 1988; Dal Toso et al., 1989). D2L distinguishes itself from D2S only by the presence of a 29 amino acid insert within the third intracellular loop (Bunzow et al., 1988; Dal Toso et al., 1989). Because the third intracellular loop plays a central role in the coupling of GPCRs to their effectors, the existence of alternatively spliced D2 receptors imply a role for the 29 amino acid insert in the functional diversity of the two isoforms. Although D2S and D2L share the same pharmacological profile (Castro and Strange, 1993;Leysen et al., 1993) recent studies performed in heterologous cell lines have evaluated the possibility that the two isoforms display distinct G protein coupling properties. In fact, studies have reported that D2S and

D2L display differential abilities to regulate adenylyl cyclase activity and voltage-gated channels (Montmayeur et al., 1993; Liu et al., 1994; Senogles, 1994; Guiramand et al., 1995; Liu et al., 1996, 1999; Wolfe and Morris, 1999). Moreover, D2S and D2L are differently regulated by protein kinase C (PKC) (Liu et al., 1992; Liu et al., 1994; Choi et al., 1999). In light of these results, it is hypothesized that D2S and D2L may control different transduction pathways and physiological roles in neurons.

Recently, D2L knockout (D2L-KO) mice (Usiello et al., 2000) were used to investigate the functional role of the D2 receptor splice variants *in vivo* (Usiello et al., 2000; Wang et al., 2000). Inhibition of locomotor activity by low doses of D2 agonists, blockade of dopamine neuron firing by activation of somatodendritic receptors and reduction of dopamine release in response to activation of terminal D2 receptors are unchanged in D2L-KO in comparison to wild type mice. Because these agonist actions are mediated by autoreceptor activation, studies using D2L-KO mice have implicated D2S as the major dopamine autoreceptor. In support of this idea, haloperidol-induced catalepsy, which is mediated by a blockade of postsynaptic D2 receptors, is significantly reduced in D2L-KO mice suggesting an important postsynaptic role for D2L. However, it remains unclear whether the isoform-specific presynaptic and postsynaptic roles are due simply to a preferential splicing in dopamine neurons leading to higher expression of D2S (Khan et al., 1998), or whether D2S exhibits distinctive functional characteristics allowing this isoform to mediate autoreceptor function. In addition, it is important to consider separately the somatodendritic and terminal autoreceptor functions of the D2 receptor. The specific

implication of D2S and D2L in autoreceptor function in these two compartments has not been directly explored. However, both isoforms appear to contribute to the somatodendritic effects of D2 agonists on GABAergic neurons of the striatum (Centonze et al., 2004).

In this report, rat primary mesencephalic neurons transfected with enhanced green fluorescent protein-tagged D2 receptor isoforms were used to determine whether D2S and D2L are differentially targeted to somatodendritic and axonal compartments and coupled to various functional effectors. We find that D2S and D2L can be localized to somatodendritic and axonal compartments. Moreover, our studies show that they are equipotent in inhibiting neuronal firing and neurotransmitter release.

METHODS

Plasmids. pEGFP-N3 was obtained from BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA). Enhanced green fluorescent protein EGFP-tagged human D2S and D2L expression constructs were prepared in pCMV5. Briefly, the DNA sequence coding for a modified version of a cleavable signal peptide (M-K-T-I-A-L-S-Y-I-F-C-L-V-F-A) fused to EGFP was introduced at the N-terminus of the D2S and D2L isoforms using an overlap PCR-based methodology (Sedaghat, Nantel, Ginsberg, Lalonde and Tiberi, submitted).

Cell culture. Primary cultures of rat mesencephalic neurons were prepared from Sprague Dawley rats (P0-P2) as previously described (Cardozo, 1993; Sulzer et al., 1998; Bourque and Trudeau, 2000; Michel and Trudeau, 2000; Congar et al., 2002). Dissociated neurons were plated on mesencephalic astrocytes grown in monolayers on pre-coated glass coverslips. For single neurons microcultures, dissociated cells were plated onto astrocyte micro-islands. Cultures were maintained in Neurobasal-A/B27 medium (Gibco) supplemented with penicillin/streptomycin, GlutaMAX-1 (Gibco) and 10% fetal calf serum (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA). Among the cell type present in these mesencephalic cultures, dopaminergic neurons account for 25 to 30% of neurons.

Transfection. Cultured neurons grown for 2 days on coverslips were transferred from their home dish to a 12 wells plate (Corning, NY, USA) with 1 ml of Neurobasal-A/B27 medium (Gibco) supplemented with penicillin/streptomycin and GlutaMAX-1 (Gibco). Neurons were transfected using a modified Ca^{2+} -phosphate transfection protocol (Shieh et al., 1998). Four μg of DNA was used for each coverslip. In some experiments co-transfection with the pEGFP-N3 plasmid (EGFP alone) was done to lower the expression of D2 receptor isoforms. In such cases, the total amount of DNA was maintained constant while the ratio of EGFP-D2L or EGFP-D2S to EGFP alone was 1:10. This assured that the decrease in receptor level was not accompanied by a decrease in transfection efficiency. After transfection, neurons were cultured in their original medium at 37°C and 5% CO_2 for 4-8 days. To determine whether the expression of each plasmid was comparable after transfection in cultured neurons, we quantified the intensity of EGFP fluorescence in unfixed living transfected neurons as an index of D2 receptor expression. The signal intensity, evaluated using identical acquisition parameters, was not different in neurons expressing EGFP-D2S (n=40) in comparison to neurons expressing EGFP-D2L (n=29) (Student's t-test, $p=0.76$) (not shown).

Immunocytochemistry. Transfected cultured neurons were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered solution (pH 7.4) and incubated with a polyclonal

anti-GFP antibody (BD Sciences Clontech) or a polyclonal anti-D2 antibody (150 mg/mL, final dilution 1:250) (Cleveland and Yen, T. J., 1989) to detect the overexpressed EGFP-D2R fusion proteins. The detection of transfected D2 receptors using an anti-GFP (100 mg/mL, final dilution 1:250) antibody allowed a more sensitive detection of receptor level and localization since we found that after fixation, the intrinsic intensity of EGFP fluorescence was greatly reduced. Monitoring endogenous EGFP fluorescence was however effective to identify transfected neurons before electrophysiological recordings. For immunocytochemistry, the anti-GFP or anti-D2 primary antibodies were visualized using an Alexa-488-labeled secondary antibody (2 mg/mL, final dilution 1:200) (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Monoclonal anti-MAP2 (9.7 mg/mL, final dilution 1:250) or anti-Ankyrin B antibodies (0.5 mg/mL, final dilution 1:250) (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA), detected with an Alexa-546-labeled secondary antibody (2 mg/mL, final dilution 1:200), were used to identify dendritic structures or axons, respectively. In some experiments triple labeling was performed, using in addition a sheep anti-tyrosine hydroxylase antibody (0.2 mg/mL, final dilution 1:100) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) to identify dopamine neurons. This primary antibody was visualized with a Cy5-labeled secondary antibody (1.5 mg/mL, final dilution 1:200) (Jackson ImmunoResearch laboratories Inc., West Grove, PA, USA). Images of immunofluorescent labeling were acquired using a Hamamatsu Orca-II digital cooled CCD camera and an Invision workstation using Isee software (Invision Corporation, Raleigh, NC, USA.). Additional immunofluorescence images were acquired using a point scanning

confocal microscope from Prairie Technologies LLC (Middletown, WI, USA). Excitation was achieved using the 488 nm line of an argon ion laser and with the 633 nm line of a helium-neon laser.

Electrophysiology. Electrophysiological recordings were performed at room temperature on transfected neurons maintained for 6-10 days in culture. The standard extracellular bathing solution contained (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 6 sucrose, 10 glucose, pH 7.35, \cong 300 mOsm. Drugs were bath applied, with a delay between valve opening and onset of drug action of approximately 15 s. Whole-cell current clamp recordings were performed using a Warner PC-505 patch-clamp amplifier (Warner Instruments Corp., Hamden, CT, USA). Signals were filtered at 1 kHz, digitized at 10 kHz and recorded and analyzed using Pclamp7 software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) and Mini Analysis software (version 5.6) (Synaptosoft Inc., Leonia, NJ, USA) respectively. Action potentials were recorded with borosilicate glass patch pipettes (5-7 M Ω) filled with a potassium methylsulfate intrapipette solution containing (mM): 145 KMeSO₄, 20 KCl, 10 NaCl, 0.1 EGTA, 2 ATP (Mg salt), 0.6 GTP (Tris salt), 10 HEPES, 10 phosphocreatine (Tris salt) (pH 7.35). In all experiments, the firing frequency was normalized to the average frequency recorded in the baseline period (2 minutes before drug application) and expressed as a percentage. The effect of a drug on firing rate was determined as the ratio of mean firing frequency at the peak of the effect (usually 1 min for the effect of the D2 agonist quinpirole) to the average frequency measured during baseline

and wash-out periods. This calculation method takes into account any rundown in firing rate that could occur during long recording periods.

Synaptic responses in single neurons were recorded using the ruptured whole-cell patch-clamp technique. These synaptic responses are generated by synapses (or “autapses”) established by the neurons’ axon terminals onto its own dendrites. During whole-cell recording, autaptic responses were evoked every 15s by a brief (1 ms) depolarizing voltage step from a holding potential (V_H) of -50 mV. In excitatory neurons, this usually elicited a sodium “action current” followed by a 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX)-sensitive glutamate-mediated inward autaptic EPSC. In inhibitory neurons, autaptic currents evoked by brief (1 ms) depolarizing voltage steps from a holding potential (V_H) of -40 mV, displayed reversal potentials close to -50 mV and were sensitive to 5 μ M SR-95531, a γ -aminobutyric acid-A (GABA_A) receptor antagonist.

Mesencephalic cultures used contain dopaminergic neurons, expressing D2 receptors endogenously. We therefore performed post-hoc immunofluorescence after each electrophysiological recording to identify neuronal phenotype. Dopaminergic neurons constituted a minority of the recorded neurons (less than 25%). Since the magnitude of responses mediated by endogenous D2 receptors in these cells is much smaller than in neurons overexpressing the D2 receptor-mediated responses (not shown) and the responses measured in D2-transfected dopaminergic neurons was not different from those observed in D2 transfected non-dopaminergic neurons, all experiments were pooled. In addition, although dopaminergic neurons in culture have the ability to release dopamine, the

extracellular levels during our experiments should have been minimal considering that cells were continuously perfused with saline. The activation of transfected D2 receptors by endogenous dopamine should not have affected our results. Finally, it should be pointed out that non-dopaminergic neurons in mesencephalic cultures are unresponsive to D2-like receptor agonists (Congar et al., 2002).

Calcium imaging. Changes in cytosolic intracellular calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) were measured with Fura 2 ratio fluorescence. Briefly, cells were loaded with fura 2 by incubating cells grown on 15-mm coverslips in saline (pH 7.4) containing 5 μ M fura-2-AM and 0.02% pluronic acid (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 45 min. at room temperature. For $[Ca^{2+}]_i$ measurements, the coverslip was mounted in a recording chamber that was fixed to the stage of an inverted Nikon Eclipse TE-200 microscope. The coverslip was constantly perfused with physiological saline solution (containing in mM: NaCl 140, KCl 5, $MgCl_2$ 2, $CaCl_2$ 2, HEPES 10, glucose 10, sucrose 6 at a pH of 7.35), this solution was maintained at 37°C. $[Ca^{2+}]_i$ was measured by digital fluorescence imaging using Ratiotool software (Inovision Corporation, Raleigh, NC, USA.). Fluorescence excitation at 340/380nm was controlled by a DG4 xenon lamp (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Fluorescence was collected after passing through a 495 nm long pass filter. Excitation image pairs (340/380 nm) were acquired every 5 s with a Orca-II digital cooled-CCD camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA). $[Ca^{2+}]_i$ was calculated using an *in situ* calibration protocol and Grynkiewicz's equation (Blaxall et al., 2000). We considered a

neuron non-responsive when a change of less than 50nM in $[Ca^{2+}]_i$ was measured in response to a pharmacological agent.

Statistical analysis. The results are expressed as arithmetic means \pm SEM. For statistical analysis, Two Factor ANOVA, and t-tests were used as indicated.

RESULTS

Subcellular localization of dopamine D2S and D2L receptors.

The ligand binding affinities and coupling to the inhibition of adenylyl cyclase of EGFP-tagged D2S and D2L receptors were similar and not impaired when compared with their wild-type counterparts using heterologous expression in human embryonic kidney 293 cells (Sedaghat, Nantel, Ginsberg, Lalonde and Tiberi, submitted). All subsequent experiments were performed in postnatal rat mesencephalic neurons in primary culture. Expression of EGFP-D2 fusion proteins was detected by immunocytochemistry using an anti-D2 antibody (Fig 1C, 1D, 1E). This signal could not be mistaken with endogenous D2 receptor expression in mesencephalic neurons because D2 receptor abundance is low in cultured dopaminergic neurons and in fact undetectable by immunocytochemistry (Fig 1A-1B). However, EGFP-D2L (Fig 1C) and EGFP-D2S (Fig 1D) fusion proteins are easily detectable in cultured transfected neurons. Because high quality anti-D2 antibodies are not readily available and because the expression profile of EGFP-D2 fusion proteins is quite similar when detected using anti-D2 (Fig 1E) or anti-GFP antibodies (Fig 1F), all subsequent immunolabeling experiments were performed using a anti-GFP antibody. To characterize the subcellular expression pattern of each splice variants, double-labeling was performed using an antibody directed against MAP2, to identify dendritic structures (Caceres et al., 1986), or ankyrin B (Zhang and Bennett, 1998) to identify axons. EGFP-D2L (Fig. 2A, 2B, 2C) and EGFP-D2S (Fig. 2D, 2E, 2F) co-localized with MAP2

suggesting that both isoforms can be targeted to the somatodendritic compartment. In addition to the somatodendritic expression, EGFP-D2S and EGFP-D2L receptors were also observed in small caliber processes that did not express MAP2 protein, which suggest that the two isoforms could also be targeted to a subcellular compartment reminiscent of axons (Fig. 2G). Overall, the axonal-like expression of D2 receptors was observed in 45% and 36% of neurons expressing EGFP-D2S and EGFP-D2L respectively (Table 1) (Chi-square = 0.686, $P > 0.05$). To confirm that these small MAP2-negative processes expressing EGFP-D2 fusion receptors were indeed axons, double-labeling was performed using an antibody against ankyrin B, a protein only found in axons (Zhang and Bennett, V., 1998) (Fig. 2H, 2I). As a positive control for our ability to detect EGFP-labeled axons, we overexpressed the cytoplasmic form of EGFP alone in neurons. The majority of transfected neurons displayed a thin MAP2-negative process expressing EGFP (81%, Table 1).

Using a triple-labeling approach, we next evaluated whether receptor targeting was different in dopaminergic neurons in comparison to non-dopaminergic neurons in the same cultures. Tyrosine hydroxylase immunolabeling was used to identify dopaminergic neurons, while EGFP-D2S and EGFP-D2L were detected using the anti-GFP antibody. The expression profile of EGFP-D2S and EGFP-D2L was not different in dopaminergic neurons compared to non-dopaminergic neurons. Indeed, expression of EGFP-D2S was observed in small caliber MAP2-negative processes (presumed axons) in 55% ($n = 20$) of transfected dopaminergic neurons and in 42% ($n = 39$) of non-dopaminergic neurons (Chi-square = 0.553, $P > 0.05$). Likewise, expression of EGFP-D2L was observed in presumed

axons in 50% (n =16) of transfected dopaminergic neurons and in 31% (n=38) of non-dopamine transfected neurons (Chi-square= 0.944, $P>0.05$) (not shown).

D2S and D2L are equipotent in inhibiting firing rate.

We next tested the hypothesis that the preferential autoreceptor role of the D2S might result from an enhanced capacity to inhibit firing frequency. Whole-cell recordings were obtained from neurons transfected with EGFP-D2L or EGFP-D2S (Fig. 3A). Quinpirole (1 μM), a D2-selective agonist, caused a reduction in the spontaneous firing rate and membrane hyperpolarization in EGFP-D2S and EGFP-D2L transfected neurons (Fig. 3B, 3C). The quinpirole-induced decrease in firing did not show pronounced acute desensitization and was stable during the 5 min agonist applications (Fig. 3B, 3C). A comparison of summary data shows that both isoforms were equipotent to inhibit firing rate (Paired Student t-test, $P>0.05$) (Fig 3D). A comparison of maximal effects showed that activation of EGFP-D2S by quinpirole (1 μM) caused an inhibition of $74.9 \pm 4.0\%$ (n=14) in firing frequency while an inhibition of $66.4 \pm 6.9\%$ (n=15) was observed in neurons expressing EGFP-D2L. A closer examination of the kinetics of the effect of quinpirole on spontaneous firing in 9 cells revealed that the time required to reach half of the maximal effect was quite similar in neurons expressing EGFP-D2S or EGFP-D2L (35 ± 9.6 s and 46.1 ± 7.8 s, Student t-test $p > 0.05$). The half-time of recovery had a tendency to be more rapid with EGFP-D2S, but the difference was not statistically significant (210.8 ± 49.4 s and 107.7 ± 31.2 s), Student t-test $p=0.1$).

The aforementioned set of experiments was made using a saturating dose of quinpirole (1 μ M) to assess response desensitization. Additionally, a dose-response relationship for quinpirole-mediated inhibition of spontaneous firing frequency in neurons expressing EGFP-D2S or EGFP-D2L receptors was made (Fig 4A, B). No statistically significant differences between the two groups were detected (Two way ANOVA; $p > 0.05$ for the effect of the isoform; $p < 0.01$ for the effect of the dose) (Fig 4A, B).

As a control, the ability of the D2 antagonist sulpiride (5 μ M) to block the effect of quinpirole was evaluated in a subset of neurons. For these experiments, quinpirole (1 μ M) was first applied alone for 2 min and, after a 6 min wash out period, it was applied again in the presence of sulpiride (5 μ M). In these neurons, the maximal inhibition of firing frequency induced by the activation of EGFP-D2S or EGFP-D2L with quinpirole was $78.1 \pm 9.5\%$ ($n = 4$) and $74.4 \pm 11.7\%$ ($n = 5$), respectively, while this inhibition was reduced to $-3.7 \pm 15.8\%$ and $9.2 \pm 10.8\%$, respectively, in the presence of sulpiride (Paired Student t-test, $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) (Fig. 4C).

D2S and D2L receptor isoforms can act presynaptically to inhibit neurotransmitter release.

In dopaminergic neurons, release can also be directly modulated through terminal D2 autoreceptors. Considering our immunolabeling results demonstrating that both D2S and D2L proteins can be efficiently targeted to axons, we wondered both receptor isoforms can also act at axon terminals to inhibit neurotransmitter release. To answer this question

we transfected single isolated neurons, a preparation in which synaptic terminals are established onto the neuron's own dendrites, thus facilitating measurements of action potential-evoked synaptic transmission.

During whole-cell recording, a brief (1 ms) depolarizing voltage step evoked a fast inward sodium current (generating an unclamped action potential) followed by a postsynaptic, CNQX-sensitive excitatory postsynaptic current (autaptic EPSC) (Fig 5A, 5B) in the majority of neurons. In a few neurons, the evoked postsynaptic current was sensitive to the GABA_A receptor antagonist SR95531 and was thus a GABAergic IPSC (not shown). Bath application of quinpirole (1 μM) robustly and reversibly decreased the peak amplitude of autaptic synaptic currents in isolated neurons expressing EGFP-D2L (Fig 5A) or EGFP-D2S (Fig 5B). Activation of EGFP-D2L by quinpirole caused a 69.6 ± 6.2 % inhibition of autaptic postsynaptic current amplitude (n=7, Student t-test $p < 0.01$) (Fig 5C). The magnitude of inhibition was similar in neurons expressing EGFP-D2S (66.8 ± 6.2 %, n=5, Student t-test $p < 0.05$) (Fig 5D). An additional set of experiments was performed to evaluate whether expressing lower amounts of receptors would reveal a differential targeting to the axon and differential ability to act as presynaptic receptors. We co-transfected neurons with EGFP-D2S or EGFP-D2L and pEGFP-N3 plasmids (EGFP alone) at a ratio of 1:10. We found that when using a ten-fold lower quantity of D2 plasmid, quinpirole decreased the amplitude of autaptic postsynaptic currents by 65.5 ± 7.9 % (n=7, $p \leq 0.006$) in neurons expressing EGFP-D2L while the decrease was of 62.8 ± 4.9 % (n=5, $p \leq 0.007$) in neurons expressing EGFP-D2S (not shown). This finding confirms our

previous morphological and physiological data showing that EGFP-D2S and EGFP-D2L both reach the axonal compartment and act as terminal autoreceptors in an equivalent manner.

D2S and D2L receptor isoforms do not induce calcium mobilization.

Although D2 receptor stimulation has been found to mobilize intracellular calcium in certain cell lines (Vallar et al., 1990; Tang et al., 1994; Ghahremani et al., 1999) and in striatal medium spiny neurons (Hernandez-Lopez et al., 2000), this ability has been recently proposed to require co-activation of D1 DA receptors (Lee et al., 2004). However, it remains undetermined whether D2S or D2L expressed alone in neurons can influence intracellular calcium. To evaluate this possibility, transfected cultured neurons were loaded with fura-2 AM, a fluorescent calcium indicator, and changes in $[Ca^{2+}]_i$ were measured with Fura 2 ratio fluorescence. We found that neither D2S nor D2L isoforms cause an elevation of intracellular calcium levels, even in response to relatively high doses of quinpirole (5 μ M). In fact, activation D2S or D2L isoforms by quinpirole caused a decrease in basal intracellular calcium levels ($32.7 \pm 6.8\%$ and $31.9 \pm 6.7\%$ respectively, Student paired t-test $p < 0.001$) (Fig. 6A, 6B). The effect of quinpirole was similar in D2S-EGFP and D2L-EGFP transfected neurons (Fig 6C) (Student t-test, $p > 0.05$). All transfected neurons showed an increase in intracellular calcium in response to membrane depolarization using 40 mM K⁺-containing saline (not shown), used to assess cell viability.

DISCUSSION

In the present study, we expressed EGFP-tagged dopamine D2 receptor isoforms in primary cultured neurons to compare their relative efficacy as somatodendritic and terminal receptors. We found that D2S and D2L are equipotent in the regulation of neuronal excitability and neurotransmitter release, two well-known functions associated with somatodendritic and terminal D2 autoreceptors, respectively. These results are consistent with the subcellular localization observed for each isoform. Indeed, we found that transfected neurons expressed EGFP-D2S and EGFP-D2L in their axons in addition to their somatodendritic compartment.

In light of the recent studies using D2L-KO mice (Usiello et al., 2000; Wang et al., 2000; Lindgren et al., 2003), it has been suggested that D2 receptor isoforms could serve distinct physiological functions. These studies indicate that the short isoform is the major D2 dopamine autoreceptor while the D2L plays mostly a postsynaptic role. This idea is further supported by a study showing that the D2S is more abundantly expressed in dopaminergic neurons (Khan et al., 1998). Considering that dopamine neurons can also express D2L, we wished to evaluate whether any functional differences between D2S and D2L explains the preferential function of D2S as autoreceptor in dopaminergic neurons. When overexpressed in primary cultured neurons, EGFP-tagged dopamine D2S receptors did not show a better efficiency than D2L receptors to act as somatodendritic and terminal

autoreceptors. This lack of difference persisted even when using low agonist concentrations or when using 10-fold lower plasmid levels for transfection, compatible with the idea that differences were not masked due to exceedingly high receptor numbers (although we cannot completely exclude that small differences were masked by receptor overexpression). These results help to clarify previous results on D2 receptor isoform expression in dopaminergic neurons by suggesting that the reason for preferential D2S autoreceptor function in dopaminergic neurons is quantitative rather than qualitative, i.e. D2S functions as the major autoreceptor in dopaminergic neurons because preferential splicing leads to more abundant D2S and not because D2L has some diminished capacity to function as a terminal or somatodendritic autoreceptor. Our results therefore do not contradict previous studies implicating the D2S isoform in autoreceptor function in the midbrain (Usiello et al., 2000; Centonze et al., 2002; Joseph et al., 2002; Rouge-Pont et al., 2002). Although in another system, it is also interesting to note that D2S and D2L equally participate in the somatodendritic inhibitory effect of D2 agonists on GABAergic neurons of the striatum (Centonze et al., 2004).

The D2 subtype of dopamine receptor represents the main autoreceptor within the dopaminergic system (Mercuri et al., 1997; L'hirondel et al., 1998; Usiello et al., 2000), but is also critical for postsynaptic transmission. Since it has been previously shown that stimulation of D2 receptors in acutely isolated striatal neurons (Hernandez-Lopez et al., 2000) or in D2 receptor-transfected GH4C1 or CCL1.3 cells (Vallar et al., 1990; Tang et

al., 1994; Ghahremani et al., 1999), can cause an increase in intracellular calcium, we were interested to evaluate the ability of the D2L dopamine receptor, the isoform associated with post-synaptic functions, to couple to intracellular calcium mobilization. In contrast to these studies, our data clearly show that neither D2L nor D2S activation promotes calcium mobilization in neurons under our experimental conditions, even though we used relatively high doses of D2 agonist (see Khan et al., 2001 for calcium mobilization in astrocytes with high doses of quinpirole). In fact, the basal intracellular calcium level was diminished to a similar extent by activation of each D2 receptor isoforms, a phenomenon that likely results from the inhibition of firing rate, leading to reduced activation of voltage-gated calcium channels. A direct inhibition of voltage-gated calcium channels by the D2 receptor could also be involved (Cardozo and Bean, 1995). The fact that we see no intracellular calcium mobilization in response to a D2 receptor agonist is in agreement with the recent suggestion that co-activation of D1 and D2 receptors is required for calcium mobilization (Lee et al., 2004). Co-expression experiments in cultured neurons would be useful to extend this conclusion to neurons.

The dopamine D2 receptor is the first GPCR for which a splice variant was reported (Monsma et al., 1989). Since this discovery, studies of the functional consequences of alternative splicing have focused on both ligand binding and signaling efficacy. Until now, attempts to examine differential coupling of D2 dopamine receptor isoforms to G-protein subunits have led to conflicting results (Senogles, 1994; Liu et al., 1994; Guiramand et al.,

1995). In addition, the differences reported between D2S and D2L in their coupling efficiency are likely to depend on the expression system. For example, while in HEK293 cells EGFP-D2L appears to be less readily expressed at the plasma membrane than EGFP-D2S (Sedaghat et al., submitted), when expressed in cultured neurons, we see no difference in the ability of these same receptors to be activated by a D2 agonist leading to firing rate inhibition. It was thus important to closely evaluate possible differences in coupling using intact neurons as a model. Despite these discrepancies, compelling evidence indicates that D2S is the preferential autoreceptor while D2L acts mainly at postsynaptic sites *in vivo*. In the present study, we showed that in transfected neurons, both isoforms are equipotent to regulate neuronal excitability as well as neurotransmitter release. Our findings support the hypothesis that D2S is the major autoreceptor in dopaminergic neurons because of its higher expression levels in these cells (Khan et al., 1998) rather than because it displays some unique properties for the coupling to the rapid signaling pathways that mediate the inhibition of neurotransmitter release and cellular excitability in axon terminals and somatodendritic compartment, respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank François Michel and Caroline Forget for their help in establishing the transfection protocol. This work was funded by grants from the Canadian Health Research Institutes to L.-E. T. (MOP-49591) and the Ontario Mental Health Foundation to M. T. L.-E. T. is a senior scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

1. Benoit-Marand M, Borrelli E, Gonon F (2001) Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics in vivo. *J Neurosci* 21:9134-41.
2. Bourque MJ, Trudeau LE (2000) GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. *Eur J Neurosci* 12:3172-80.
3. Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336:783-7.
4. Caceres A, Banker GA, Binder L (1986) Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 6:714-22.
5. Cardozo DL (1993) Midbrain dopaminergic neurons from postnatal rat in long-term primary culture. *Neuroscience* 56:409-21.
6. Cardozo DL, Bean BP (1995) Voltage-dependent calcium channels in rat midbrain dopamine neurons: modulation by dopamine and GABAB receptors. *J Neurophysiol* 74:1137-48.
7. Castro SW, Strange PG (1993) Differences in the ligand binding properties of the short and long versions of the D2 dopamine receptor. *J Neurochem* 60:372-5.
8. Centonze D, Usiello A, Gubellini P, Pisani A, Borrelli E, Bernardi G, Calabresi P (2002) Dopamine D2 receptor-mediated inhibition of dopaminergic neurons in mice lacking D2L receptors. *Neuropsychopharmacology* 27:723-6.

9. Centonze D, Gubellini P, Usiello A, Rossi S, Tschertter A, Bracci E, Erbs E, Tognazzi N, Bernardi G, Pisani A, Calabresi P, Borrelli E (2004) Differential contribution of dopamine D2S and D2L receptors in the modulation of glutamate and GABA transmission in the striatum. *Neuroscience* 129:157-66.
10. Choi EY, Jeong D, Won K, Park, Baik JH (1999) G protein-mediated mitogen-activated protein kinase activation by two dopamine D2 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 256:33-40.
11. Congar P, Bergevin A, Trudeau LE (2002) D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K⁺ channels. *J Neurophysiol* 87:1046-56.
12. Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH (1989) The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* 8:4025-34.
13. Ghahremani MH, Cheng P, Lembo PM, Albert PR (1999) Distinct roles for Galphai2, Galphai3, and Gbeta gamma in modulation of forskolin- or Gs-mediated cAMP accumulation and calcium mobilization by dopamine D2S receptors. *J Biol Chem* 274:9238-45.
14. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-50.
15. Guiramand J, Montmayeur JP, Ceraline J, Bhatia M, Borrelli E (1995) Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins. *J Biol Chem* 270:7354-8.

16. Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E,argas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]₁-IP₃-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20:8987-95.
17. Joseph JD, Wang YM, Miles PR, Budygin EA, Picetti R, Gainetdinov RR, Caron MG, Wightman RM (2002) Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D(3) receptors. *Neuroscience* 112:39-49.
18. Khan ZU, Mrzljak L, Gutierrez A, de la Calle A, Goldman-Rakic PS (1998) Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7731-6.
19. Khan Z. U., Koulou P., Rubinstein M., Grandy D.K., Goldman-Rakic P.S., 2001 An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1964-9.
20. Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lanca AJ, O'Dowd BF, George SR (2004) Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* 279:35671-8.
21. Leysen JE, Gommeren W, Mertens J, Luyten WH, Pauwels PJ, Ewert M, Seeburg P (1993) Comparison of in vitro binding properties of a series of dopamine antagonists and agonists for cloned human dopamine D_{2S} and D_{2L} receptors and for D₂ receptors in rat striatal and mesolimbic tissues, using. *Psychopharmacology (Berl)* 110:27-36.
22. L'hirondel M, Cheramy A, Godeheu G, Artaud F, Saiardi A, Borrelli E, Glowinski J (1998) Lack of autoreceptor-mediated inhibitory control of dopamine release in striatal synaptosomes of D2 receptor-deficient mice. *Brain Res* 792:253-62.

23. Lindgren N, Usiello A, Goiny M, Haycock J, Erbs E, Greengard P, Hokfelt T, Borrelli E, Fisone G (2003) Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
24. Liu LX, Monsma FJ Jr, Sibley DR, Chiodo LA (1996) D2L, D2S, and D3 dopamine receptors stably transfected into NG108-15 cells couple to a voltage-dependent potassium current via distinct G protein mechanisms. *Synapse* 24:156-64.
25. Liu LX, Burgess LH, Gonzalez AM, Sibley DR, Chiodo LA (1999) D2S, D2L, D3, and D4 dopamine receptors couple to a voltage-dependent potassium current in N18TG2 x mesencephalon hybrid cell (Liu et al., 1999) via distinct G proteins. *Synapse* 31:108-18.
26. Liu YF, Civelli O, Grandy DK, Albert PR (1992) Differential sensitivity of the short and long human dopamine D2 receptor subtypes to protein kinase C. *J Neurochem* 59:2311-7.
27. Liu YF, Jakobs KH, Rasenick MM, Albert PR (1994) G protein specificity in receptor-effector coupling. Analysis of the roles of G₀ and G_{i2} in GH4C1 pituitary cells. *J Biol Chem* 269:13880-6.
28. Maltais S, Côté S, Drolet G, Falardeau P (2000) Cellular colocalization of dopamine D1 mRNA and D2 receptor in rat brain using a D2 dopamine receptor specific polyclonal antibody. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24:1127-49.
29. May LJ, Wightman RM (1989) Effects of D-2 antagonists on frequency-dependent stimulated dopamine overflow in nucleus accumbens and caudate-putamen. *J Neurochem* 53:898-906.

30. Mercuri NB, Saiardi A, Bonci A, Picetti R, Calabresi P, Bernardi G, Borrelli E (1997) Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience* 79:323-7.
31. Michel FJ, Trudeau LE (2000) Clozapine inhibits synaptic transmission at GABAergic synapses established by ventral tegmental area neurones in culture. *Neuropharmacology* 39:1536-43.
32. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
33. Monsma FJ Jr, McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC, Sibley DR (1989) Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342:926-9.
34. Montmayeur JP, Guiramand J, Borrelli E (1993) Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G-proteins. *Mol Endocrinol* 7:161-70.
35. Rouge-Pont F, Usiello A, Benoit-Marand M, Gonon F, Piazza PV, Borrelli E (2002) Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D2 receptors. *J Neurosci* 22:3293-301.
36. Senogles SE (1994) The D2 dopamine receptor isoforms signal through distinct Gi alpha proteins to inhibit adenylyl cyclase. A study with site-directed mutant Gi alpha proteins. *J Biol Chem* 269:23120-7.
37. Shieh PB, Hu SC, Bobb K, Timmusk T, Ghosh A (1998) Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 20:727-40.
38. Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* 18:4588-602.

39. Tang L, Todd RD, Heller A, O'Malley KL (1994) Pharmacological and functional characterization of D2, D3 and D4 dopamine receptors in fibroblast and dopaminergic cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 268:495-502.
40. Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408:199-203.
41. Vallar L, Muca C, Magni M, Albert P, Bunzow J, Meldolesi J, Civelli O (1990) Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in LtK- fibroblasts, hyperpolarization, and cytosolic-free Ca²⁺ concentration decrease in GH4C1 cells. *J Biol Chem* 265:10320-6.
42. Wang Y, Xu R, Sasaoka T, Tonegawa S, Kung MP, Sankoorikal EB (2000) Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions. *J Neurosci* 20:8305-14.
43. Wolfe SE, Morris SJ (1999) Dopamine D2 receptor isoforms expressed in AtT20 cells differentially couple to G proteins to acutely inhibit high voltage-activated calcium channels. *J Neurochem* 73:2375-82.
44. Zhang X, Bennett V (1998) Restriction of 480/270-kD ankyrin G to axon proximal segments requires multiple ankyrin G-specific domains. *J Cell Biol* 142:1571-81.

FIGURE LEGENDS

Figure 6.1 Overexpression of D2 receptor isoforms in cultured mesencephalic neurons. Confocal immunofluorescence images of midbrain cultured neurons. These cultures contain dopaminergic neurons as detected by anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibodies (**A**). Although dopamine neurons endogenously expressed D2 receptors these receptors are expressed at levels too low to be detected using an anti-D2 antibody (**B**). Immunofluorescence images of midbrain cultured neurons transfected with EGFP-D2L (**C**) or with EGFP-D2S (**D**, **E**, and **F**). Cellular expression of D2 receptor fusion proteins (green) can both be detected using an anti-D2 antibody (**C**, **D**, **E**) and an anti-GFP antibody (**F**). As can be seen, the expression profile looks quite similar when the same transfected neuron was double-immunostained for D2 (**E**) or GFP (**F**). Scale bar in **A**: 15 μm .

Figure 6.2 Subcellular localization of D2S and D2L dopamine receptors

Immunofluorescence images of cultured neurons transfected with EGFP-D2L (A-C) or with EGFP-D2S (D-H). Cellular expression of D2 receptor fusion proteins (green) was detected using an anti-EGFP antibody (A, D, H). Both D2S and D2L co-localize with the dendritic marker MAP2 (red) (B-E) as shown by the overlapping signals (yellow/orange) (C, F). The immunofluorescence image in G illustrates the localization of EGFP-D2S (green) and the dendritic marker MAP2 (red). The neuron shows a small caliber process that is immuno-negative for MAP2 (white arrow). The image shown in H illustrates another neuron expressing EGFP-D2S (green). The enlargement (I) originating from the area indicated by the white box in H, shows a double-labeling image illustrating the co-localization of D2S (green) and the axonal marker ankyrin B (red). Scale bar in A: 15 μ m.

Figure 6.3 D2S and D2L are equipotent in inhibiting firing rate. (A1) Phase contrast

image of a patched EGFP-D2S transfected neuron (A2). Scale bar: 20 μ m. (B, C). Representative examples of patch-clamp recordings of spontaneous action potentials in neurons transfected with EGFP-D2L (B) or EGFP-D2S (C). Quinpirole (1 μ M; 5 min; black bar) caused a strong reduction of firing frequency. D. Graph summarizing experiments performed on neurons transfected with EGFP-D2L (\square) (n=9) and EGFP-D2S (\blacksquare) (n=9). Data are expressed as mean \pm SEM.

Figure 6.4 Dose-response curve of the effect of the D2 agonist quinpirole on the firing rate of transfected neurons.

(A) Histogram showing the dose-response relationship of quinpirole on firing frequency. The number of observations is indicated in parentheses for each group. The columns represent the maximal inhibition of firing rate induced by quinpirole. The effect of the D2 antagonist sulpiride (5 μ M) on the effect of the higher dose of quinpirole is also shown. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. (B) Representative example of a patch-clamp recording experiment measuring spontaneous action potentials in neurons transfected with EGFP-D2L. Increasing concentrations of quinpirole (1nM, 10nM and 100nM) were applied for 2 min each and separated by a 6 min wash out period. Data are expressed as mean \pm SEM. C. Sulpiride (5 μ M) blocked the effect of Quinpirole (*Quin*) on firing frequency. The graph represents the maximal inhibition of firing rate induced by quinpirole with or without sulpiride. EGFP-D2L (\square) (n=5) and EGFP-D2S (\blacksquare) (n=4). Data are expressed as mean \pm SEM . * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Figure 6.5 Both D2S and D2L mediate presynaptic inhibition in single transfected neurons. (A, B) Patch-clamp recordings of EPSCs evoked by single action potentials in isolated neurons transfected with EGFP-D2L (A) or EGFP-D2S (B). In excitatory neurons, the autaptic response corresponds to a CNQX-sensitive glutamate-mediated inward autaptic EPSC. Quinpirole (*Quin*) (1 μ M) caused a strong reduction of the amplitude of the autaptic response. (C, D) Summary graph of the effect of quinpirole (*Quin*) on the amplitude of autaptic responses in neurons transfected with EGFP-D2L (n=7) (C) or EGFP-D2S (n=5) (D). The amplitude of autaptic responses was normalized to that observed during the baseline period. Data are expressed as mean \pm SEM. * p<0.05, ** p<0.01.

Figure 6.6 Both D2S and D2L decrease intracellular calcium concentration.

(A, B). Example of fura-2 calcium imaging experiments in rat cultured neurons transfected with EGFP-D2L (A) or EGFP-D2S (B). Quinpirole (5 and 50 μ M) was applied for 5 minutes. Transfected neurons were identified prior the experiment by epifluorescence. C. Summary graph of the effect of quinpirole (*Quin*) on basal intracellular [Ca²⁺] in neurons transfected with EGFP-D2L (n=12) or EGFP-D2S (n=13). Data are normalized to baseline period and expressed as mean \pm SEM.

Table 1 **Localization of D2 receptor isoforms in transfected neurons.** The first column indicates the proportion of neurons transfected with either EGFP-D2S, EGFP-D2L or EGFP alone, in which a presumed axon (MAP2-negative) contained detectable EGFP signal. The second and third columns provide raw data including the total number of transfected neurons detected by immunocytochemistry using anti-GFP antibodies. The identification of a process as EGFP-positive and MAP2-negative (thus not a dendrite) was unequivocal considering the robust level of MAP2 immunostaining

Figure 6.1

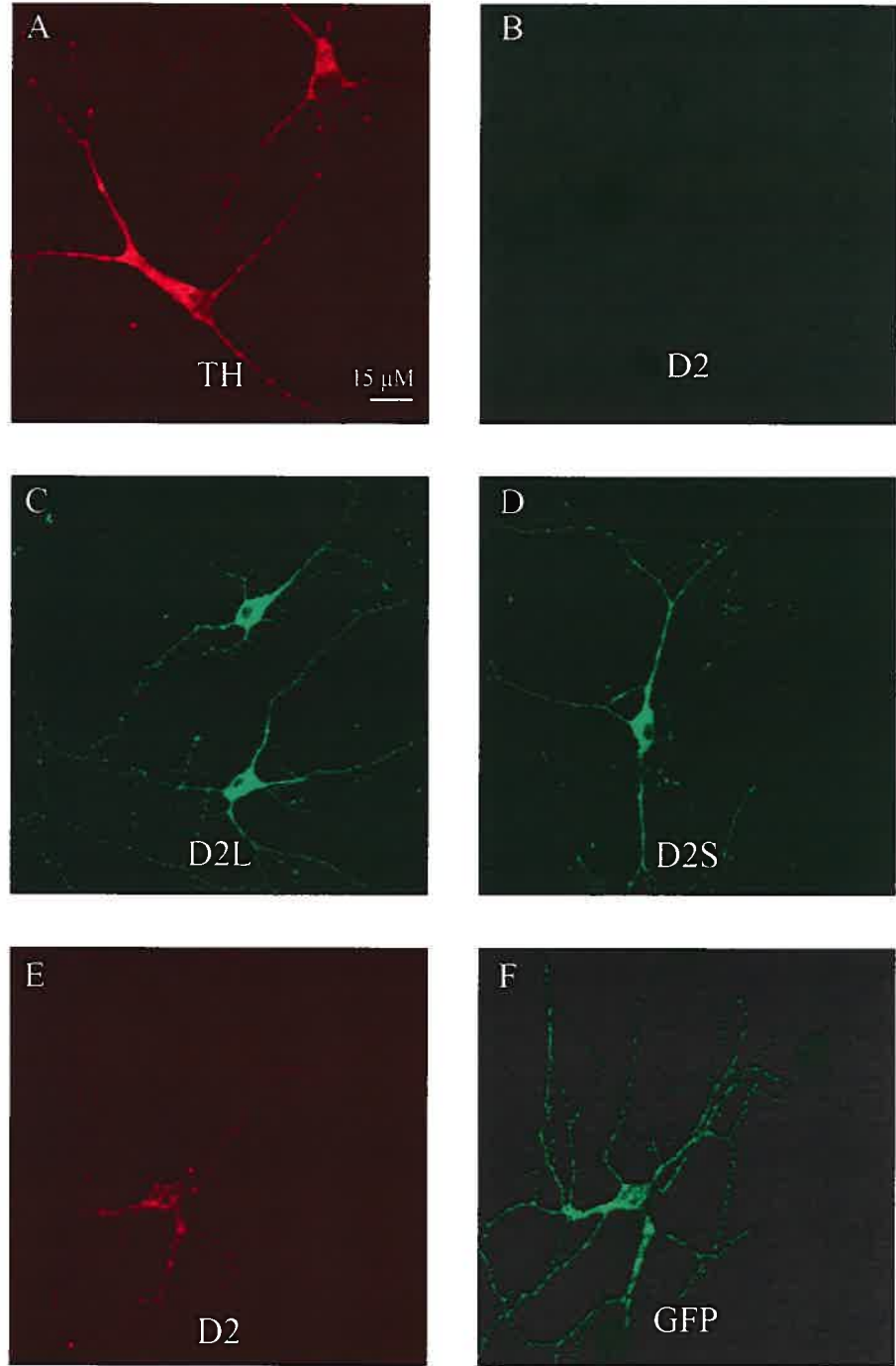


Figure 6.2

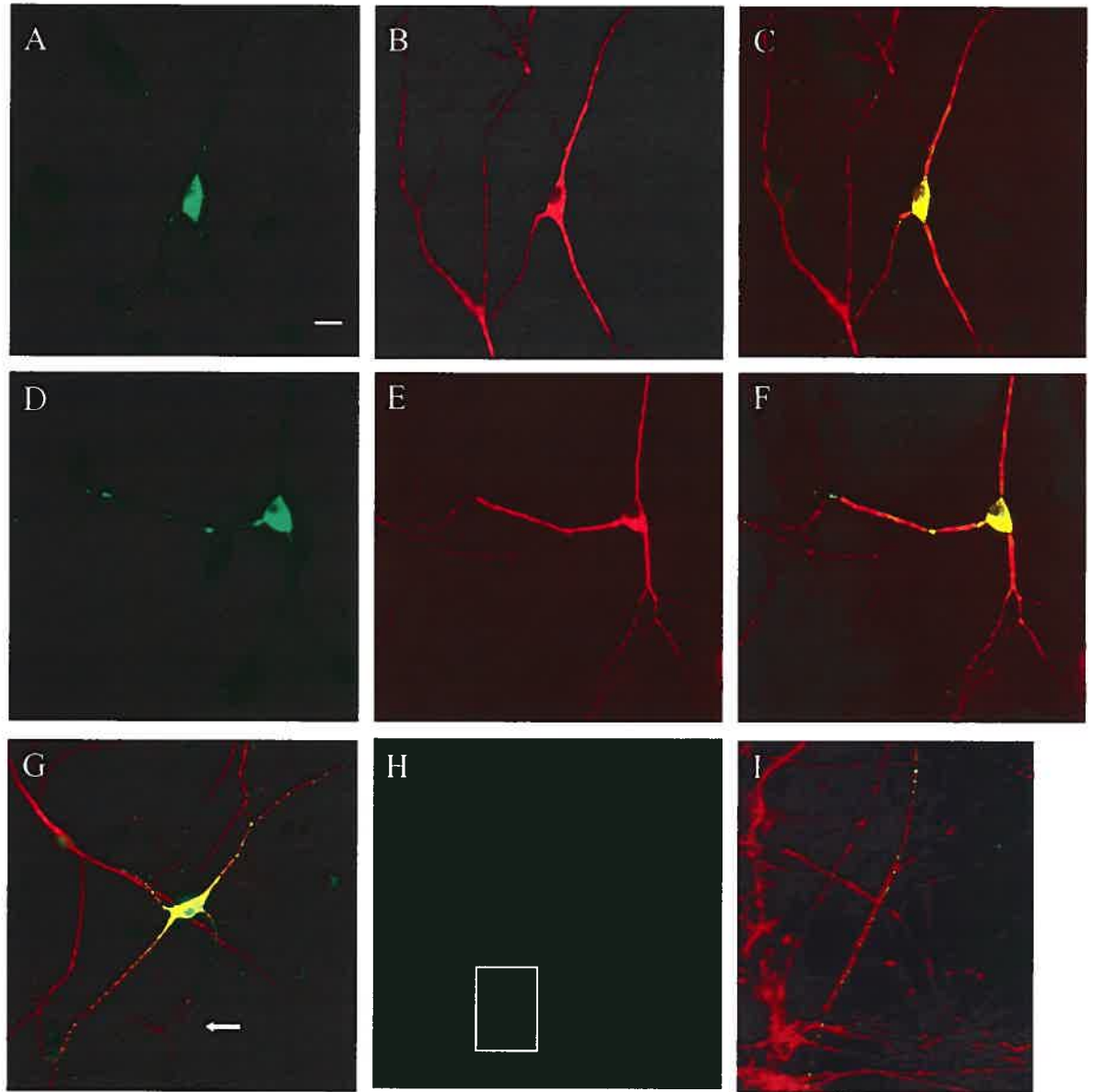


Figure 6.3

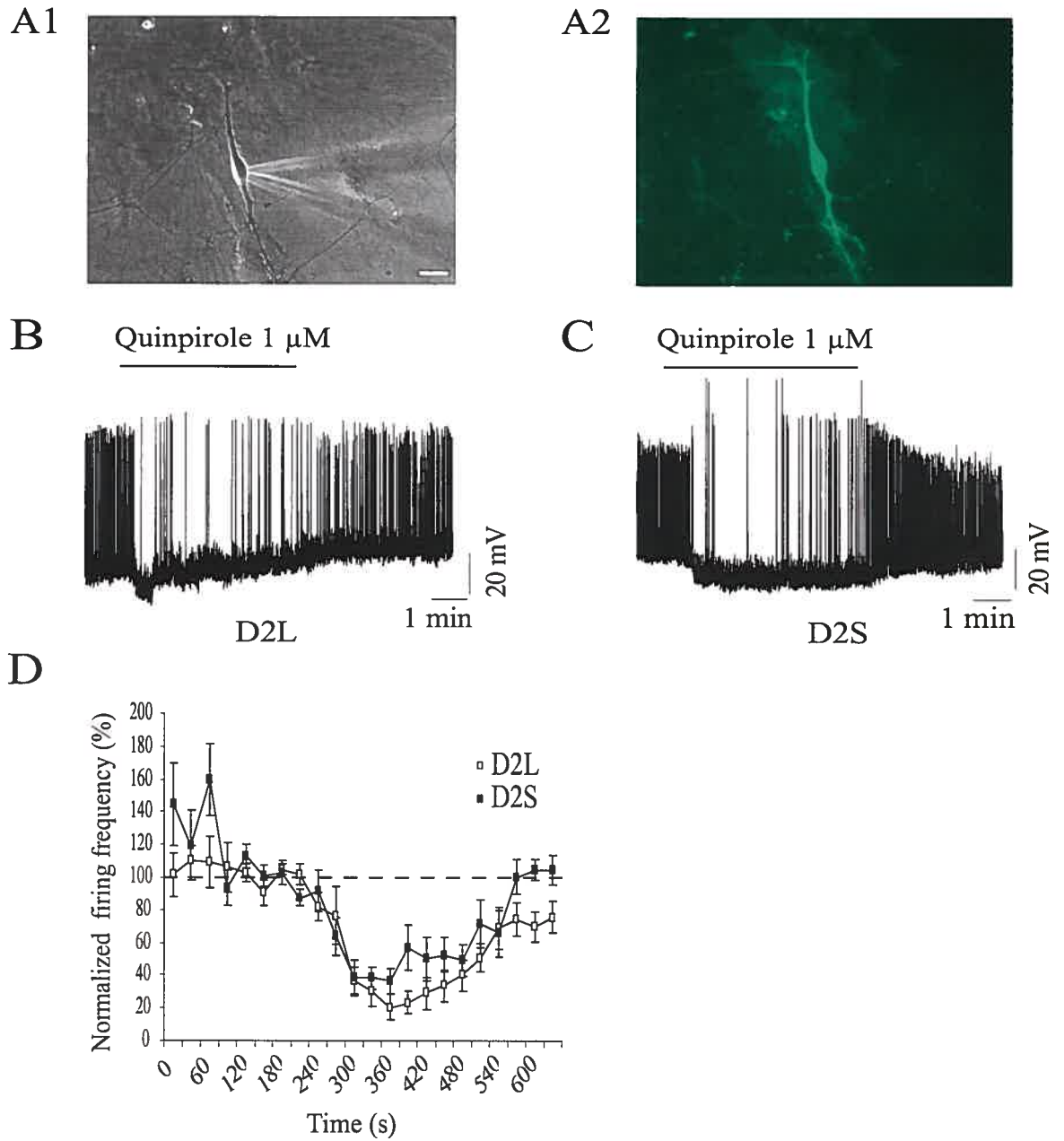


Figure 6.4

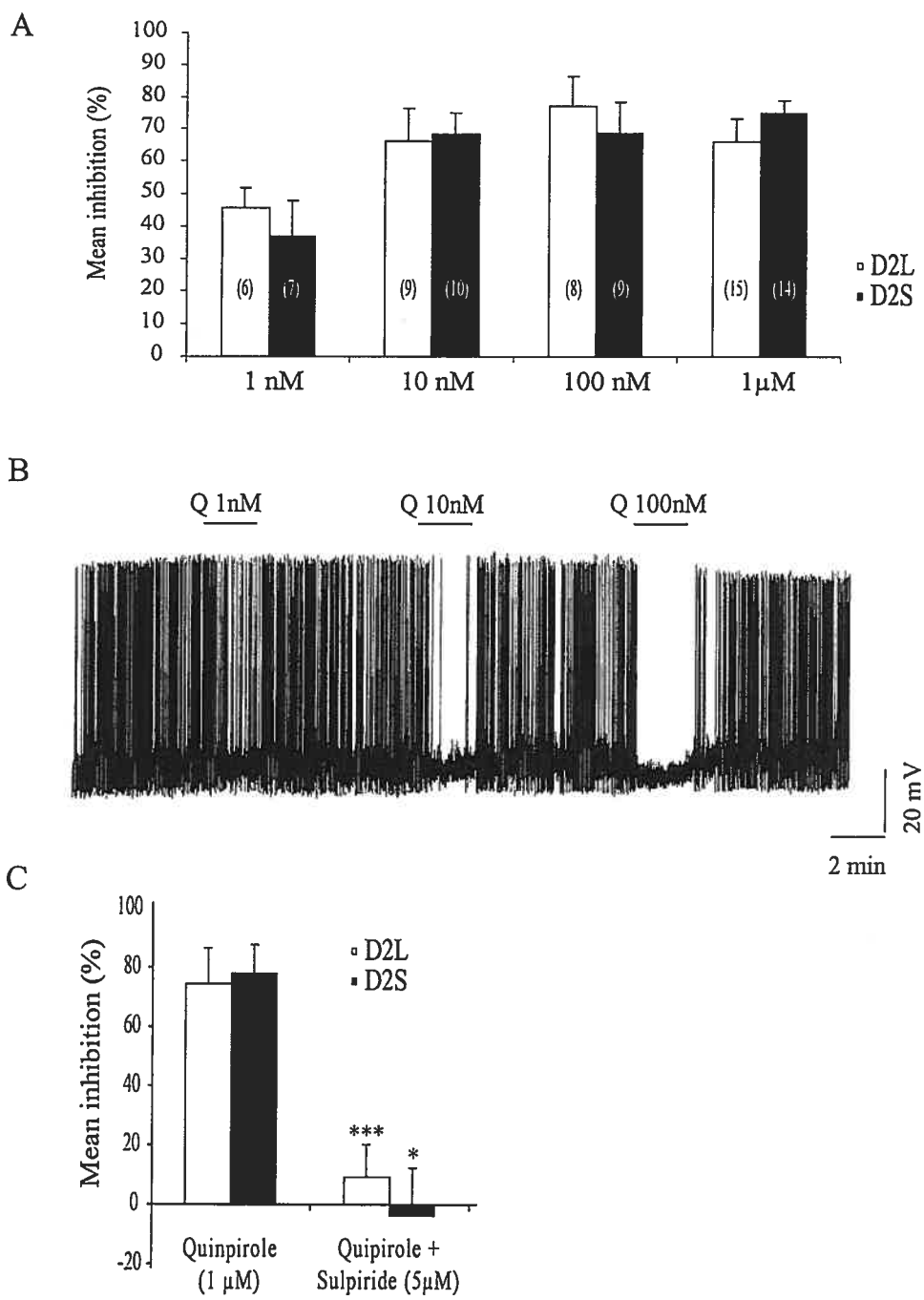


Figure 6.5

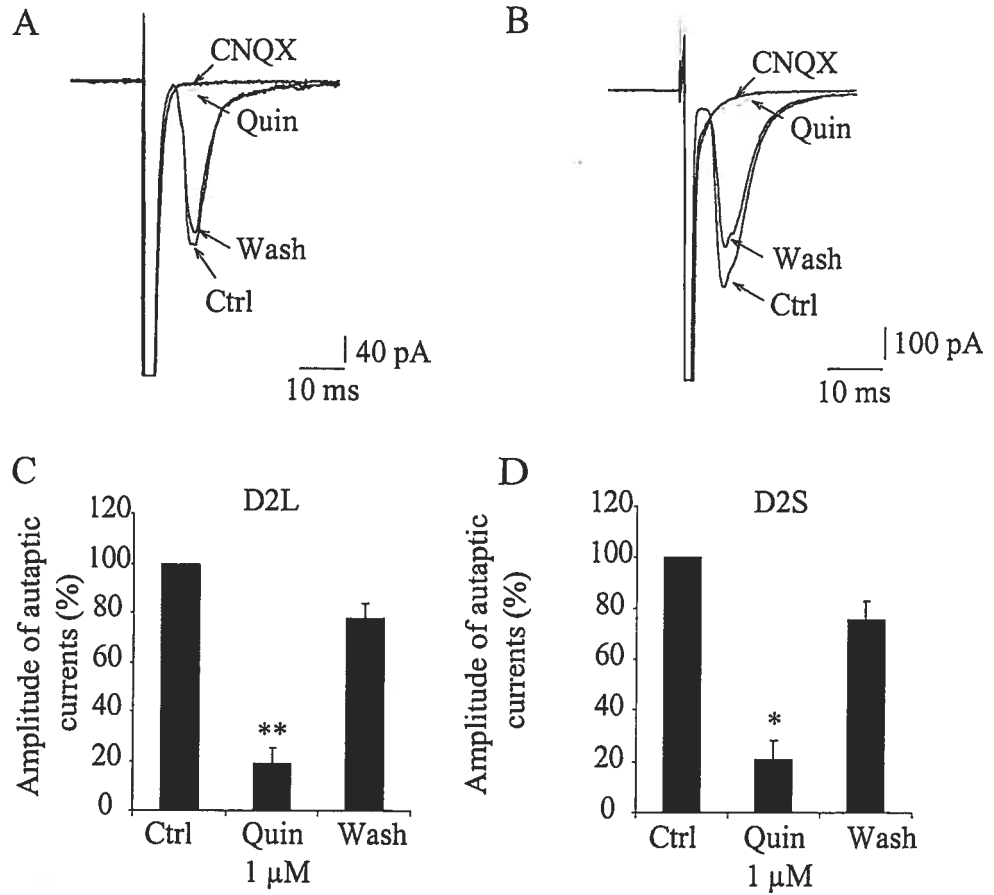


Figure 6.6

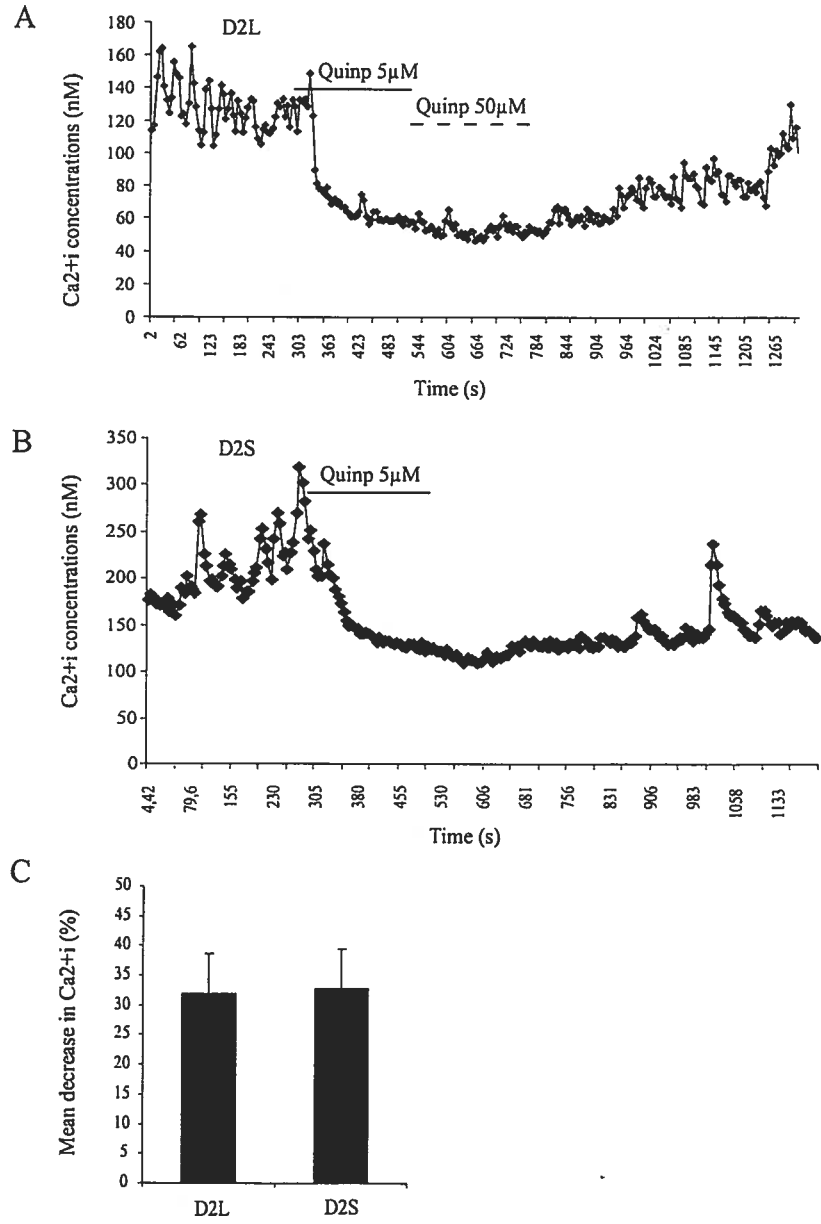


Table 1

	Proportion of neurons showing a EGFP+/MAP2-process (%)	Nb of neurons showing a EGFP+/MAP2-process	Total transfected neurons
EGFP-D2S	36	27	59
EGFP-D2L	45	20	55
EGFP	81	30	37

**CHAPITRE 7 : Use of TH-EGFP transgenic mice as a
source of identified Dopaminergic neurons for
physiological studies in postnatal cellculture.**

USE OF TH-EGFP TRANSGENIC MICE AS A SOURCE OF
IDENTIFIED DOPAMINERGIC NEURONS FOR
PHYSIOLOGICAL STUDIES IN POSTNATAL CELL CULTURE.

Jomphe, C.¹, Bourque, M.-J.¹, Fortin, G.D.¹, St-Gelais, F.¹, Okano, H.², Kobayashi,
K.³ and Trudeau, L.-E.¹

J Neurosci Methods. 2005 Jul 15;146(1):1-12.

¹Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Centre de Recherche en
Sciences Neurologiques, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Department of Physiology, Keio University School of Medicine, Japan

³Department of Molecular Genetics, Fukushima Medical University, Japan.

ABSTRACT

The physiological and pharmacological properties of dopaminergic neurons in the brain are of major interest. Although much has been learned from cell culture studies, the physiological properties of these neurons remain difficult to study in such models because they are usually in minority and are difficult to distinguish from other non-dopaminergic neurons. Here we have taken advantage of a recently engineered transgenic mouse model expressing enhanced green fluorescence protein (Jomphe et al., 2005) under the control of the tyrosine hydroxylase promoter to establish a more effective dopaminergic neuron cell culture model. We first evaluated the specificity of the EGFP expression. Although ectopic expression of EGFP was found, after two weeks in culture, approximately 70 % of EGFP-expressing neurons were confirmed to be dopaminergic. Moreover, when only the brightest EGFP-expressing neurons were considered, ectopic expression was reduced to 10%. We next sought to validate this dopaminergic neuron culture model. We evaluated whether EGFP-expressing dopaminergic neurons displayed some of the well-established properties of dopaminergic neurons. Autoreceptor stimulation inhibited the activity of dopaminergic neurons while neurotensin receptor activation produced the opposite effect. Confocal imaging of the synaptic vesicle optical tracer FM4-64 in EGFP-expressing dopaminergic neurons demonstrated the feasibility of high resolution monitoring of the activity of single terminals established by these neurons. Together, this work provides evidence that primary cultures of postnatal TH-EGFP mice currently represent an excellent model to study the properties of these cells in culture.

Key words: dopamine, culture, fluorescence, patch-clamp, transgenic, green fluorescent protein.

INTRODUCTION

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

Differentiating between living dopaminergic and non-dopaminergic neurons on the basis of morphological features has been evaluated, but in practice this represents a highly

unreliable method (Ort et al., 1988; Masuko et al., 1992). Electrophysiological criteria have also been proposed. For example, recordings made *in vivo* or in brain slice preparations have associated a unique action potential waveform with a duration of more than 2 s to dopaminergic neurons (Grace and Bunney, 1995). Other criteria such as a slow irregular (1-10 Hz) firing rate, a prominent afterhyperpolarization or the presence of an I_h -like hyperpolarization-activated inward current have also been described (Bunney et al., 1991; Johnson and North, 1992). Unfortunately, electrophysiological criteria of this type are highly unreliable in culture models. For instance, the firing pattern of identified dopaminergic neurons in culture was found to be regular (Cardozo, 1993) or silent (Rayport et al., 1992), this being probably due to the absence of the synaptic input that is normally present in the intact brain (Grace and Onn, 1989). Spike duration and the presence of an I_h current also do not allow to distinguish reliably between dopaminergic and non-dopaminergic neurons in culture (Masuko et al., 1992; Rayport et al., 1992; Cardozo, 1993).

To date the most reliable way to identify living dopaminergic neurons involves probing for their selective pharmacological properties (Johnson and North, 1992; Rayport et al., 1992). Unlike mesencephalic GABAergic neurons, dopaminergic neurons express D2-type autoreceptors. Therefore, only the latter respond to D2 agonists with a decrease in their firing rate. Conversely, mesencephalic GABAergic neurons, but not dopaminergic neurons, express somatodendritic μ -opioid receptors that lead to a decrease in firing when activated. Although such pharmacological criteria are as reliable in culture (Congar et al.,

2002; Bergevin et al., 2002) as they are *in vivo* (Lacey et al., 1989), the application of receptor agonists and drug washout considerably lengthens experimental protocols and is not possible in dynamic fluorescence imaging experiments that are not accompanied by electrophysiological recordings.

The development of an alternative approach relying on optical signal would prove most useful. Such an attempt was made with the autofluorescent serotonin analogue, 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) (Silva et al., 1988; Cardozo, 1993; Steensen et al., 1995). This experimental approach was based on the assumption that mesencephalic cultures are devoid of serotonin neurons and on the observation that serotonin derivatives, such as 5,7-DHT can be accumulated by catecholamine neurons through both serotonin and dopamine transporters (Dowling and Ehinger, 1975). However, one of the major disadvantages of this approach is the rapid photobleaching of the 5,7-DHT signal during UV illumination (Cardozo, 1993). More problematic is the fact that this approach has been found to be highly unreliable to identify dopaminergic neurons. Indeed in a recent study, this compound was found to accumulate preferentially in serotonin neurons and not in dopaminergic neurons (Franke et al., 2002). Another more effective strategy is to retrogradely label dopaminergic neurons a few days before tissue dissection by injecting a fluorescent tracer in projection areas such as striatum (Rayport et al., 1992). Although this approach identifies dopaminergic neurons with high fidelity, it only labels a small proportion of dopaminergic neurons and is quite time-consuming.

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

More recently, Sawamoto and co-workers (Sawamoto et al., 2001; Matsushita et al., 2002) developed a new transgenic mouse model allowing direct visualization of midbrain dopaminergic neurons (see also (Chuhma et al., 2004)). Mice were engineered to express enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the control of the TH promoter. The capacity of neurons derived from these mice to survive and differentiate in long-term culture has not yet been examined. The aim of this study was hence to develop a reliable

primary culture model allowing a rapid and direct identification of postnatal dopaminergic neurons. Our first objective was to evaluate the selectivity of EGFP expression in dopaminergic neurons cultured from these mice. Our second objective was to evaluate whether the physiological properties of EGFP-expressing dopaminergic neurons were normal. We find that the majority of EGFP-expressing neurons cultured from the ventral mesencephalon of TH-EGFP mice are dopaminergic neurons and that EGFP-expressing dopaminergic neurons possess the typical physiological properties of dopaminergic neurons.

MATERIALS AND METHODS

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

Cell culture. Primary cultures of mesencephalic neurons from TH-GFP/21-31 transgenic mice were prepared according to recently described protocols (Bourque and Trudeau, 2000; Michel and Trudeau, 2000; Congar et al., 2002) derived from Cardozo (Cardozo, 1993) and Sulzer et al. (Sulzer et al., 1998). Dissociated neurons were plated on mesencephalic astrocytes grown in monolayers on pre-coated glass coverslips.

To prepare mesencephalic astrocyte cultures, TH-EGFP/21-31 mice pups (P0-P2) were cryoanesthetized. Cells from the mesencephalon were enzymatically dissociated using papain (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA) and were grown in culture flasks for 5 to 10 days in Basal Medium Eagle with Earl's Salts (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) supplemented with penicillin/streptomycin, GlutaMAX-1 (Gibco), Mito+ serum extender (VWR Canlab, Montreal, Canada) and 10% Fetal Calf serum (Gibco). A

cold wash with vigorous shaking was used to dislodge neurons and microglial cells after two days in culture. After reaching confluence, astrocytes were trypsinized, washed, collected and plated at 100 000 living cells per milliliter on collagen/poly-L-lysine-coated coverslips. For single neuron microcultures, astrocytes were plated at a concentration of 60 000 living astrocytes per milliliter on poly-L-ornithine/agarose-covered glass coverslips, which had been sprayed with collagen (0.75 mg/ml) micro-droplets (50-150 μ M in diameter). This permitted the establishment of small groups of isolated cells (Segal et al., 1998).

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

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

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

electrophysiological experiments. Here again, a phase contrast image was captured and fluorescent microspheres were used to identify the recorded neuron after fixation and immunocytochemistry.

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

Synaptic (or “autaptic”) responses in single neurons were recorded with the perforated patch-clamp technique (amphotericin B, 150-200 $\mu\text{g/ml}$). Under conditions where dopaminergic neurons grow in isolation in microculture, they establish synaptic contacts on their own dendritic arbor and co-release glutamate together with dopamine. This allows the activity of synaptic terminals to be readily monitored (Sulzer et al., 1998; Bourque and Trudeau, 2000; Congar et al., 2002). During recordings, autaptic responses were evoked every 15s by a brief (1 ms) depolarizing voltage step from a holding potential (V_H) of -50 mV. In dopaminergic neurons, this usually elicited a sodium “action current” followed by a 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX)-sensitive glutamate-mediated inward autaptic EPSC. Input resistance was usually between 300 and 600 $\text{M}\Omega$ and was monitored periodically throughout experiments.

Calcium imaging. Changes in cytosolic intracellular calcium concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were measured with Fura2-AM ratio fluorescence. Briefly, cells were loaded with Fura2-AM by incubating cells grown on 15-mm coverslips in saline containing 5 μM Fura2-AM and 0.02% pluronic acid (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 50-60 min at room temperature. For $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measurements, the coverslip was mounted in a recording chamber that was fixed to the stage of an inverted Nikon Eclipse TE-200 microscope. The coverslip was constantly superfused with physiological saline solution containing in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 HEPES, 10 glucose, 6 sucrose at a pH of 7.35). Imaging of

Fura2-AM was performed using standard epifluorescence imaging through a GenIII+-intensified progressive line scan CCD camera (Stanford Photonics, Palo Alto, CA, USA) and a computer-controlled two-channel fast excitation wavelength switcher (DX-1000, Stanford Photonics). Standard image ratio pairs (340/380 nm) were acquired every 5 s and ratio values were analyzed using Axon Imaging Workbench software 4.0 (Axon Instruments).

Confocal imaging. Cells plated on 25 mm diameter coverslips were placed in an imaging chamber with integrated platinum stimulating electrodes (Warner Instruments, Hamden, USA), and the chamber was connected to a gravity perfusion system on the stage of the microscope. For loading with the vesicle recycling indicator FM4-64 (Molecular Probes), cells were exposed for 2 min to a saline solution containing 5 μ M FM4-64 and 90 mM potassium (which replaced an equimolar concentration of NaCl). The cells were then rinsed for 10 min with saline solution. Images were taken with a point-scanning confocal microscope from Prairie Technologies LLC (Middleton, WI, USA). Excitation was performed with the 488 nm line of an argon ion laser and fluorescence emitted above 550 nm (yellow to orange) was measured. Images were taken every 15 s. After two minutes of recording, electrical field stimulation was applied at 2 Hz for 150 sec or at 10 Hz for 60 sec. Cells were then exposed to high potassium saline to completely release any remaining and releasable FM4-64 from the terminals. Images were analyzed using Metamorph software v4.5 from Universal Imaging Corp (USA).

RESULTS

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

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

We first evaluated the selectivity of EGFP expression in cultured dopaminergic neurons prepared from P0-P2 TH-EGFP mice. Ventral mesencephalic neurons were isolated by microdissection and enzymatically dissociated (Fig. 7.1A, 7.1B). They were then cultured together with mesencephalic astrocytes for periods of 24 h to 15 days. EGFP expression of living cultured neurons was detected by epifluorescence and confirmation of dopaminergic phenotype was obtained by immunocytochemistry using an antibody directed against TH. We observed numerous EGFP-expressing neurons in cultures prepared from

these mice. Some neurons showed very bright EGFP fluorescence while others showed more modest signal. To directly quantify the selectivity of the expression of EGFP in dopaminergic neurons, we selected fields of living neurons where one or more EGFP-expressing neurons could be detected together with EGFP-negative neurons and locally deposited blue fluorescent microspheres so as to be able to localize the same field after immunocytochemistry against TH (Figs. 7.1C, 7.1D, 7.1E). In total, 220 EGFP-expressing neurons were evaluated in this set of experiments. We found that one day after cell plating, 43 ± 7 % of EGFP-expressing neurons were immunoreactive for TH (Fig 7.1F). This proportion gradually increased over time spent in culture, reaching 71 ± 4 % (after 15 days (Fig 7.1F) (Chi-square (3) = 10.225, P= 0.017). These experiments also revealed that a population of TH-immunoreactive neurons did not express EGFP (not shown).

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

Electrophysiological characteristics cannot help identify cultured dopaminergic neurons.

As described previously, dopaminergic neurons *in vivo* or in brain slices can be identified using a number of electrophysiological characteristics (Bunney et al., 1991). For example, in brain slice preparations, the major electrophysiological characteristic that allows discrimination of dopaminergic from non-dopaminergic neurons is the presence of an I_h current induced by hyperpolarizing steps (Lacey et al., 1989; Jiang et al., 1993; Grace and Bunney, 1995). We thus evaluated the presence of an I_h -like current in EGFP-expressing and EGFP-negative neurons in culture. For these experiments, the dopaminergic phenotype of neurons was confirmed by post-recording immunocytochemistry for TH. Although an I_h current could be detected in a minor proportion of neurons, it could not be reliably detected in EGFP-expressing dopaminergic neurons (Fig. 7.2A). A comparison of current-voltage relationships in EGFP-expressing and EGFP-negative neurons confirmed that there was no significant difference in the inward current induced by hyperpolarizing steps between these two populations of neurons (two-way ANOVA, $F(1,24)=1.985$, $p=0.702$). Moreover, there was no difference between EGFP-expressing and EGFP-negative neurons in spike width, evaluated from spikes evoked by a short depolarizing step at hyperpolarized membrane potential (t-test, $p>0.05$) (Fig. 7.2B), nor in spontaneous firing rate (t-test, $p>0.05$) (Fig. 7.2C). Accommodation, evaluated during a prolonged depolarizing step, was also not different between the two types of neurons. Accommodation, defined by a cessation of firing during the 500 ms depolarizing step,

occurred in 2/5 EGFP-expressing dopaminergic neurons and in 2/5 EGFP-negative neurons.

Activation of somatodendritic dopamine D2 receptors inhibits firing rate.

To validate the use of cultures prepared from TH-EGFP mice, we evaluated whether dopaminergic neurons in these cultures possess some of the well-known physiological and pharmacological properties of dopaminergic neurons. We first evaluated the ability of a D2 receptor agonist to activate D2-like receptors and inhibit the firing rate of cultured dopaminergic neurons. Whole-cell patch-clamp recordings were obtained from EGFP-expressing dopaminergic neurons, identified by epifluorescence prior to recording and by post-recording immunocytochemistry against TH. As expected, quinpirole (1 μ M), a D2 receptor selective agonist, significantly reduced spontaneous firing rate ($51 \pm 11\%$ inhibition; $n=7$, t-test, $p = 0.002$) in comparison to the mean frequency observed in the baseline period (Figs. 7.3A, 7.3B, 7.3C). These results show that cultured dopaminergic neurons prepared from TH-EGFP mice possess functional somatodendritic D2 autoreceptors.

Terminal D2 receptors inhibit neurotransmitter release in dopaminergic neurons.

D2 autoreceptors are also located on the axon terminals of dopaminergic neurons. To evaluate the function of such receptors in cultured EGFP-expressing dopaminergic

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

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

To extend our physiological profiling of EGFP-expressing cultured dopaminergic neurons, we evaluated the effect of the peptide neurotensin on the firing rate of these

neurons. The excitatory effect of this tridecapeptide on dopaminergic neurons is well established (Pinnock, 1985; Seutin et al., 1989; Legault et al., 2002; St-Gelais et al., 2004). The effect of the active fragment of neurotensin (NT(8-13)) on neuronal excitability was evaluated by whole-cell current-clamp recordings. Similarly to the response previously described in cultured rat dopaminergic neurons (St-Gelais et al., 2004), cultured dopaminergic neurons from TH-EGFP mice showed a significant increase in their firing rate in response to 100 nM NT(8-13) ($115.6 \pm 37.7\%$; $n=8$, t-test, $p = 0.01$) (Fig. 7.5). Intracellular calcium imaging experiments with Fura-2 showed that NT(8-13) (100 nM) also caused a significant increase in intracellular calcium concentration in cultured dopaminergic neurons ($n=12$, Student's paired t-test, $p < 0.001$) (Fig. 7.6). This response was quantitatively similar to what was previously shown in cultured dopaminergic neurons from rat (St-Gelais et al., 2004).

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

The ability to culture dopaminergic neurons and to identify them using EGFP fluorescence will facilitate investigations of the function of the axon terminals established by these neurons. For instance, the synaptic vesicle cycle can be studied optically using fluorescent styryl dyes that act as activity-dependent indicators of endocytosis and exocytosis (Betz et al., 1996; Aravanis et al., 2003). To establish the feasibility of such

experiments, we evaluated the use of the styryl dye FM4-64 in EGFP-expressing single dopaminergic neurons in microisland cultures. Because this molecule emits at wavelengths above 550 nm (Wang and Zucker, 1998), measurements of its fluorescence emission should be possible without interference from EGFP, thus allowing us to study the exocytotic kinetics of dopaminergic terminals.

Axon terminals were first loaded by depolarizing cells with saline containing 90 mM K^+ together with 5 μ M FM4-64. After thoroughly rinsing the non-sequestered FM4-64, action potentials were evoked by electrical field stimulation at either 2 Hz for 150 sec (300 pulses) or at 10 Hz for 60 sec (600 pulses). Neurons were then exposed to high K^+ saline to release any remaining and releasable FM4-64 from the terminals. Figure 7.7 shows the characteristic dotted or punctate appearance of the fluorescent signal (Fig. 7.7A, 7.7B), which has been attributed to the varicose nature of axonal terminals, where the dye accumulates within small vesicles (Everett et al., 2002). The two stimulation protocols elicited release along different kinetics and, as expected, exocytosis occurred at a faster rate at the higher stimulation frequency (Fig. 7.7C). Together these data demonstrate the feasibility of using FM4-64 to image synaptic vesicle cycling in single EGFP-expressing dopaminergic neurons.

DISCUSSION

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

In several previous studies, discrimination between dopaminergic and non-dopaminergic neurons was performed on the basis of a number of electrophysiological characteristics. This electrophysiological signature included a broad action potential, a slow irregular (1-10 Hz) firing rate, a prominent afterhyperpolarization and the presence of an I_h -like hyperpolarization-activated inward current (Bunney et al., 1991). However, consistent with previous findings (Masuko et al., 1992; Rayport et al., 1992), we show here that such properties cannot adequately identify dopaminergic neurons in culture. Indeed, we found

that contrarily to the situation *in vivo*, these properties are variably expressed both in dopaminergic and non-dopaminergic mesencephalic neurons in culture. The reason for this difference is unclear but the absence of appropriate synaptic inputs or some regulatory signals under culture conditions could readily influence the level of expression of ionic channels that mediate I_h or influence cellular excitability. An alternate explanation could be that a proportion of dopaminergic neurons express very low levels of TH and are thus mistakenly identified as non-dopaminergic, thus masking any differences between dopaminergic and non-dopaminergic neurons. This possibility cannot be rejected off hand, but TH immunoreactivity is very efficient and even low level expression is readily detected, making it unlikely that a significant proportion of dopaminergic neurons were misclassified.

Dopaminergic neurons also display a unique pharmacological signature (Lacey et al., 1989). This includes (1) inhibitory response to a D2 autoreceptor agonist, (2) excitatory response to neurotensin and (3) lack of response to a μ -opioid receptor agonist (not shown). We find that similar to the *in vivo* situation, this pattern is found in cultured TH-EGFP dopaminergic neurons. Expression of EGFP therefore visibly does not interfere with the major signalling pathways activated by D2 and neurotensin receptors. In the present set of experiments, we have not re-investigated the responsiveness of mesencephalic GABA neurons to μ -opioid receptor agonists. However, in a recent study we have confirmed that cultured rat mesencephalic GABA neurons indeed continue to express this receptor (Bergevin et al., 2002). Although the pharmacological signature is a reliable strategy to

identify dopaminergic neurons in culture, it is a time-consuming approach and it is incompatible with dynamic fluorescence imaging experiments that are not accompanied by electrophysiological recordings.

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

Although we believe that using TH-EGFP mice is currently the most advantageous strategy to identify living dopaminergic neurons in culture, this model is not without its shortcomings. First, although the vast majority of EGFP-expressing neurons were confirmed to be *bona fide* dopaminergic neurons, ectopic expression of EGFP was detected in a small proportion of non-dopaminergic neurons. Fortunately, we found that ectopic expression does not represent a significant problem unless one wishes to study acutely dissociated dopaminergic neurons from neonatal mice. This limited ectopic expression of EGFP has also been reported *in vivo* in these mice (Matsushita et al., 2002) and is likely to result from the absence of some regulatory elements in the TH promoter that was used to prepare the mice. However, the level of ectopic expression reported by this group (8%) is significantly lower than the level that we have estimated here (29% after two weeks in

culture). This apparent discrepancy is likely to be due to methodological considerations. Indeed, Matsushita and co-workers examined EGFP-expression by dopaminergic neurons in fixed brain section. This is likely to have somewhat underestimated the level of ectopic EGFP expression since tissue fixation usually attenuates the brightness of EGFP fluorescence. To avoid this limitation, we counted live EGFP positive neurons and re-localized them after TH immunocytochemistry, an approach that would not be easy to implement in tissue sections. In support of this interpretation, we found that ectopic expression was only 10% when only the bright EGFP neurons were considered in patch-clamp experiments. This selectivity of EGFP expression in dopaminergic neurons is practically the same as that determined by Matsushita and colleagues (2001) and is low enough to insure that most EGFP-expressing neurons selected in physiological experiments will be dopaminergic.

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

EGFP mice currently represent an excellent model to study the properties of these cells in culture.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- Aravanis, A. M., Pyle, J. L., Harata, N. C., and Tsien, R. W. Imaging single synaptic vesicles undergoing repeated fusion events: kissing, running, and kissing again. *Neuropharmacology* 45(6), 797-813. 2003.
- Bergevin, A., Girardot, D., Bourque, M. J., and Trudeau, L. E. Presynaptic mu-opioid receptors regulate a late step of the secretory process in rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *Neuropharmacology* 42(8), 1065-78. 2002.
- Betz, W. J., Mao, F., and Smith, C. B. Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 6(3), 365-71. 1996.
- Bourque, M. J. and Trudeau, L. E. GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. *Eur J Neurosci* 12(Jarvie et al., 1988), 3172-80. 2000.
- Bunney, B. S., Chiodo, L. A., and Grace, A. A. Midbrain dopamine system electrophysiological functioning: a review and new hypothesis. *Synapse* 9(2), 79-94. 1991.
- Cardozo, D. L. Midbrain dopaminergic neurons from postnatal rat in long-term primary culture. *Neuroscience* 56(2), 409-21. 93.
- Chuhma, N., Zhang, H., Masson, J., Zhuang, X., Sulzer, D., Hen, R., and Rayport, S. Dopamine neurons mediate a fast excitatory signal via their glutamatergic synapses. *J Neurosci* 24(4), 972-81. 2004.
- Congar, P., Bergevin, A., and Trudeau, L. E. D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K⁺ channels. *J Neurophysiol* 87(2), 1046-56. 2002.
- Contini, M. and Raviola, E. GABAergic synapses made by a retinal dopaminergic neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(3), 1358-63. 2003.

di Porzio, U., Rougon, G., Novotny, E. A., and Barker, J. L. Dopaminergic neurons from embryonic mouse mesencephalon are enriched in culture through immunoreaction with monoclonal antibody to neural specific protein 4 and flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(20), 7334-8. 1987.

Dowling, J. E. and Ehinger, B. Synaptic organization of the amine-containing interplexiform cells of the goldfish and Cebus monkey retinas. *Science* 188(4185), 270-3. 1975.

Everett, A. W., Edwards, S. J., and Etherington, S. J. Structural basis for the spotted appearance of amphibian neuromuscular junctions stained for synaptic vesicles. *J Neurocytol* 31(1), 15-25. 2002.

Feigenspan, A., Gustincich, S., Bean, B. P., and Raviola, E. Spontaneous activity of solitary dopaminergic cells of the retina. *J Neurosci* 18(17), 6776-89. 1998.

Feigenspan, A., Gustincich, S., and Raviola, E. Pharmacology of GABA(A) receptors of retinal dopaminergic neurons. *J Neurophysiol* 84(4), 1697-707. 2000.

Franke, H., Grosche, J., Illes, P., and Allgaier, C. 5,7-Dihydroxytryptamine--a selective marker of dopaminergic or serotonergic neurons? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366(4), 315-8. 2002.

Grace, A. A and Bunney, B. S. Electrophysiological properties of midbrain dopamine neurons. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. 163-177. 1995. New York, Floyd E. Bloom and David J. Kupfer.

Grace, A. A. and Onn, S. P. Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci* 9 (10), 3463-81. 1989.

- Gustincich, S., Feigenspan, A., Sieghart, W., and Raviola, E. Composition of the GABA(A) receptors of retinal dopaminergic neurons. *J Neurosci* 19(18), 7812-22. 1999.
- Gustincich, S., Feigenspan, A., Wu, D. K., Koopman, L. J., and Raviola, E. Control of dopamine release in the retina: a transgenic approach to neural networks. *Neuron* 18(5), 723-36. 1997.
- Heyer, E. J. Electrophysiological study of mammalian neurons from ventral mesencephalon grown in primary dissociated cell culture. *Brain Res* 310(1), 142-8. 1984.
- Jiang, Z. G., Pessia, M., and North, R. A. Dopamine and baclofen inhibit the hyperpolarization-activated cation current in rat ventral tegmental neurones. *J Physiol* 462, 753-64. 1993.
- Johnson, S. W. and North, R. A. Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol* 450, 455-68. 1992.
- Lacey, M. G., Mercuri, N. B., and North, R. A. Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids. *J Neurosci* 9(4), 1233-41. 1989.
- Legault, M., Congar, P., Michel, F. J., and Trudeau, L. E. Presynaptic action of neurotensin on cultured ventral tegmental area dopaminergic neurones. *Neuroscience* 111(1), 177-87. 2002.
- Masuko, S., Nakajima, S., and Nakajima, Y. Dissociated high-purity dopaminergic neuron cultures from the substantia nigra and the ventral tegmental area of the postnatal rat. *Neuroscience* 49(2), 347-64. 1992.
- Matsushita, N., Okada, H., Yasoshima, Y., Takahashi, K., Kiuchi, K., and Kobayashi, K. Dynamics of tyrosine hydroxylase promoter activity during midbrain dopaminergic neuron development. *J Neurochem* 82(2), 295-304. 2002.

Michel, F. J. and Trudeau, L. E. Clozapine inhibits synaptic transmission at GABAergic synapses established by ventral tegmental area neurones in culture. *Neuropharmacology* 39(9), 1536-43. 2000.

Mundorf, M. L., Joseph, J. D., Austin, C. M., Caron, M. G., and Wightman, R. M. Catecholamine release and uptake in the mouse prefrontal cortex. *J Neurochem* 79(1), 130-42. 2001.

Ort, C. A., Futamachi, K. J., and Peacock, J. H. Morphology and electrophysiology of ventral mesencephalon nerve cell cultures. *Brain Res* 467(2), 205-15. 1988.

Pinnock, R. D. Neurotensin depolarizes substantia nigra dopamine neurones. *Brain Res* 338(1), 151-4. 1985.

Puopolo, M., Hochstetler, S. E., Gustincich, S., Wightman, R. M., and Raviola, E. Extrasynaptic release of dopamine in a retinal neuron: activity dependence and transmitter modulation. *Neuron* 30(1), 211-25. 2001.

Rayport, S., Sulzer, D., Shi, W. X., Sawasdikosol, S., Monaco, J., Batson, D., and Rajendran, G. Identified postnatal mesolimbic dopamine neurons in culture: morphology and electrophysiology. *J Neurosci* 12(11), 4264-80. 1992.

Sawamoto, K., Nakao, N., Kobayashi, K., Matsushita, N., Takahashi, H., Kakishita, K., Yamamoto, A., Yoshizaki, T., Terashima, T., Murakami, F., Itakura, T., and Okano, H. Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11), 6423-8. 2001.

Segal MM, Baughman RW, Jones KA, Huettner JE. Mass Cultures and Microislands of Neurons from Postnatal Rat Brain. In Banker G, Goslin K, editors. *Culturing nerve cells*. MIT Press: Cambridge, 1998; 309-338.

Seutin, V., Massotte, L., and Dresse, A. Electrophysiological effects of neurotensin on dopaminergic neurones of the ventral tegmental area of the rat in vitro. *Neuropharmacology* 28(9), 949-54. 1989.

Shimoda K, Sauve Y, Marini A, Schwartz JP, Commissiong JW. A high percentage yield of tyrosine hydroxylase-positive cells from rat E14 mesencephalic cell culture. *Brain Res*, 1992; 586: 319-31.

Silva, N. L., Mariani, A. P., Harrison, N. L., and Barker, J. L. 5,7-Dihydroxytryptamine identifies living dopaminergic neurons in mesencephalic cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(19), 7346-50. 1988.

St-Gelais, F., Legault, M., Bourque, M. J., Rompre, P. P., and Trudeau, L. E. Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* 24(10), 2566-74. 2004.

Steensen, B. H., Nedergaard, S., Ostergaard, K., and Lambert, J. D. Electrophysiological characterization of dopaminergic and non-dopaminergic neurones in organotypic slice cultures of the rat ventral mesencephalon. *Exp Brain Res* 106(2), 205-14. 95.

Sulzer, D., Joyce, M. P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S. N., Hattori, T., and Rayport, S. Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* 18(12), 4588-602. 1998.

Wang, C. and Zucker, R. S. Regulation of synaptic vesicle recycling by calcium and serotonin. *Neuron* 21(1), 155-67. 1998.

FIGURE LEGENDS

Figure 7.1 Selectivity of EGFP expression in dopaminergic neurons increases over time in culture.

(*A, B*). Living acutely dissociated neurons from the mesencephalon of TH-EGFP mice in phase contrast (*A*) and during epifluorescence (*B*). The white arrows identify three neurons that were EGFP-positive. (*C to E*) Live cultured neurons from the mesencephalon of EGFP-TH mice in phase contrast (*C*), during epifluorescence (*D*) and after fixation and post-hoc immunocytochemistry against TH (*E*). The white arrows identify two EGFP-positive neurons that were also TH-immunopositive. Note the presence of blue fluorescent microspheres that were used to localize neurons after immunocytochemistry. Ectopic expression of EGFP was found in a variable, but minor proportion of neurons. (*F*) Summary graph showing the selectivity of EGFP expression in dopaminergic neurons over time in culture (1-15 days *in vitro*; div). The proportion of EGFP expressing neurons that was immunoreactive for TH increases over time in culture. Chi-square (3) =10.225, P=0.017.

Figure 7.2 Electrophysiological characteristics cannot help to discriminate dopaminergic neurons in culture.

(A) I-V relation of neurons expressing EGFP (n=5, circles) and of other neurons not expressing EGFP (n=5, black squares). The hyperpolarizing stimulation protocol and representative responses are shown to the left. (B) Action potential width of dopaminergic (EGFP+/TH+) and non-dopaminergic (EGFP-/TH-) neurons induced by a short depolarizing step. A typical action potential recorded from an EGFP+ neuron is shown to the left. (C) Spontaneous firing rate of dopaminergic and non-dopaminergic neurons. A typical firing rate pattern recorded from an EGFP+ neuron is shown to the left. Neurons expressing EGFP were confirmed to be dopaminergic by post-recording immunolabelling with an anti-TH antibody.

Figure 7.3 Activation of somatodendritic dopamine D2 receptors inhibits firing rate.

(A) Patch-clamp recording of spontaneous action potentials in an EGFP-expressing dopaminergic neuron. Quinpirole (1 μ M) caused a strong reduction in firing rate. (B) Time-course of quinpirole's effect on firing rate (n=7). Firing rate was measured as the number of action potentials per 10 s bins and expressed as percent of control. (C) Summary graph of the effect of quinpirole on firing frequency in EGFP-expressing dopaminergic neurons (n=7). The magnitude of the response to quinpirole was measured for 1 min at the

maximum and normalized to that observed during the baseline period. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$

Figure 7.4 Terminal D2 receptors inhibit neurotransmitter release in dopaminergic neurons.

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

Figure 7.5 Dopaminergic neurons show an increased firing rate in response to neurotensin.

(A) Patch-clamp recording of spontaneous action potentials in a EGFP-expressing dopaminergic neuron. NT(8-13) (100 nM) produced an increase in firing rate. (B) Time-

course of the response to NT(8-13) on dopaminergic neurons firing rate (n=8). (C) Summary graph showing the average enhancement in firing rate caused by NT(8-13) (100 nM) (n=8). The magnitude of response to NT(8-13) was measured for 1 min at the maximum and normalized to that observed during the baseline period. Data are expressed as means \pm SEM. * $p \leq 0.05$

Figure 7.6 Neurotensine induces an increase in intracellular calcium in dopaminergic neurons.

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

Figure 7.7 FM4-64 allows the study of neurotransmitter release kinetics in dopaminergic neurons.

(A) Cells exposed to FM4-64 and 90 mM potassium for 2 min and subsequently rinsed for 10 min in physiological saline display a dotted fluorescent signal. This signal represents internalized FM4-64 in presumed axon terminals. (B) Enlargement of A showing the FM4-64 signal before and after stimulation with 40 mM potassium. (C) Confocal imaging of FM4-64 showing the release kinetics upon electrical stimulation at 2 Hz for 150 s (300 pulses) and 10 Hz for 60 s (600 pulses). Images are taken every 15 s and data are expressed relative to the first 2 minutes of the control period. Bars represent the mean \pm SEM (n=5 cells for 2 Hz; n=4 cells for 10 Hz).

Figure 7.1

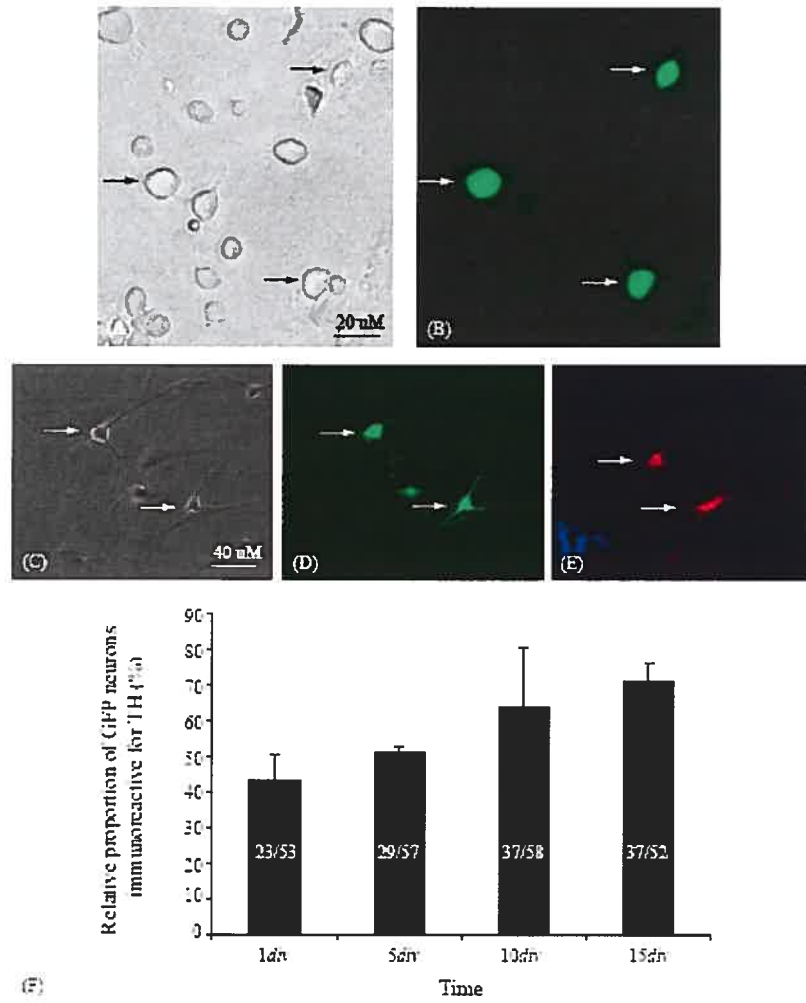


Figure 7.2

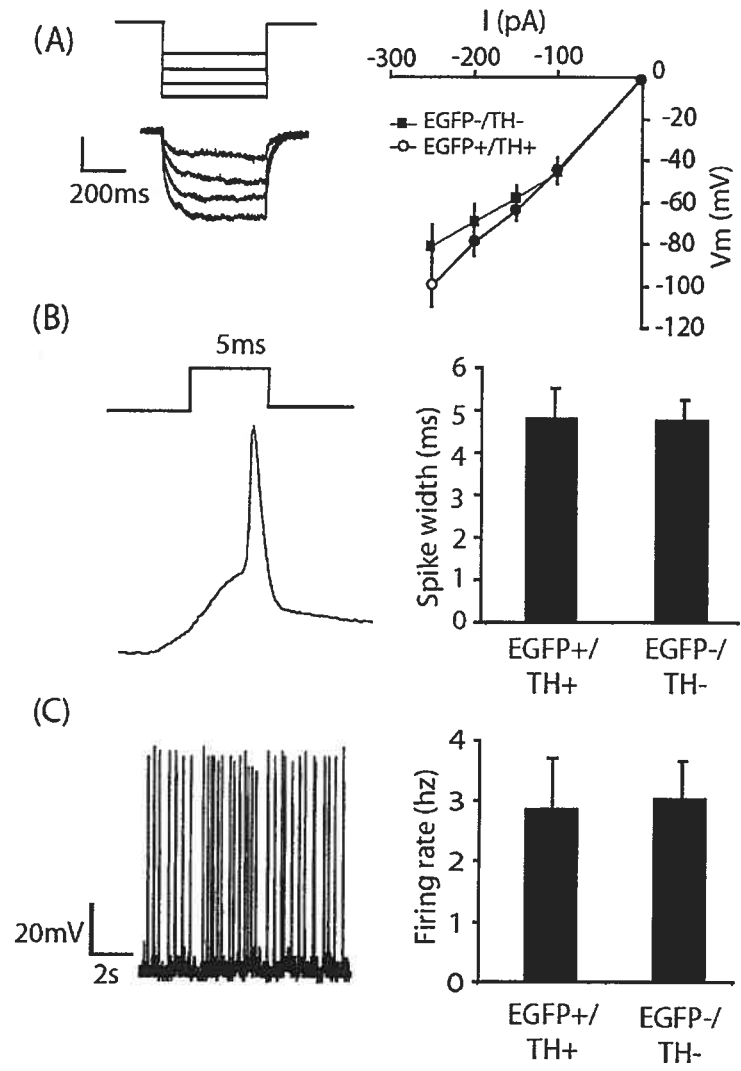


Figure 7.3

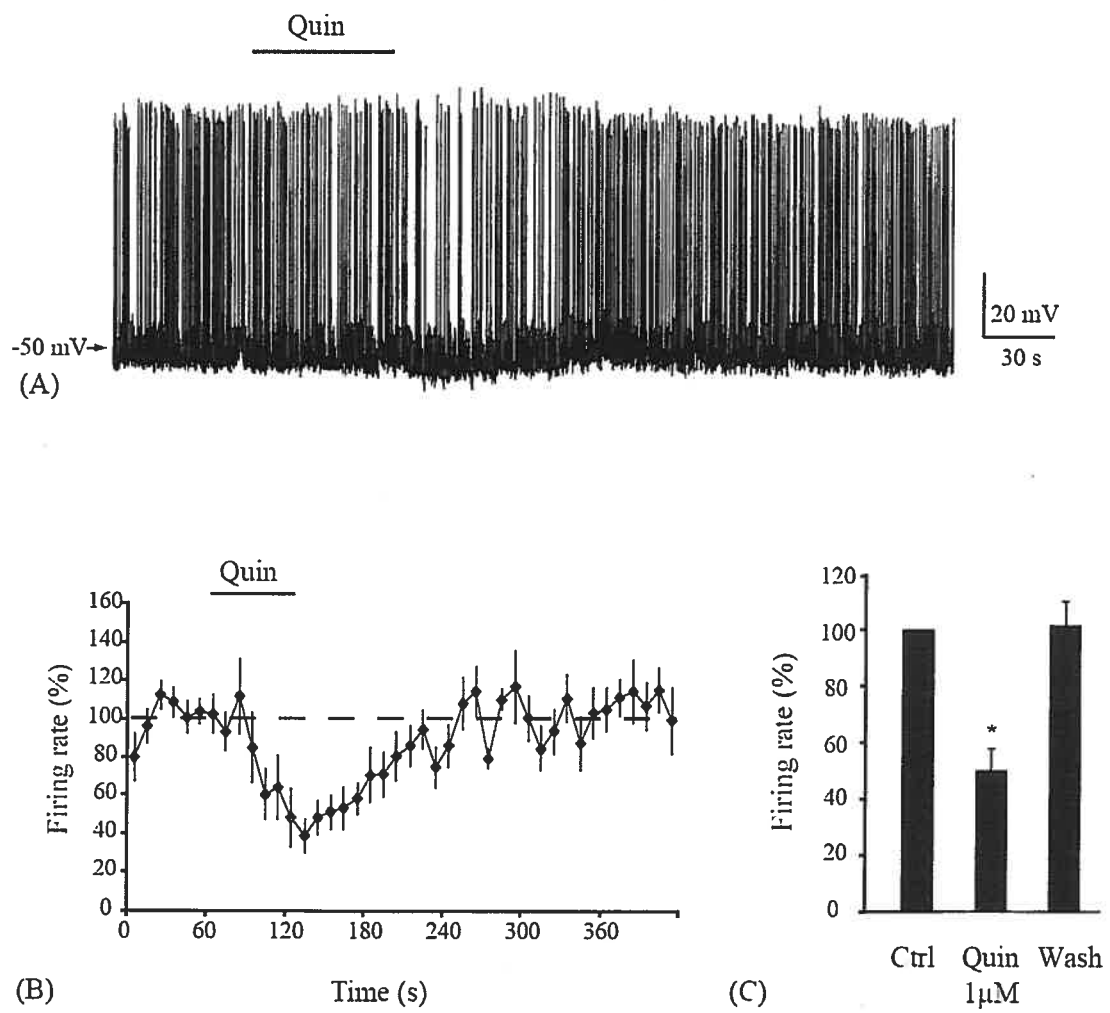


Figure 7.4

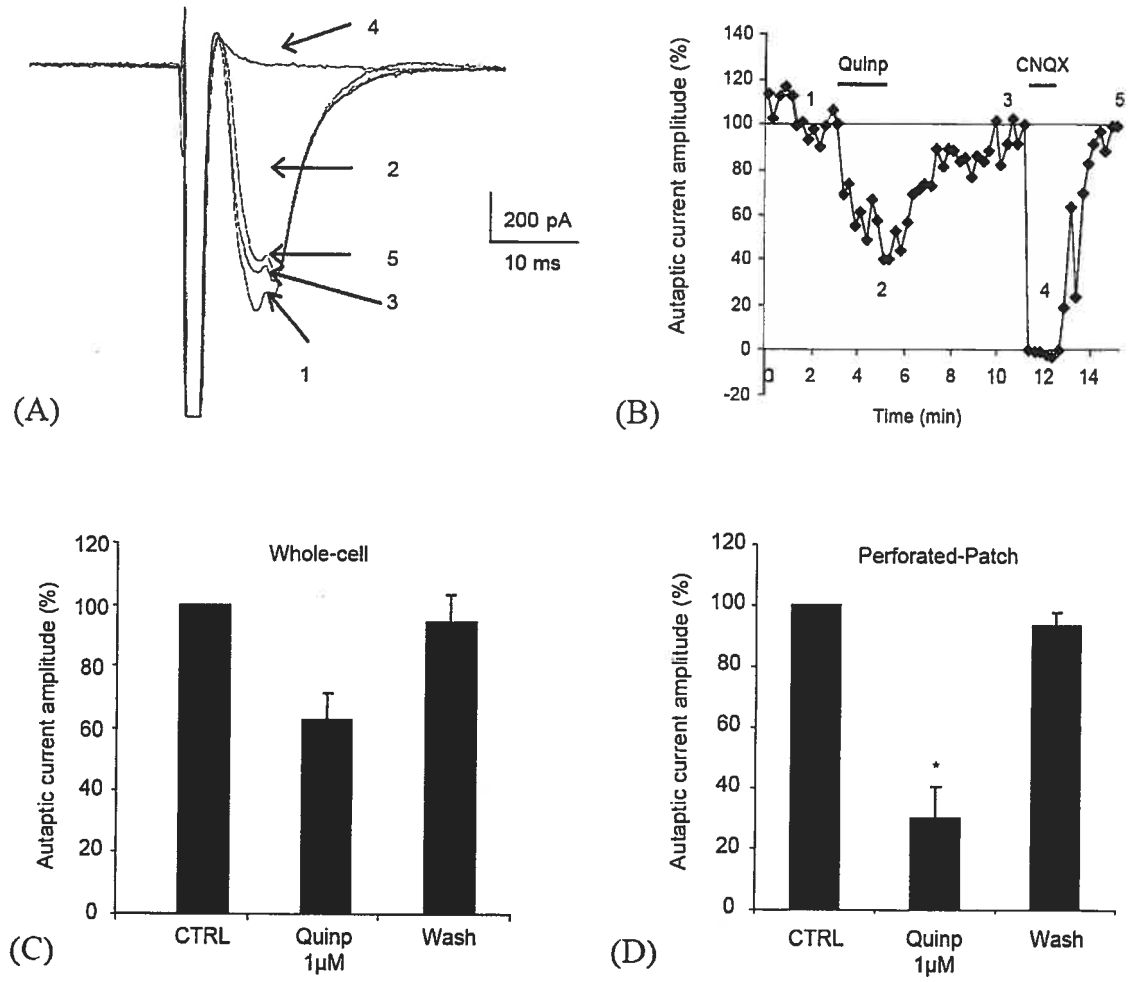


Figure 7.5

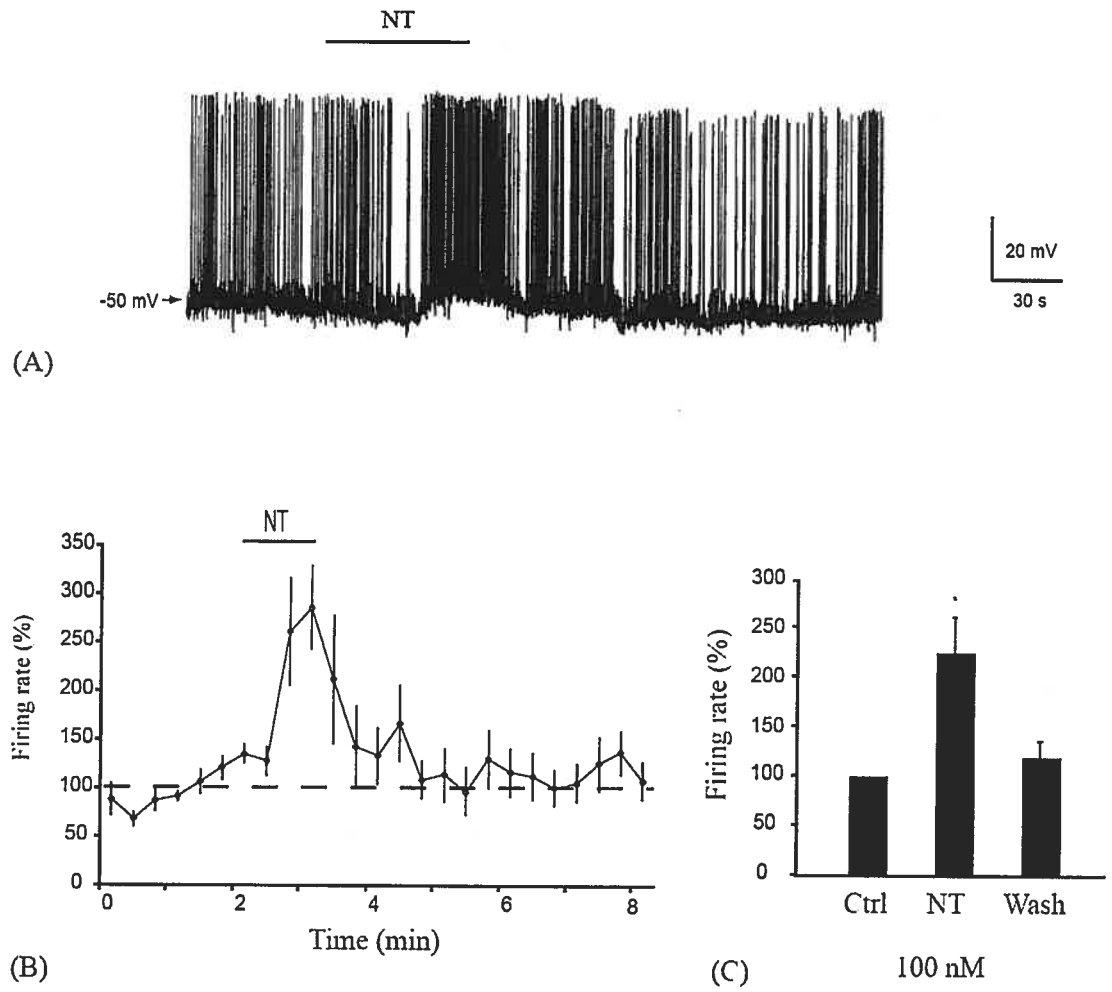
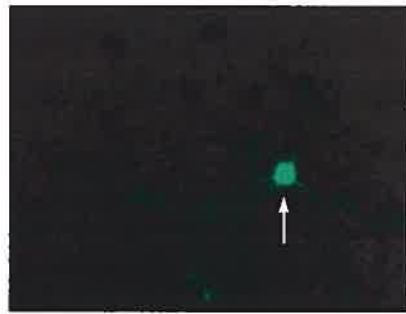


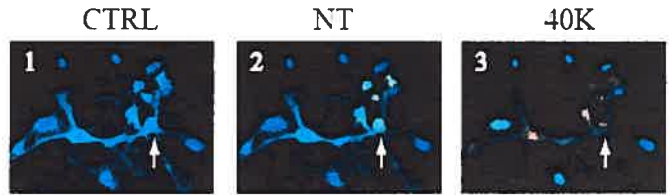
Figure 7.6



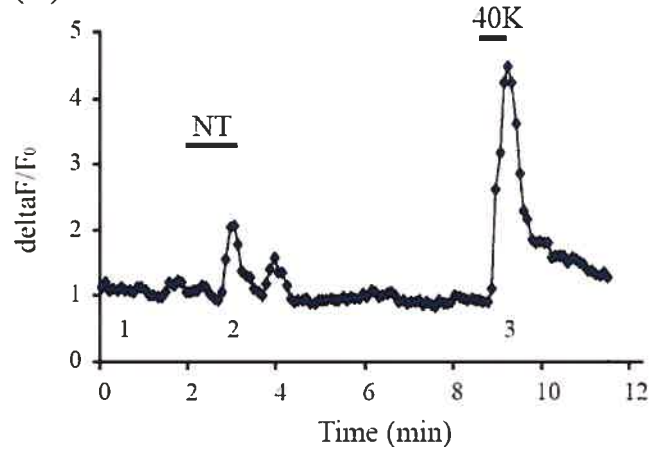
(A)



(B)

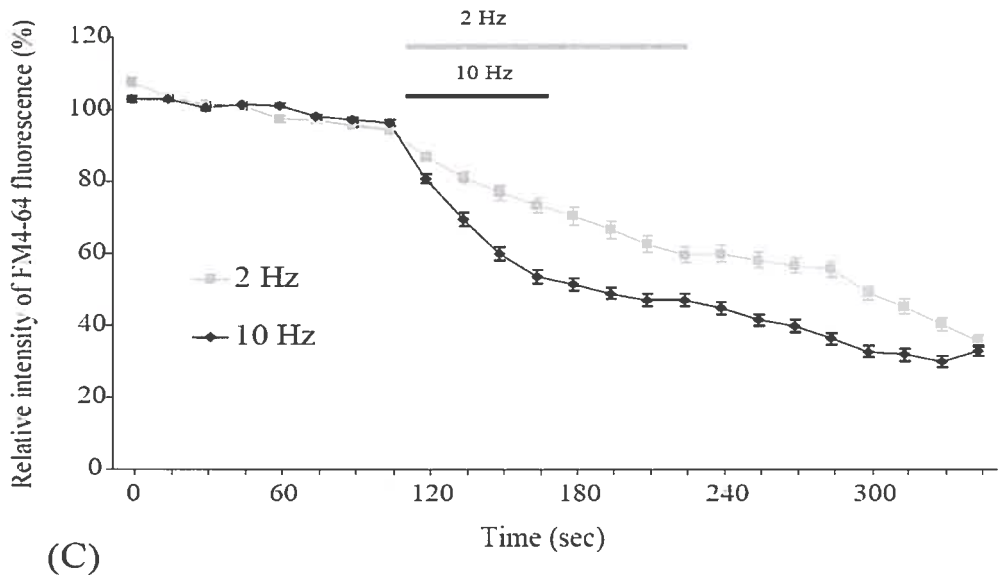
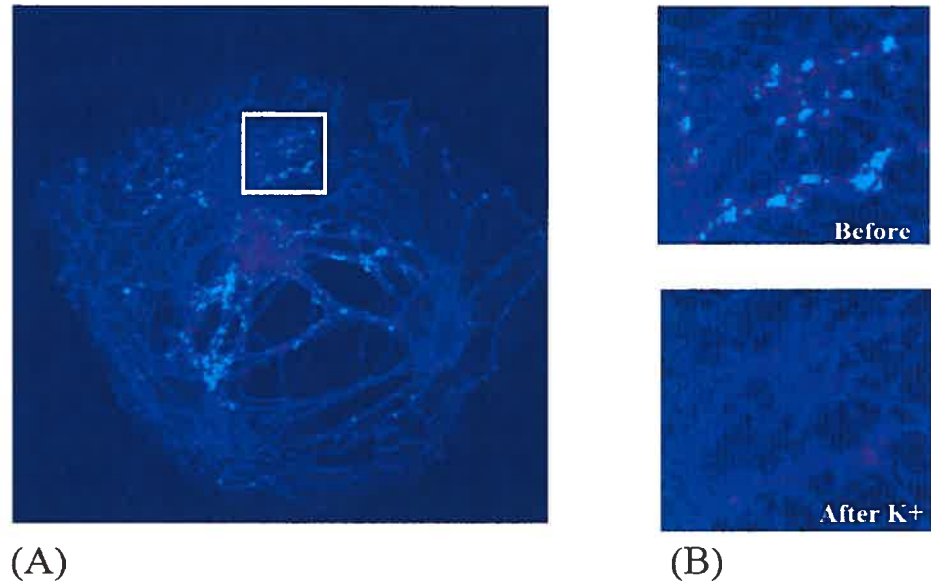


(B)



(C)

Figure 7.7



**CHAPITRE 8 : Bidirectional regulation of dopamine D2
and neurotensin NTS1 receptors in dopamine neurons**

BIDIRECTIONAL REGULATION OF DOPAMINE D2 AND NEUROTENSIN NTS1 RECEPTORS IN DOPAMINE NEURONS

Jomphe, C.¹, Lemelin, P.-L.¹, Okano, H.², Kobayashi, K.³ and Trudeau, L.-E.¹

European Journal of Neuroscience (sous presse)

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Groupe de Recherche sur le
Système Nerveux Central, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Department of Physiology, Kieo University School of Medicine, Japan

³Department of Molecular Genetics, Fukushima Medical University, Japan

ABSTRACT

Several lines of evidence suggest a close association between dopamine (DA) and neurotensin (NT) systems in the CNS. Indeed, in the rodent brain, abundant NT-containing fibres are found in DA-rich areas such as the ventral tegmental area and substantia nigra. Moreover, it has been shown *in vivo* that NT, acting through its high affinity receptor (NTS1), reduces the physiological and behavioural effects of DA D2 receptor (D2R) activation, a critical autoreceptor feedback system regulating DA neurotransmission. However, the mechanism of this interaction is still elusive. The aim of our study was thus to reproduce *in vitro* the interaction between D2R and NTS1 and then to characterize the mechanisms implicated. We used a primary culture model of DA neurons prepared from transgenic mice expressing green fluorescent protein (EGFP) under the control of the tyrosine hydroxylase promoter. In these cultures, DA neurons endogenously express both D2R and NTS1. Using electrophysiological recordings, we show that activation of D2R directly inhibits the firing rate of DA neurons. In addition, we find that NT, acting through a NTS1-like receptor, is able to reduce D2R autoreceptor function independently of its ability to enhance DA neuron firing, and that this interaction occurs through a PKC- and Ca²⁺-dependent mechanism. Furthermore, prior activation of D2R reduces the ability of NTS1 to induce intracellular Ca²⁺ mobilization. Our findings provide evidence for bidirectional interaction between D2R and NTS1 in DA neurons, a regulatory mechanism that could play a key role in control of the activity of these neurons.

INTRODUCTION

Neurotensin (NT) is an endogenous tridecapeptide that is widely distributed throughout the mammalian CNS (Fassio et al, 2000). In the rodent brain, a high density of NT-immunoreactive fibers innervates dopamine (DA)-rich areas such as the ventral tegmental area (VTA) and substantia nigra (SN) (Uhl et al, 1977; Jennes et al, 1982; Quirion, 1983; Binder et al, 2001; Zahm et al, 2001). Furthermore, NT receptors, predominantly the type 1 high-affinity receptor (NTS1), are expressed in SN and VTA DA neurons (Palacios & Kuhar, 1981; Uhl, 1982; Quirion et al, 1985; Moyses et al, 1987; Brouard et al, 1992; Nicot et al, 1995; Fassio et al, 2000). NT acting on NTS1 receptors has an excitatory effect on midbrain DA neurons (Pinnock, 1985; Seutin et al, 1989; Mercuri et al, 1993; Jiang et al, 1994; Farkas et al, 1996). In addition to this excitatory effect, a number of indirect evidence suggests that NT also acts to regulate DA neurons indirectly by modulating the function of the DA D2 receptor (D2R) (Binder et al, 2001).

At the cellular level, NTS1 and D2R are present within some of the same axon terminals and dendrites (Delle Donne et al, 2004). In addition, NT produces a modest decrease in the affinity of the D2R for its agonists (von Euler et al, 1989; Fuxe et al, 1992; Tanganelli et al, 1993; Li et al, 1995). However, the nature and mechanism of the antagonistic interaction between NTS1 and D2R has not yet been elucidated. Several hypotheses have been proposed. A first hypothesis is that NTS1 and D2R oppositely regulate a similar potassium conductance in DA neurons (Farkas et al, 1997); NT would

thus simply prevent D2 agonists from activating the potassium channels by independently inhibiting them. Another plausible hypothesis is that activation of NTS1 leads to second messenger-dependent D2R alterations such as phosphorylation. Accordingly, it has been shown in heterologous cell lines that PKC can phosphorylate D2R, resulting in functional desensitization (Rogue et al, 1990; Namkung & Sibley, 2004). Since NTS1 activates the phospholipase C/IP₃/PKC pathway (Hermans & Maloteaux, 1998; Vincent et al, 1999), it is thus possible that the functional regulation of D2R exerted by NT results from a heterologous desensitization phenomenon.

In the present study we used primary cultures of mesencephalic neurons from TH-GFP transgenic mice (Jomphe et al, 2005) to investigate the mechanisms underlying the interaction between D2R and NTS1. In this model, DA neurons can be identified by the expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP), and they endogenously express both D2R and NTS1. Using electrophysiological recordings, we evaluated the ability of NT to modulate D2R-mediated inhibition of firing rate. We found that NT, through activation of a NTS1-like receptor, is indeed able to reduce D2 autoreceptor function, and that this interaction occurs through a PKC- and Ca²⁺-dependent inhibition of D2R function. In addition, prior activation of D2R similarly reduces the ability of NTS1 to induce intracellular Ca²⁺ mobilisation. These results indicate a bidirectional interaction between D2R and NTS1 functions that is involved in the regulation of DA neuron activity.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic mice and cell culture. The transgenic mice (TH-GFP/21-31 line) carrying the EGFP gene under the control of the TH promoter was described in recent studies (Sawamoto et al, 2001; Matsushita et al, 2002). Transgenic lines were maintained as heterozygotes by breeding with C57BL/6 J inbred mice and offsprings that carried the transgene were identified by PCR on the genomic DNA extracted from tail biopsies. A 475 bp fragment of EGFP DNA was amplified by PCR, using the primers: aagttcatctgcaccaccg and tgctcaggtatggttgcg. Primary cultures of postnatal mesencephalic neurons were prepared from postnatal day zero TH-GFP/21-31 transgenic mice as recently described (Jomphe et al, 2005).

Electrophysiology. Electrophysiological recordings were performed at room temperature on EGFP-expressing living neurons maintained for 10 to 18 days in culture. Cultures were transferred to a recording chamber that was fixed to the stage of an inverted Nikon Eclipse TE-200 microscope. The coverslip was constantly perfused with physiological saline solution using a gravity flow system (2.5-3 ml/min) with a standard extracellular bathing solution containing (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 6 sucrose, 10 glucose, pH 7.35, \cong 300 mOsm. Drugs were bath applied, with a delay between valve

opening and onset of drug action of approximately 15 s. Whole-cell or perforated patch (using the antibiotic amphotericin B (150-200 $\mu\text{g/ml}$) current clamp recordings were performed using a Warner PC-505 patch-clamp amplifier (Warner Instruments Corp., Hamden, CT, USA). Signals were filtered at 1 kHz, digitized at 10 kHz and recorded and analyzed using Pclamp7 software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) and Mini Analysis software (version 5.6) (Synaptosoft Inc., Leonia, NJ, USA) respectively. Action potentials were recorded with borosilicate glass patch pipettes (5-7 $\text{M}\Omega$) filled with a potassium methylsulfate intrapipette solution containing (mM): 145 KMeSO_4 , 20 KCl , 10 NaCl , 0.1 EGTA, 2 ATP (Mg salt), 0.6 GTP (Tris salt), 10 HEPES, 10 phosphocreatine (Tris salt) (pH 7.35) or, when required, a BAPTA intrapipette solution containing (mM): 100 KMeSO_4 , 20 KCl , 5 NaCl , 0.1 EGTA, 2 ATP (Mg salt), 0.5 GTP (Tris salt), 10 HEPES, 10 phosphocreatine (Tris salt), 10 BAPTA (tetraacetic acid tetrapotassium salt) (pH 7.35). In all experiments, the firing frequency was normalized to the average frequency recorded during the baseline period (2 minutes before drug application) and expressed as a percentage. The effect of a drug on firing rate was determined as the ratio of mean firing frequency at the peak of the effect (usually 1 min for the effect of the D2 agonist quinpirole) to the average frequency measured during baseline and wash-out periods. This calculation method takes into account any rundown in firing rate that could occur during long recording periods. Post-hoc immunocytochemistry against TH was performed systematically to confirm dopaminergic phenotype. The proportion of EGFP-expressing

neurons that expressed TH was approximately 80%. Neurons not expressing TH were excluded from further analysis.

Calcium imaging. Changes in cytosolic intracellular Ca^{2+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were measured with Fura 2. Briefly, cells grown on 15-mm coverslips were loaded with fura 2 by incubating in saline (pH 7.4) containing 5 μM fura-2-AM and 0.02% pluronic acid (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 45 min at room temperature. For $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measurements, the coverslip was mounted in a recording chamber that was fixed to the stage of an inverted Nikon Eclipse TE-200 microscope. The coverslip was constantly perfused with physiological saline solution (containing in mM: NaCl 140, KCl 5, MgCl_2 2, CaCl_2 2, HEPES 10, glucose 10, sucrose 6 at a pH of 7.35) added with 5 μM TTX (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) to prevent Ca^{2+} variations due to action potentials. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was measured by digital fluorescence imaging using Ratiotool software (Inovision Corporation, Raleigh, NC, USA.). Fluorescence excitation at 340/380 nm was controlled by a DG4 xenon lamp (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Fluorescence was collected after passing through a 495 nm long pass filter. Excitation image pairs (340/380 nm) were acquired every 5 s with a Orca-II digital cooled-CCD camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was calculated using an *in situ* calibration protocol and Grynkiewicz's equation (Grynkiewicz et al, 1985). In experiments evaluating the effect of NT(8-13) on $[\text{Ca}^{2+}]_i$, neurons were considered responsive if they showed an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of more than twice the standard deviation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measured during the baseline period. The

amplitude of the effect of NT was calculated as the difference between the maximal $[Ca^{2+}]_i$ increase at the peak (obtained 2 min after the beginning of the application of NT) and the $[Ca^{2+}]_i$ measured during a 1 min baseline period prior to the application. Two responses to NT were successively measured in the same cell, separated by an interval of 20 min. Drug effects were determined by comparing the amplitude of the initial NT-evoked $[Ca^{2+}]_i$ elevation to that of the second response measured in the presence of different drugs (SR48692, quinpirole).

Immunocytochemistry. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) and incubated with a monoclonal anti-TH antibody (TH-2 clone) (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) to confirm DA phenotype. The primary antibody was visualized using an Alexa-546-labeled secondary antibody (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Coverslips were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and observed by epifluorescence microscopy on a Nikon Eclipse TE-200 inverted microscope.

Statistical analysis. The results are expressed as arithmetic means \pm SEM with each observations (n) corresponding to a single recording made on neurons from different coverslips. For statistical analysis, Two Factor ANOVA, and t-tests were used as indicated.

RESULTS

Quinpirole-induced inhibition of DA neuron firing rate is dose-dependent and does not desensitize.

In a previous study, we showed that cultured DA neurons prepared from TH-EGFP mice possess the well-known physiological and pharmacological properties of DA neurons (Jomphe et al, 2005). Indeed these neurons possess functional D2 autoreceptors and show an inhibition of their firing rate in response to a D2 agonist. Using electrophysiological recordings, we first characterized the inhibition of firing rate induced by quinpirole, a D2R-selective agonist. Whole-cell perforated patch-clamp recordings were obtained from EGFP-expressing DA neurons, identified by epifluorescence prior to recording. As expected, quinpirole (0.1 and 1 μ M) reduced the spontaneous firing rate in a dose-dependent manner (Fig. 8.1A, B and D), with the highest concentration producing a significant effect. Activation of D2R with 1 μ M quinpirole induced a 59.7 ± 14.1 % reduction in firing frequency ($n = 6$, Student t-test for paired observations $P=0.03$) while this inhibition was limited to 20.1 ± 6.9 % with 0.1 μ M ($n = 6$, Student t-test for paired observations $P=0.1$). In addition, we confirmed that the effect of quinpirole (1 μ M) on firing rate was the result of D2 autoreceptor activation since sulpiride (5 μ M), a D2R antagonist, totally prevented this effect ($n = 4$, Student t-test for paired observations $P=0.93$). Therefore all subsequent experiments were performed with 1 μ M quinpirole (Fig. 8.1D).

Because subsequent experiments involved repeated applications of quinpirole, we next verified whether two successive applications of the D2 agonist caused a reproducible response. We found that when spaced by a 6 min interval, two applications of quinpirole (1 μ M, for 2 min) induced a comparable inhibition of the firing rate of cultured DA neurons (Q1= 59.7 ± 14.1 % , Q2 = 56.1 ± 12.1 %; n=6, Student t-test for paired observations P=0.8) (Fig 8.1C and E). This suggests that the response mediated by D2 autoreceptor activation does not show acute desensitization.

Activation of NT receptor reduces D2 autoreceptor function.

We next aimed to reproduce *in vitro* the interaction previously seen *in vivo* between the D2R and NT receptors. We assessed the ability of the active fragment of NT (NT8-13) to modulate the effect of the D2 agonist quinpirole on the firing rate of cultured DA neurons. During each recording, we first evaluated the effect of quinpirole alone (Q1, 1 μ M), and then a second application of quinpirole was done in the presence of NT(8-13) (1 nM). It should be noted that NT(8-13) by itself often caused an increase in firing rate, followed, in some cells, by brief periods of inactivity. Only neurons displaying stable firing in the presence of NT(8-13) were considered for further analysis. NT(8-13) was applied for 10 min starting 3 min before the second application of quinpirole (Q2). We found that the effect of the second application of quinpirole, in the presence of NT(8-13), was significantly reduced relative to the first one (Fig 8.2A, C). In the presence of NT(8-13), the

inhibition of firing rate induced by quinpirole was limited to 35.0 ± 5.1 %, in comparison to 78.9 ± 7.9 % when applied alone ($n = 5$, Student t-test for paired observations $P=0.008$).

We next used SR48692 ($1\mu\text{M}$) and SR142948A (100 nM), a selective NTS1 and a mixed NTS1/NTS2 receptor antagonist respectively, to evaluate the implication of these receptors in the modulatory effect of NT(8-13) on D2 autoreceptor function. Each antagonist was present during the complete duration of these experiments. Our results show that SR48692 as well as SR142948A blocked the modulatory effect of NT(8-13) on D2R function (Fig 8.2B, D), while they did not affect the ability of the D2R agonist to reduce the firing rate of DA neurons. Indeed, in the presence of SR48692, the first application of quinpirole induced a decrease of 72.0 ± 6.0 % in the firing rate, while the second application performed in the presence of NT(8-13) produced a decrease of 58.3 ± 10.1 %. The two responses were not statistically different ($n = 7$, Student t-test for paired observations, $P=0.08$). Similarly, the first application of quinpirole produced an inhibition of firing rate of 64.3 ± 6.7 % in the presence of SR142948A, while the second application of quinpirole performed in the presence of NT(8-13) reduced firing by 54.8 ± 6.5 % ($n = 6$, Student t-test for paired observations, $P=0.18$). Since the mixed NTS1/NTS2 antagonist did not block the modulatory effect of NT(8-13) to a greater extent than the selective NTS1 antagonist and because NTS1 is expressed at high level in DA neurons, we conclude that the effect of NT(8-13) on D2R function is mainly mediated through the high affinity NTS1 receptor.

Modulation of D2R function by NT is independent of its ability to increase the firing rate of DA neurons.

The excitatory effect of NT on DA neurons is well established (Palacios & Kuhar, 1981; Pinnock, 1985; Seutin et al, 1989; St-Gelais et al, 2004; Jomphe et al, 2005). One possibility is that the interaction between D2R and NTS1 is simply the consequence of their opposite effect on DA neurons excitability. However, this explanation is unlikely since the excitatory effect of NT(8-13) was variable and the receptor interaction could be detected even in experiments where the excitatory effect of NT(8-13) was modest (Fig. 8.2A). Nonetheless, we tested this possibility by evaluating the ability of NT to inhibit D2R function under conditions where we interfered with the excitatory effect of the peptide. In cultured DA neurons from rat midbrain, we have previously shown that blocking IP₃ receptors using heparin prevented the excitatory effect of NT (St-Gelais et al, 2004). We first reproduced this finding by showing that inclusion of heparin (1 mg/ml) in the intrapipette solution indeed blocks the excitatory effect of NT(8-13) (Fig. 8.3A, 8.3B and 8.3D). Indeed, in the presence on heparin, NT(8-13) increased firing rate by only $37.6 \pm 16.4\%$ over baseline, compared to $293.9 \pm 105.5\%$ when applied alone ($n=7$, Student t-test $P=0.04$). However, under such conditions, NT was still able to negatively regulate D2 autoreceptor function: when DA neurons were exposed to NT(8-13) in the presence of heparin, the inhibition of firing rate induced by quinpirole was still smaller ($41.3 \pm 10.5\%$) in comparison to the first application of quinpirole in the absence of NT(8-13) ($69.9 \pm 5.1\%$) ($n=9$, Student t-test for paired observations $P=0.03$) (Fig. 8.3C, E). Therefore, we can

conclude that the excitatory effect of NT is not necessary for the interaction seen *in vitro* between D2R and NTS1.

The functional interaction between D2R and NTS1 requires calcium.

NTS1 is functionally coupled to the phospholipase C (PLC) inositol phosphate (IP) signalling cascade (Hermans & Maloteaux, 1998; Vincent et al, 1999), leading to Ca^{2+} elevation in DA neurons, mostly through extracellular Ca^{2+} influx, with a minor contribution of the IP_3 pathway (Borges et al, 1996; St-Gelais et al, 2004; Jomphe et al, 2005). Although IP_3 -dependent intracellular Ca^{2+} store mobilization is not apparently required for the D2R-NTS1 interaction (Fig. 8.3), a role for Ca^{2+} influx remains possible. To verify this hypothesis, we recorded cultured DA neurons using an intrapipette solution containing the Ca^{2+} chelator BAPTA (10 mM). In the presence of BAPTA, the two successive applications of quinpirole, in the absence or presence of NT, produced a similar inhibition of firing rate (BAPTA + Quinpirole: 72.2 ± 9.1 %, BAPTA + Quinpirole + NT: 73.8 ± 10.6 %, $n=6$, Student t-test for paired observations $P=0.80$) (Fig 8.4A, B), showing that BAPTA totally abolished the functional regulation of D2R seen after NTS1 activation. In addition to blocking this receptor interaction, intra-pipette BAPTA, like the IP_3 receptors antagonist heparin, blocked the increase in firing rate induced by NT (Fig 8.4C). The increase in firing rate was $45.9 \pm 24.2\%$ in BAPTA-loaded neurons, while it was $297.6 \pm 105.2\%$ under normal recording conditions (NT $n=8$, NT+BAPTA $n=7$; Student t-test $P=0.047$). We can thus conclude that although the increase in intracellular Ca^{2+} following

NTS1 activation is required both for the increase in the firing rate and for the functional interaction between D2R and NTS1, the two phenomena are apparently not directly linked.

PKC is involved in the functional regulation of D2R by NTS1.

It has been shown, in heterologous expression systems, that D2R signaling is reduced by PKC (Rogue et al, 1990; Namkung & Sibley, 2004). Since stimulation of NTS1 leads to phospholipase C and PKC activation (Hermans & Maloteaux, 1998; Vincent et al, 1999), we assessed the implication of this kinase in the interaction between D2R and NTS1 by including PKC(19-36), a selective PKC peptide inhibitor, in the patch pipette. We observed that in the presence of PKC(19-36) (10 μ M), the ability of NT(8-13) to reduce the effect of quinpirole on firing frequency was blocked (Fig 8.5). The first application of quinpirole produced a $65.2 \pm 8.6\%$ decrease in the spontaneous firing while the second application, made, after NTS1 receptor activation, caused an inhibition of $52.7 \pm 4.5\%$, which was not statistically different from the first response (n=7, Student t-test for paired observations $P=0.24$) (Fig 8.5B). Blocking PKC activity is thus sufficient to counteract the functional regulation of the D2R by NTS1.

Activation of D2R reduces the ability of NT to increase intracellular calcium in DA neurons.

If NTS1 and D2R functionally interact, this interaction could perhaps be bidirectional, with D2R also regulating NTS1 function. To answer this question we

performed intracellular Ca^{2+} imaging experiments, taking advantage of the fact that activation of NTS1 in cultured DA neurons produces an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in both rat and mouse DA neurons (St-Gelais et al, 2004; Jomphe et al, 2005). Cultured neurons were loaded with fura-2 AM, a fluorescent Ca^{2+} indicator, and changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were measured with Fura 2 ratio fluorescence in EGFP-expressing DA neurons, identified by epifluorescence prior to the experiment. As expected, application of NT(8-13) (10 nM, for 2 minutes) produced a large increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, (Fig. 8.6A) an effect that showed only limited desensitization (Fig. 8.6B). The first application of NT(8-13) caused an average increase of 794.2 ± 95.6 nM, over the baseline level, while the second application, done 20 minutes after the first, lead to an average increase of 664.0 ± 74.0 nM ($n=17$, Student t-test for paired observations $P=0.01$). Calculated on a cell by cell basis, the second response to NT was on average $10.6 \pm 5.5\%$ smaller than the first (Fig 8.6D). The first application of NT also did not lead to a long-lasting change in baseline levels of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ as the first baseline value was on average 152.6 ± 18.4 nM and the second baseline value, measured just before the second application of NT, was 152.2 ± 16.5 nM ($n= 17$, Student t-test for paired observations $P=0.97$, results not shown). To evaluate the contribution of NTS1, the sensitivity of this Ca^{2+} mobilization response to SR48692 was evaluated. We found that SR48692 totally abolished NT(8-13)-induced Ca^{2+} elevation in DA neurons (not shown). In the presence of SR48692, the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by NT(8-13) was limited to 14.4 ± 9.8 nM, compared to 644.8 ± 89.0 nM when NT(8-13) was applied alone ($n=8$, Student t-test for paired observations $p < 0.001$), corresponding to a $97.2 \pm 1.7\%$ inhibition.

Finally, to verify if D2R functionally regulates NTS1 signaling, we stimulated D2R with quinpirole (1 μ M) two min prior to the second NT(8-13) application. In the absence of quinpirole, activation of NTS1 receptors leads to a large increase in $[Ca^{2+}]_i$ (940.7 ± 111.7 nM). In response to quinpirole, a small decrease in basal $[Ca^{2+}]_i$ was first noted (from 201.1 ± 22.2 nM to 89.2 ± 6.6 nM in the presence quinpirole) ($n=18$, Student t-test for paired observations $p < 0.001$) (Fig 8.6C). In the presence of quinpirole, the second response to NT(8-13) was on average 623.6 ± 91.7 nM ($n=8$), which, calculated on a cell by cell basis corresponds to a decrease of 37.3 ± 7.2 % (Student t-test for paired observations $p < 0.001$) (Fig 8.6C), a value which was much higher than the 10.6% decrement noted in control experiments. Based on these observations, we conclude that the D2R negatively regulates NTS1 function. The interaction seen *in vitro* between D2R and NTS1 is thus bidirectional.

DISCUSSION

Several lines of evidence suggest a close association between DA and NT systems in the CNS. It has been demonstrated that in addition to its direct excitatory effects on the excitability of DA neurons, NT through its high-affinity receptor, also modulates D2 autoreceptor function (Shi & Bunney, 1991; Rostene et al, 1997; Werkman et al, 2000). However, the mechanism underlying this interaction is still elusive. The present work provides novel information on the mechanism by which NT induces functional inhibition of D2R function. Using electrophysiological recordings, we made three major observations. First, we showed that NT, through the activation of a NTS1-like receptor, is effectively able to reduce D2 autoreceptor function in cultured DA neurons and that this effect is independent of the direct excitatory effect of this peptide. Second, we found that the functional interaction between D2R and NTS1 receptors requires Ca^{2+} and PKC activation. Finally, we demonstrated that the cross-talk between NTS1 and D2R is bidirectional.

Since midbrain DA neurons are excited by NT and inhibited by DA, it has been suggested that the interaction between D2R and NTS1 functions results from an opposite regulation of a similar potassium conductance (Farkas et al, 1997). In the present set of experiments, we did not directly measure the activity of ionic channels influencing the excitability of DA neurons. Nonetheless, our results allow us to discount this earlier hypothesis. We had previously shown that the excitatory effect of NT on cultured rat DA neurons is Ca^{2+} -dependent and implicates IP_3 receptors (St-Gelais et al, 2004). In the

present work, we similarly demonstrated that the excitatory effect of NT on cultured DA neurons from TH-GFP mice is blocked by BAPTA, a Ca^{2+} chelator, and by heparin, an IP_3 receptor antagonist. Moreover, we found that including BAPTA in the intrapipette solution effectively blocked the functional regulation of the D2R by NTS1, while heparin was without effect on this interaction. These results suggest on the one hand that an increase in intracellular Ca^{2+} is required for the interaction to occur, and on the other that the major source of this Ca^{2+} is the extracellular medium, a finding compatible with our previous report showing that NT elevates intracellular Ca^{2+} in DA neurons mainly by promoting Ca^{2+} influx, with only a minor contribution from intracellular Ca^{2+} stores (St-Gelais et al, 2004). Since it was possible to block the excitatory effect of NT without blocking the receptor interaction, we therefore conclude that the two mechanisms are independent. This conclusion is further supported by the previous demonstrations that NT is able to reduce the inhibitory effect of D2R agonists, even at concentrations of NT that do not increase firing by themselves (Shi & Bunney, 1990,1992; Nalivaiko et al, 1998; Werkman et al, 2000). Also in agreement with this conclusion, we found that although the excitatory effect of NT on firing was quite variable, the peptide always caused a robust inhibition of D2R function, thus arguing in favour of independent mechanisms.

The functional interaction between D2R and NTS1 leads to a reduction of D2 autoreceptor function. We have not in the present work demonstrated direct receptor or signaling interactions between D2R and NTS1. The cross-talk between these two receptor systems could indeed involve a number of intermediate steps. However, the functional

interaction we have described can be nonetheless be considered a form of functional desensitization and could be caused by a loss of receptors from the cell surface, an uncoupling of receptors from their signal transduction pathways, or an alteration of distal components of these pathways. Our results with heparin argue against the possibility of an opposite regulation of a common effector. We thus favor the hypothesis that second-messenger pathways activated through NTS1 lead to a cascade of events promoting uncoupling of the D2 receptor from its signaling pathways. Since NTS1 is functionally coupled to the phospholipase C, IP metabolism and PKC signalling cascades (Hermans & Maloteaux, 1998; Vincent et al, 1999) and because PKC activation leads to phosphorylation and desensitization of many Gi and Gq-linked GPCRs (Oppermann et al, 1996; Haga et al, 1996; Diviani et al, 1997; Tang et al, 1998; Liang et al, 1998; Hipkin et al, 2000), we investigated the role of PKC in the D2R-NTS1 receptor interaction. We found that blocking PKC with the selective peptide inhibitor PKC(19-36) prevents the functional desensitization of D2R induced by NTS1. The D2R possesses PKC phosphorylation sites within its third intracellular loop, a region that plays a central role in the coupling of GPCRs to their effectors. In addition, in heterologous cell lines, PKC can mediate phosphorylation of D2R to promote desensitization and internalization (Rogue et al, 1990; Namkung & Sibley, 2004). Although additional data will be required to demonstrate this, it is therefore possible that the reduction in D2R function induced by NTS1 results from a direct phosphorylation of the D2R by PKC. However, the processes underlying heterologous desensitization are still not well understood, and it is likely that multiple

mechanisms, in addition to phosphorylation of the D2R by PKC, can contribute to this process. For example, it is possible that PKC acts through the phosphorylation of a GRK thus promoting homologous desensitization. Compatible with this possibility it has been shown that GRK2, thought to be the major GRK involved in D2R internalization (Iwata et al, 1999; Ito et al, 1999; Kim et al, 2001), can be directly phosphorylated by PKC (Chuang et al, 1995) or that PKC increases its ability to interact with the receptor (Mundell et al, 2004), leading to an increase in its ability to promote desensitization (Chuang et al, 1996).

An alternate but not necessarily exclusive explanation of a D2R-NTR1 interaction is that the two receptors physically interact. Indeed, an allosteric interaction between D2R and NTS1 has been previously proposed based on indirect data (Tanganelli et al, 1989; von Euler et al, 1991). It is now widely accepted that GPCRs form homo- and hetero-oligomers, the formation of which can influence their ligand binding pharmacology, intracellular signal transduction and trafficking (Bouvier, 2001). Although the mechanistic details remain unclear, heteroreceptor-induced desensitization and internalization could result from direct protein-protein interactions. It has been previously shown that D2R can form heterodimers with the adenosine A2A receptor (Fuxe et al, 1998; Hillion et al, 2002; Kamiya et al, 2003; Canals et al, 2003) as well as the somatostatin SSTR5 receptor (Rocheville et al, 2000) and more recently with the cannabinoid CB1 receptor (Kearn et al, 2005). Moreover, there is compelling evidence in heterologous cell lines that the heterodimerization between D2R and the A2A receptor is responsible for the heterologous desensitization of D2R following A2A receptor stimulation (Yang et al, 1995; Salim et al,

2000; Hillion et al, 2002). Although there is no evidence yet supporting a direct interaction between D2R and NTS1, we cannot presently exclude this possibility.

Finally, we demonstrated that the D2R can reduce the ability of NTS1 to induce Ca^{2+} mobilization in cultured DA neurons. Although a previous study has shown a similar phenomenon in rat pituitary cells (Memo et al, 1985), this is the first report of a bidirectional antagonistic interaction of D2 and NTS1 receptors. The mechanism of this reverse interaction is presently unexplored. The concept of bidirectional interactions between GPCRs is widespread as highlighted by the recent observation of a similar relationship between μ -opioid and chemokine receptors (Rogers et al, 2000), cannabinoid CB1 and δ -opioid receptors (Shapira et al, 2003) and for angiotensin II and alpha 1 adrenergic receptors (Jerez et al, 2004).

The D2R acts as an autoreceptor and feedback regulator of DA neurons (Lacey et al, 1987; Chiodo & Kapatos, 1992; Mercuri et al, 1997). It is otherwise known to exhibit relatively weak homologous desensitization (Sibley & Neve, 1997). Its functional regulation by NT, through NTS1, could thus be a critical mechanism to regulate the activity of DA neurons. The consequences of the regulation of NTS1 receptor signaling by the D2R have been less explored. However, this action would act as an ideal feedback system to dampen any excessive activity of DA neurons since an accumulation of extracellular DA would not only directly activate the D2 autoreceptor and its associated potassium conductances, but it would at the same time lead to partial inhibition of an excitatory peptidergic system.

REFERENCES

- Binder, E.B., Kinkead, B., Owens, M.J. & Nemeroff, C.B. (2001) Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacol Rev*, **53**, 453-86.
- Borges, S., Gleason, E., Frerking, M. & Wilson, M. (1996) Neurotensin induces calcium oscillations in cultured amacrine cells. *Vis Neurosci*, **13**, 311-8.
- Bouvier, M. (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 274-86.
- Brouard, A., Pelaprat, D., Dana, C., Vial, M., Lhiaubet, A.M. & Rostene, W. (1992) Mesencephalic dopaminergic neurons in primary cultures express functional neurotensin receptors. *J Neurosci*, **12**, 1409-15.
- Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S.R., Neve, K., Fuxe, K., Agnati, L.F., Woods, A.S., Ferre, S., Lluís, C., Bouvier, M. & Franco, R. (2003) Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem*, **278**, 46741-9.
- Chiodo, L.A. & Kapatos, G. (1992) Membrane properties of identified mesencephalic dopamine neurons in primary dissociated cell culture. *Synapse*, **11**, 294-309.
- Chuang, T.T., Iacovelli, L., Sallese, M. & De Blasi, A. (1996) G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol Sci*, **17**, 416-21.

- Chuang, T.T., LeVine, H. 3rd & De Blasi, A. (1995) Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J Biol Chem*, **270**, 18660-5.
- Delle Donne, K.T., Chan, J., Boudin, H., Pelaprat, D., Rostene, W. & Pickel, V.M. (2004) Electron microscopic dual labeling of high-affinity neurotensin and dopamine D2 receptors in the rat nucleus accumbens shell. *Synapse*, **52**, 176-87.
- Diviani, D., Lattion, A.L. & Cotecchia, S. (1997) Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, **272**, 28712-9.
- Farkas, R.H., Chien, P.Y., Nakajima, S. & Nakajima, Y. (1996) Properties of a slow nonselective cation conductance modulated by neurotensin and other neurotransmitters in midbrain dopaminergic neurons. *J Neurophysiol*, **76**, 1968-81.
- Farkas, R.H., Chien, P.Y., Nakajima, S. & Nakajima, Y. (1997) Neurotensin and dopamine D2 activation oppositely regulate the same K⁺ conductance in rat midbrain dopaminergic neurons. *Neurosci Lett*, **231**, 21-4.
- Fassio, A., Evans, G., Grisshammer, R., Bolam, J.P., Mimmack, M. & Emson, P.C. (2000) Distribution of the neurotensin receptor NTS1 in the rat CNS studied using an amino-terminal directed antibody. *Neuropharmacology*, **39**, 1430-42.
- Fuxe, K., Ferre, S., Zoli, M. & Agnati, L.F. (1998) Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev*, **26**, 258-73.

Fuxe, K., Von Euler, G., Agnati, L.F., Merlo Pich, E., O'Connor, W.T., Tanganelli, S., Li, X.M., Tinner, B., Cintra, A., Carani, C. & et, a.l. (1992) Intramembrane interactions between neurotensin receptors and dopamine D2 receptors as a major mechanism for the neuroleptic-like action of neurotensin. *Ann N Y Acad Sci*, **668**, 186-204.

Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-50.

Haga, K., Kameyama, K., Haga, T., Kikkawa, U., Shiozaki, K. & Uchiyama, H. (1996) Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J Biol Chem*, **271**, 2776-82.

Hermans, E. & Maloteaux, J.M. (1998) Mechanisms of regulation of neurotensin receptors. *Pharmacol Ther*, **79**, 89-104.

Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M.E., Mallof, J., Canela, E.I., Zoli, M., Agnati, L.F., Ibanez, C.F., Lluís, C., Franco, R., Ferre, S. & Fuxe, K. (2002) Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem*, **277**, 18091-7.

Hipkin, R.W., Wang, Y. & Schonbrunn, A. (2000) Protein kinase C activation stimulates the phosphorylation and internalization of the sst2A somatostatin receptor. *J Biol Chem*, **275**, 5591-9.

Ito, K., Haga, T., Lamah, J. & Sadee, W. (1999) Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5. *Eur J Biochem*, **260**, 112-9.

Iwata, K., Ito, K., Fukuzaki, A., Inaki, K. & Haga, T. (1999) Dynamin and rab5 regulate GRK2-dependent internalization of dopamine D2 receptors. *Eur J Biochem*, **263**, 596-602.

- Jennes, L., Stumpf, W.E. & Kalivas, P.W. (1982) Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J Comp Neurol*, **210**, 211-24.
- Jerez, S., Peral de Bruno, M. & Coviello, A. (2004) Cross talk between angiotensin II and alpha 1 adrenergic receptors in rabbit aorta: role of endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol*, **43**, 402-9.
- Jiang, Z.G., Pessia, M. & North, R.A. (1994) Neurotensin excitation of rat ventral tegmental neurones. *J Physiol*, **474**, 119-29.
- Jomphe, C., Bourque, M.J., Fortin, G.D., St-Gelais, F., Okano, H., Kobayashi, K. & Trudeau, L.E. (2005) Use of TH-EGFP transgenic mice as a source of identified dopaminergic neurons for physiological studies in postnatal cell culture. *J Neurosci Methods*, **146**, 1-12.
- Kamiya, T., Saitoh, O., Yoshioka, K. & Nakata, H. (2003) Oligomerization of adenosine A2A and dopamine D2 receptors in living cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **306**, 544-9.
- Kearn, C.S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K. & Glass, M. (2005) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol*, **67**, 1697-704.
- Kim, K.M., Valenzano, K.J., Robinson, S.R., Yao, W.D., Barak, L.S. & Caron, M.G. (2001) Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J Biol Chem*, **276**, 37409-14.
- Lacey, M.G., Mercuri, N.B. & North, R.A. (1987) Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J Physiol*, **392**, 397-416.

Li, X.M., Ferraro, L., Tanganelli, S., O'Connor, W.T., Hasselrot, U., Ungerstedt, U. & Fuxe, K. (1995) Neurotensin peptides antagonistically regulate postsynaptic dopamine D2 receptors in rat nucleus accumbens: a receptor binding and microdialysis study. *J Neural Transm Gen Sect*, **102**, 125-37.

Liang, M., Eason, M.G., Jewell-Motz, E.A., Williams, M.A., Theiss, C.T., Dorn, G.W. 2nd & Liggett, S.B. (1998) Phosphorylation and functional desensitization of the alpha2A-adrenergic receptor by protein kinase C. *Mol Pharmacol*, **54**, 44-9.

Matsushita, N., Okada, H., Yasoshima, Y., Takahashi, K., Kiuchi, K. & Kobayashi, K. (2002) Dynamics of tyrosine hydroxylase promoter activity during midbrain dopaminergic neuron development. *J Neurochem*, **82**, 295-304.

Memo, M., Carboni, E., Trabucchi, M., Carruba, M.O. & Spano, P.F. (1985) Dopamine inhibition of neurotensin-induced increase in Ca²⁺ influx into rat pituitary cells. *Brain Res*, **347**, 253-7.

Mercuri, N.B., Saiardi, A., Bonci, A., Picetti, R., Calabresi, P., Bernardi, G. & Borrelli, E. (1997) Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience*, **79**, 323-7.

Mercuri, N.B., Stratta, F., Calabresi, P. & Bernardi, G. (1993) Neurotensin induces an inward current in rat mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci Lett*, **153**, 192-6.

Moyse, E., Rostene, W., Vial, M., Leonard, K., Mazella, J., Kitabgi, P., Vincent, J.P. & Beaudet, A. (1987) Distribution of neurotensin binding sites in rat brain: a light microscopic radioautographic study using monoiodo. *Neuroscience*, **22**, 525-36.

- Mundell, S.J., Pula, G., McIlhinney, R.A., Roberts, P.J. & Kelly, E. (2004) Desensitization and internalization of metabotropic glutamate receptor 1a following activation of heterologous Gq/11-coupled receptors. *Biochemistry*, **43**, 7541-51.
- Nalivaiko, E., Michaud, J.C., Soubrie, P. & Le Fur, G. (1998) Electrophysiological evidence for putative subtypes of neurotensin receptors in guinea-pig mesencephalic dopaminergic neurons. *Neuroscience*, **86**, 799-811.
- Namkung, Y. & Sibley, D.R. (2004) Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem*, **279**, 49533-41.
- Nicot, A., Rostene, W. & Berod, A. (1995) Differential expression of neurotensin receptor mRNA in the dopaminergic cell groups of the rat diencephalon and mesencephalon. *J Neurosci Res*, **40**, 667-74.
- Oppermann, M., Freedman, N.J., Alexander, R.W. & Lefkowitz, R.J. (1996) Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J Biol Chem*, **271**, 13266-72.
- Palacios, J.M. & Kuhar, M.J. (1981) Neurotensin receptors are located on dopamine-containing neurones in rat midbrain. *Nature*, **294**, 587-9.
- Pinnock, R.D. (1985) Neurotensin depolarizes substantia nigra dopamine neurones. *Brain Res*, **338**, 151-4.
- Quirion, R. (1983) Interactions between neurotensin and dopamine in the brain: an overview. *Peptides*, **4**, 609-15.
- Quirion, R., Chiueh, C.C., Everist, H.D. & Pert, A. (1985) Comparative localization of neurotensin receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic terminals. *Brain Res*, **327**, 385-9.

- Rocheville, M., Lange, D.C., Kumar, U., Patel, S.C., Patel, R.C. & Patel, Y.C. (2000) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*, **288**, 154-7.
- Rogers, T.J., Steele, A.D., Howard, O.M. & Oppenheim, J.J. (2000) Bidirectional heterologous desensitization of opioid and chemokine receptors. *Ann N Y Acad Sci*, **917**, 19-28.
- Rogue, P., Zwiller, J., Malviya, A.N. & Vincendon, G. (1990) Phosphorylation by protein kinase C modulates agonist binding to striatal dopamine D2 receptors. *Biochem Int*, **22**, 575-82.
- Rostene, W., Azzi, M., Boudin, H., Lepee, I., Souaze, F., Mendez-Ubach, M., Betancur, C. & Gully, D. (1997) Use of nonpeptide antagonists to explore the physiological roles of neurotensin. Focus on brain neurotensin/dopamine interactions. *Ann N Y Acad Sci*, **814**, 125-41.
- Salim, H., Ferre, S., Dalal, A., Peterfreund, R.A., Fuxe, K., Vincent, J.D. & Lledo, P.M. (2000) Activation of adenosine A1 and A2A receptors modulates dopamine D2 receptor-induced responses in stably transfected human neuroblastoma cells. *J Neurochem*, **74**, 432-9.
- Sawamoto, K., Nakao, N., Kobayashi, K., Matsushita, N., Takahashi, H., Kakishita, K., Yamamoto, A., Yoshizaki, T., Terashima, T., Murakami, F., Itakura, T. & Okano, H. (2001) Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6423-8.
- Seutin, V., Massotte, L. & Dresse, A. (1989) Electrophysiological effects of neurotensin on dopaminergic neurones of the ventral tegmental area of the rat in vitro. *Neuropharmacology*, **28**, 949-54.

- Shapira, M., Gafni, M. & Sarne, Y. (2003) Long-term interactions between opioid and cannabinoid agonists at the cellular level: cross-desensitization and downregulation. *Brain Res*, **960**, 190-200.
- Shi, W.S. & Bunney, B.S. (1990) Neurotensin attenuates dopamine D2 agonist quinpirole-induced inhibition of midbrain dopamine neurons. *Neuropharmacology*, **29**, 1095-7.
- Shi, W.X. & Bunney, B.S. (1991) Neurotensin modulates autoreceptor mediated dopamine effects on midbrain dopamine cell activity. *Brain Res*, **543**, 315-21.
- Shi, W.X. & Bunney, B.S. (1992) Actions of neurotensin: a review of the electrophysiological studies. *Ann N Y Acad Sci*, **668**, 129-45.
- Sibley, D.R. & Neve, K.A. (1997) Regulation of dopamine receptor function and expression. In Neve KA and Neve RL (ed), *The Dopamine Receptors*. Humana Press, pp. 383-424.
- St-Gelais, F., Legault, M., Bourque, M.J., Rompre, P.P. & Trudeau, L.E. (2004) Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci*, **24**, 2566-74.
- Tang, H., Guo, D.F., Porter, J.P., Wanaka, Y. & Inagami, T. (1998) Role of cytoplasmic tail of the type 1A angiotensin II receptor in agonist- and phorbol ester-induced desensitization. *Circ Res*, **82**, 523-31.
- Tanganelli, S., Li, X.M., Ferraro, L., Von Euler, G., O'Connor, W.T., Bianchi, C., Beani, L. & Fuxe, K. (1993) Neurotensin and cholecystinin octapeptide control synergistically dopamine release and dopamine D2 receptor affinity in rat neostriatum. *Eur J Pharmacol*, **230**, 159-66.

Tanganelli, S., von Euler, G., Fuxe, K., Agnati, L.F. & Ungerstedt, U. (1989) Neurotensin counteracts apomorphine-induced inhibition of dopamine release as studied by microdialysis in rat neostriatum. *Brain Res*, **502**, 319-24.

Uhl, G.R. (1982) Distribution of neurotensin and its receptor in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*, **400**, 132-49.

Uhl, G.R., Kuhar, M.J. & Snyder, S.H. (1977) Neurotensin: immunohistochemical localization in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 4059-63.

Vincent, J.P., Mazella, J. & Kitabgi, P. (1999) Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 302-9.

von Euler, G., Fuxe, K., Benfenati, F., Hansson, T., Agnati, L.F. & Gustafsson, J.A. (1989) Neurotensin modulates the binding characteristics of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes also following treatment with toluene. *Acta Physiol Scand*, **135**, 443-8.

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

Werkman, T.R., Kruse, C.G., Nievelstein, H., Long, S.K. & Wadman, W.J. (2000) Neurotensin attenuates the quinpirole-induced inhibition of the firing rate of dopamine neurons in the rat substantia nigra pars compacta and the ventral tegmental area. *Neuroscience*, **95**, 417-23.

Yang, S.N., Dasgupta, S., Lledo, P.M., Vincent, J.D. & Fuxe, K. (1995) Reduction of dopamine D2 receptor transduction by activation of adenosine A2a receptors in stably A2a/D2 (long-form) receptor co-transfected mouse fibroblast cell lines: studies on intracellular calcium levels. *Neuroscience*, **68**, 729-36.

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

FIGURE LEGENDS

Figure 8.1 Effect of quinpirole on the spontaneous firing of DA neurons. (A, B) Representative examples of patch-clamp recordings of spontaneous action potentials in cultured midbrain DA neurons from TH-GFP mice. The D2R agonist quinpirole induced a dose-dependent inhibition of the firing rate. Quinpirole was applied for 2 minutes at 0.1 μM (A) or 1 μM (B). At the highest dose, quinpirole caused a strong reduction in firing rate. **C.** Representative recording of spontaneous action potentials in a DA neuron exposed to two successive applications of quinpirole (1 μM for 2 min). **D.** Summary graph of the effect of quinpirole (1 μM) on the firing rate of DA neurons. Quinpirole produced a significant inhibition of the firing rate that was totally blocked by the selective D2 antagonist sulpiride (5 μM). **E.** Summary graph showing the mean inhibition of firing rate induced by two successive applications of quinpirole (Q1 and Q2) (n=6). The second application produced an inhibition similar to the first one. Data are expressed as mean \pm SEM. * p<0.05.

Figure 8.2 Activation of NTS1 reduces the effect of quinpirole on firing rate. (A, B) Representative examples of spontaneous action potentials recorded from cultured DA neurons. The second application of quinpirole was made in the presence of 1 nM NT(8-13) alone (A) or together with the selective NTS1 antagonist SR48692 (1 μM) (B). **C.** Graph summarizing the effect of NT(8-13) on the quinpirole-induced inhibition of firing rate (n=5). **D.** Summary graph of the effect of the selective NTS1 antagonist SR48692 (1 μM)

(n=7) and the NTS1/NTS2 mixed antagonist SR142948A (100 nM) (n=6) on the ability of NT(8-13) to inhibit the second response to quinpirole. Data are expressed as mean \pm SEM. *** $p < 0.001$.

Figure 8.3 The excitatory effect of NTS1 is not required for the functional regulation of D2R function. (A, B). Representative recording of the effect of NT(8-13) (1 nM, for 10 min) on DA neurons. NT(8-13) produced a strong increase in the firing rate of DA neurons (B), an effect that was blocked by heparin (1 mg/ml) (B). C. Example of a patch-clamp recording experiment measuring spontaneous action potentials in DA neurons exposed to two successive applications of quinpirole, the second of which was performed in the presence of NT(8-13). The IP_3 receptor antagonist heparin (1 mg/ml), included in the patch pipette, failed to prevent the ability of NT(8-13) to inhibit the effect of quinpirole. D. Graph summarizing the effect of heparin on NT(8-13)-induced increase in firing (n=7) in comparison to the effect of NT(8-13) alone (n=8). Note that heparin blocked the excitatory effect of NT(8-13). E. Summary graph showing the effect of NT(8-13) on quinpirole-evoked inhibition of firing, in the presence of heparin (n=9). Note that heparin failed to prevent the interaction. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$.

Figure 8.4 The functional interaction between D2R and NTS1 requires calcium. **A.** Representative patch-clamp recording of a spontaneously firing cultured DA neuron exposed twice to quinpirole, the second of which was performed in the presence of NT(8-13). The calcium chelator BAPTA (10 mM) was included in the intrapipette solution. **B.** Summary graph showing the effect of BAPTA on the response of DA neurons to quinpirole in the presence or in the absence of NT(8-13) (n=6). Note that BAPTA completely prevented the interaction. **C.** Graph summarizing the effect of BAPTA on NT(8-13)-induced increase in firing rate (n=7) in comparison to the effect of NT(8-13) alone (n=8). Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$. Note that BAPTA blocked the excitatory effect of NT(8-13).

Figure 8.5 The functional interaction between D2R and NTS1 is PKC-dependent. **A.** Representative patch-clamp recording experiment where PKC(19-36) (10 μ M), a PKC antagonist, was included in the patch pipette. The recorded DA neuron was first exposed to quinpirole alone and then quinpirole in the presence of NT(8-13). **B.** Summary graph showing that PKC(19-36) prevented the ability of NT(8-13) to negatively regulate the response to quinpirole (n=7). Data are expressed as mean \pm SEM.

Figure 8.6 D2R inhibits the ability of NTS1 to increase intracellular calcium in DA neurons. **A.** Ratio images from a representative fura-2 Ca^{2+} imaging experiment. DA neurons were identified prior to the experiment by EGFP epifluorescence (not shown). **B,C.** Graphs showing the variation in intracellular Ca^{2+} concentration as a function of time in representative experiments. NT(8-13) (10 nM) was applied twice for 2 min, separated by a 25 minutes wash out period. On the second occasion, it was applied either alone (B) or in the presence of quinpirole (1 μM) (C). **D.** Summary graph showing the amplitude of the second response to NT relative to the first. The second application of NT was preceded by saline in control experiments (control n=17) or by quinpirole (n=18). Data are expressed as mean \pm SEM. **p<0.01.

Figure 8.1

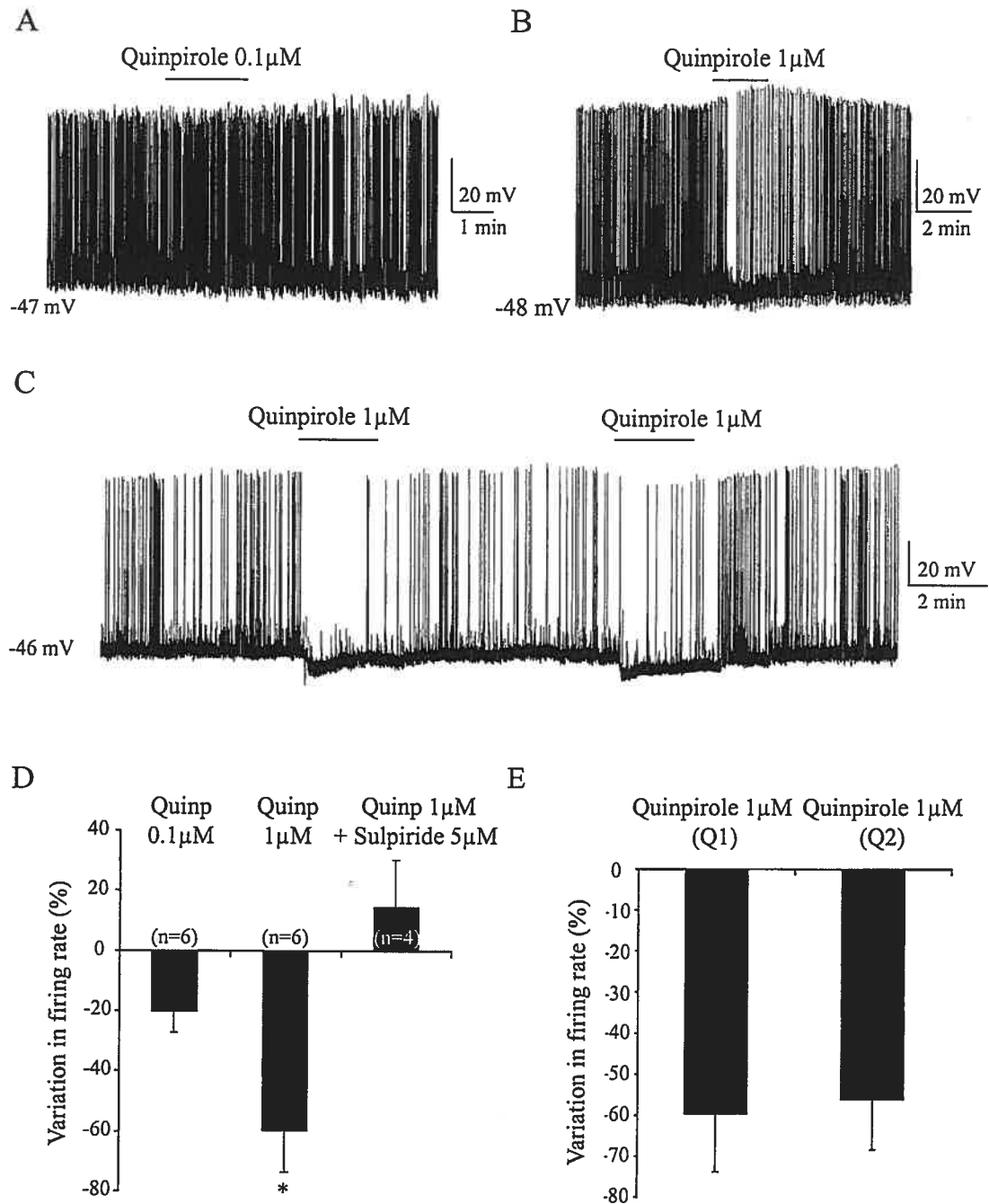


Figure 8.2

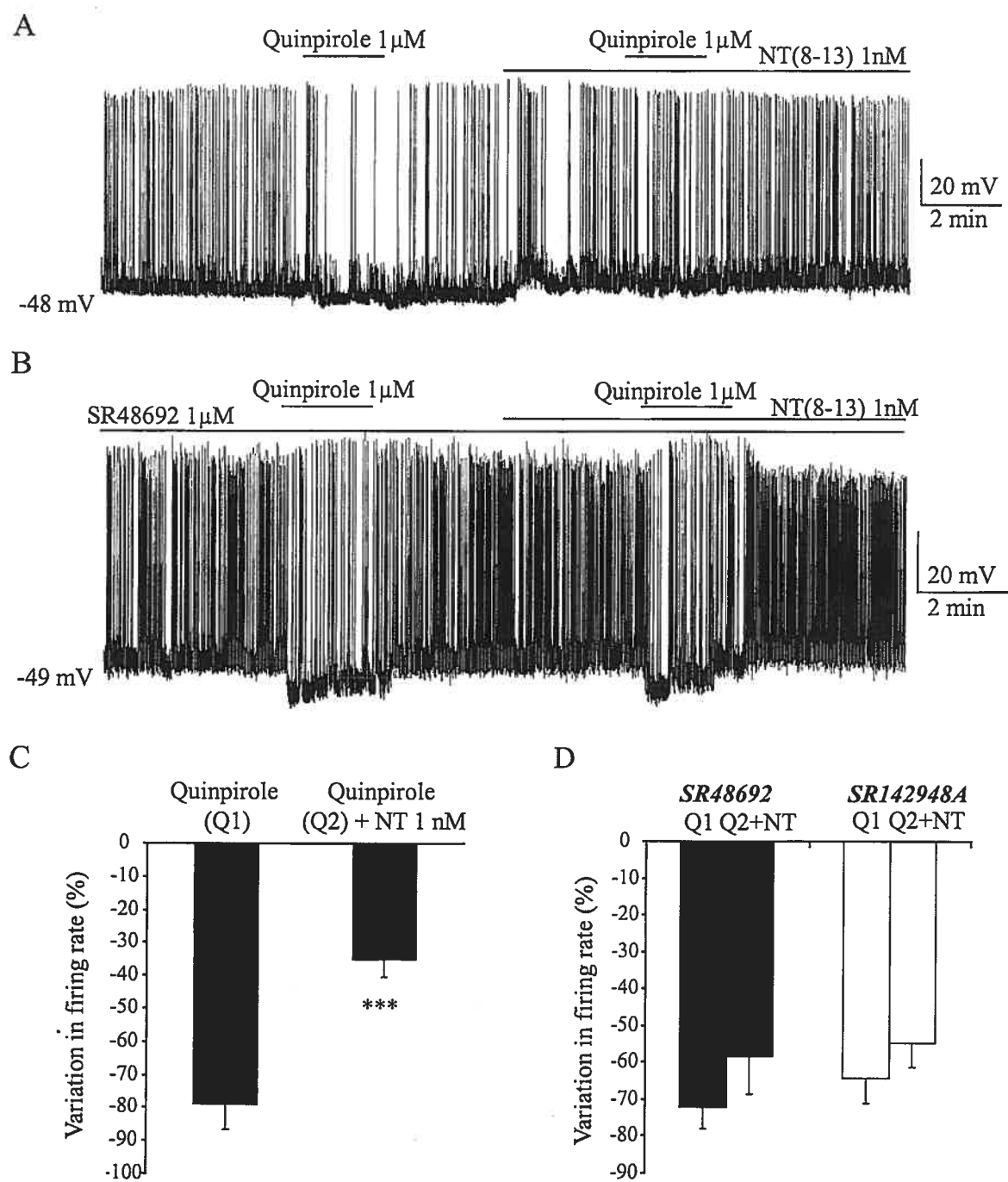


Figure 8.3

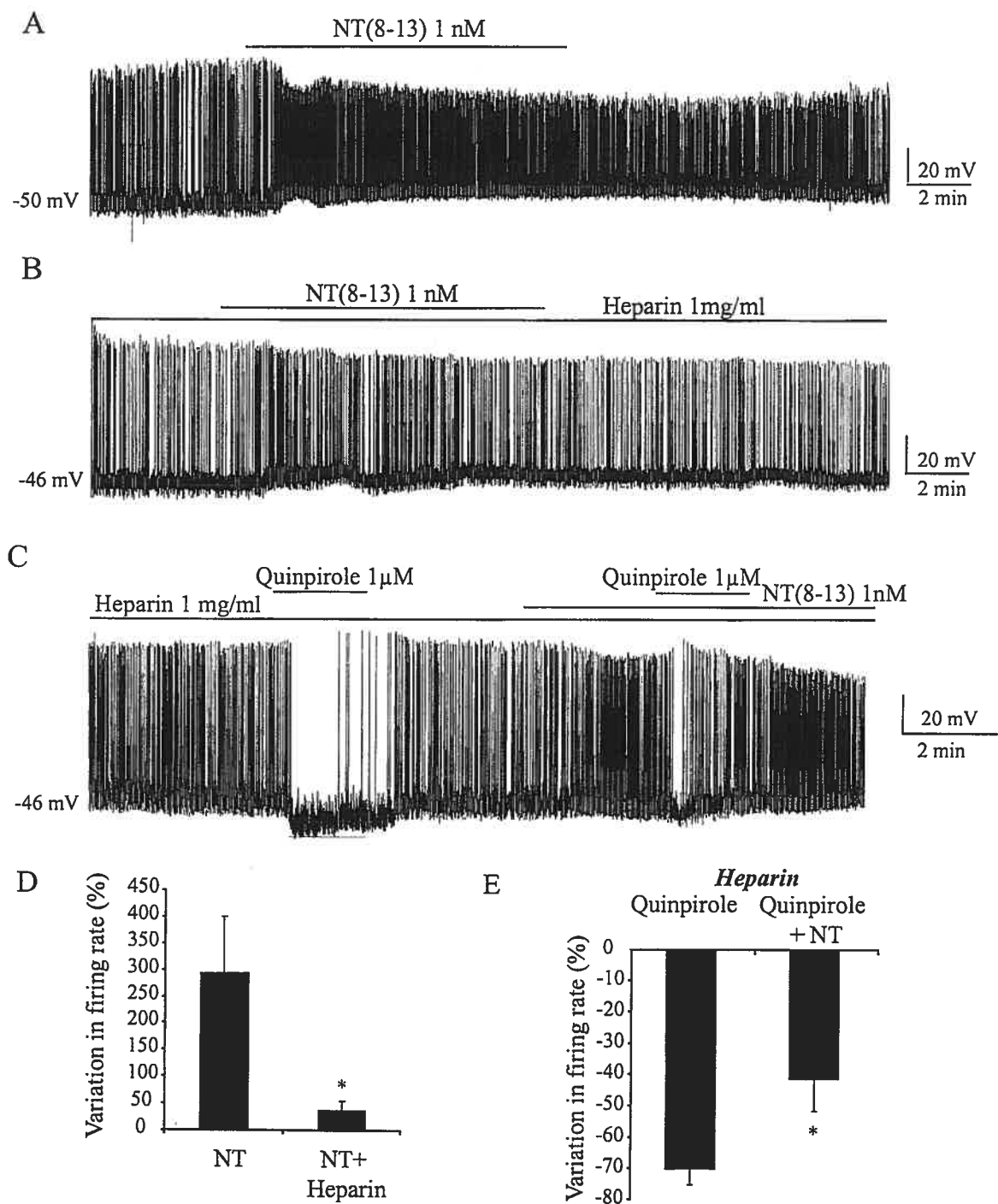


Figure 8.4

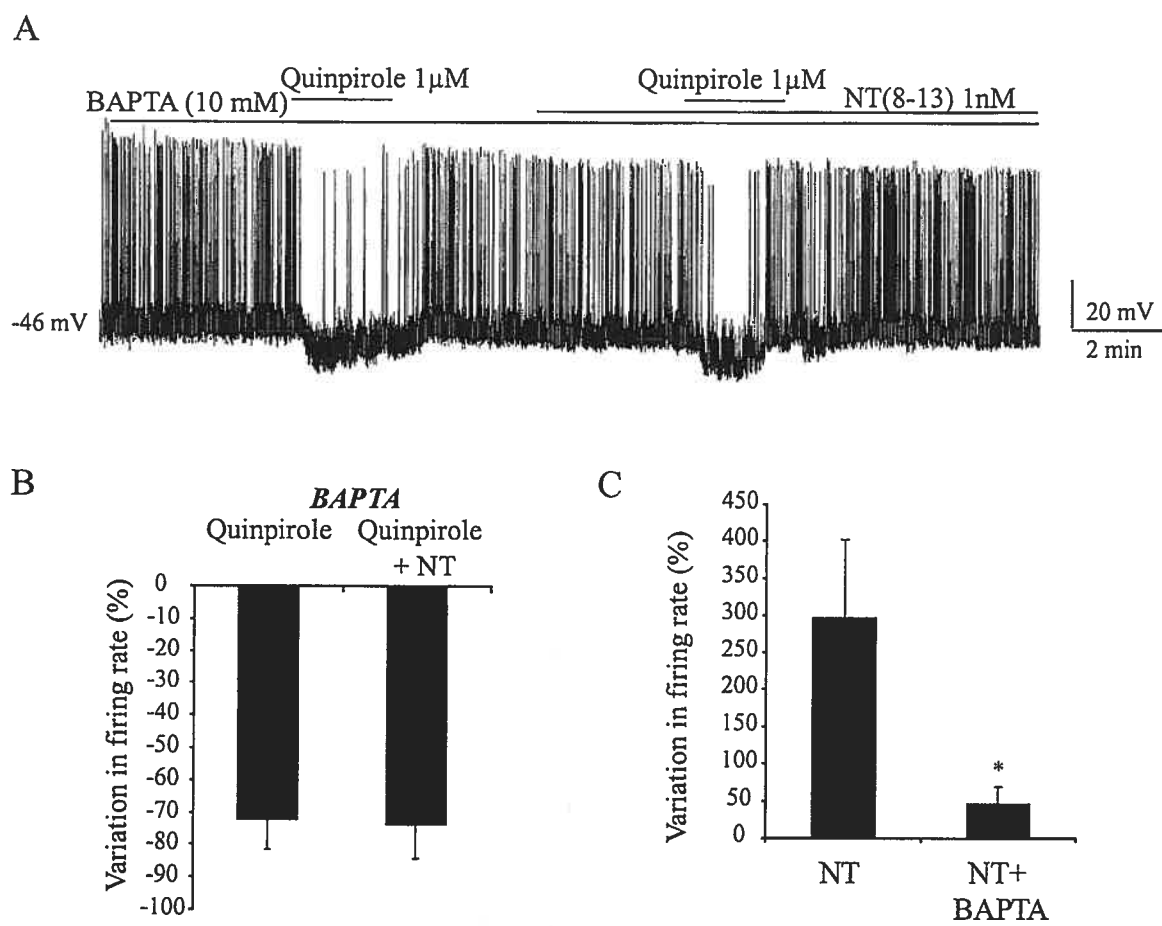


Figure 8.5

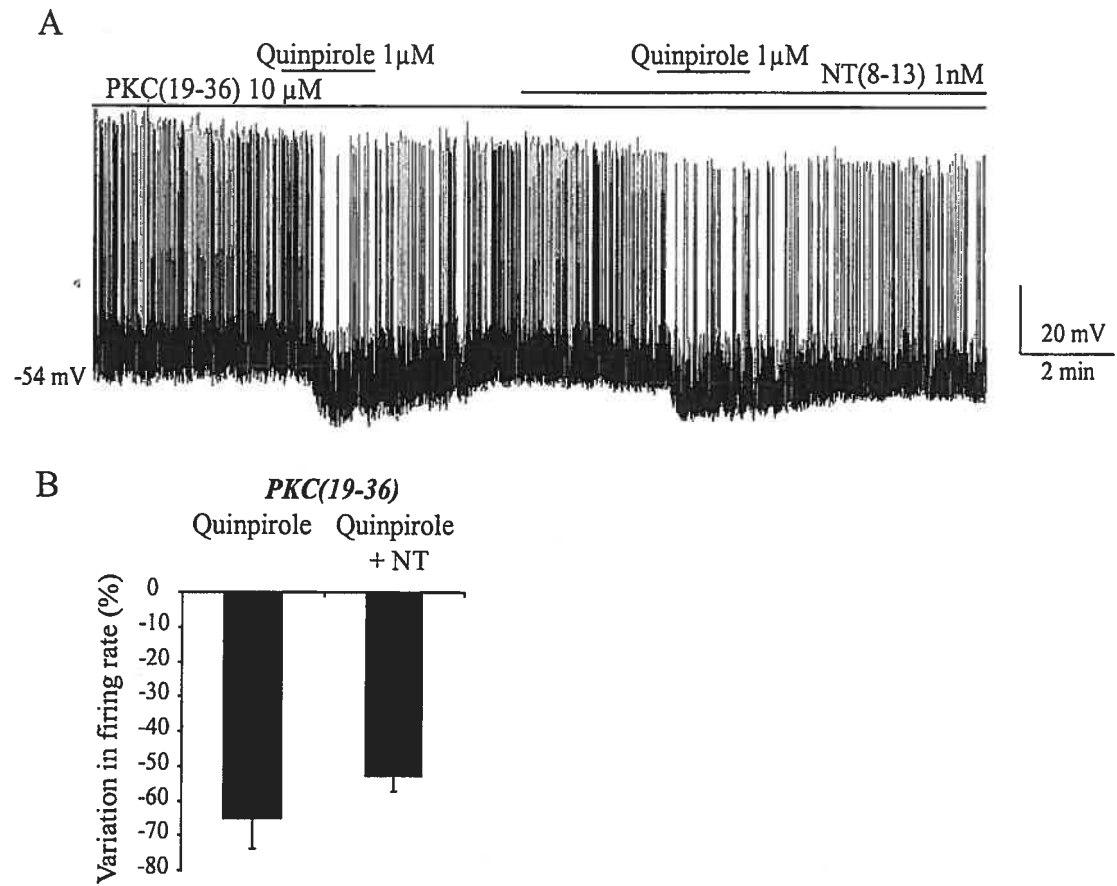
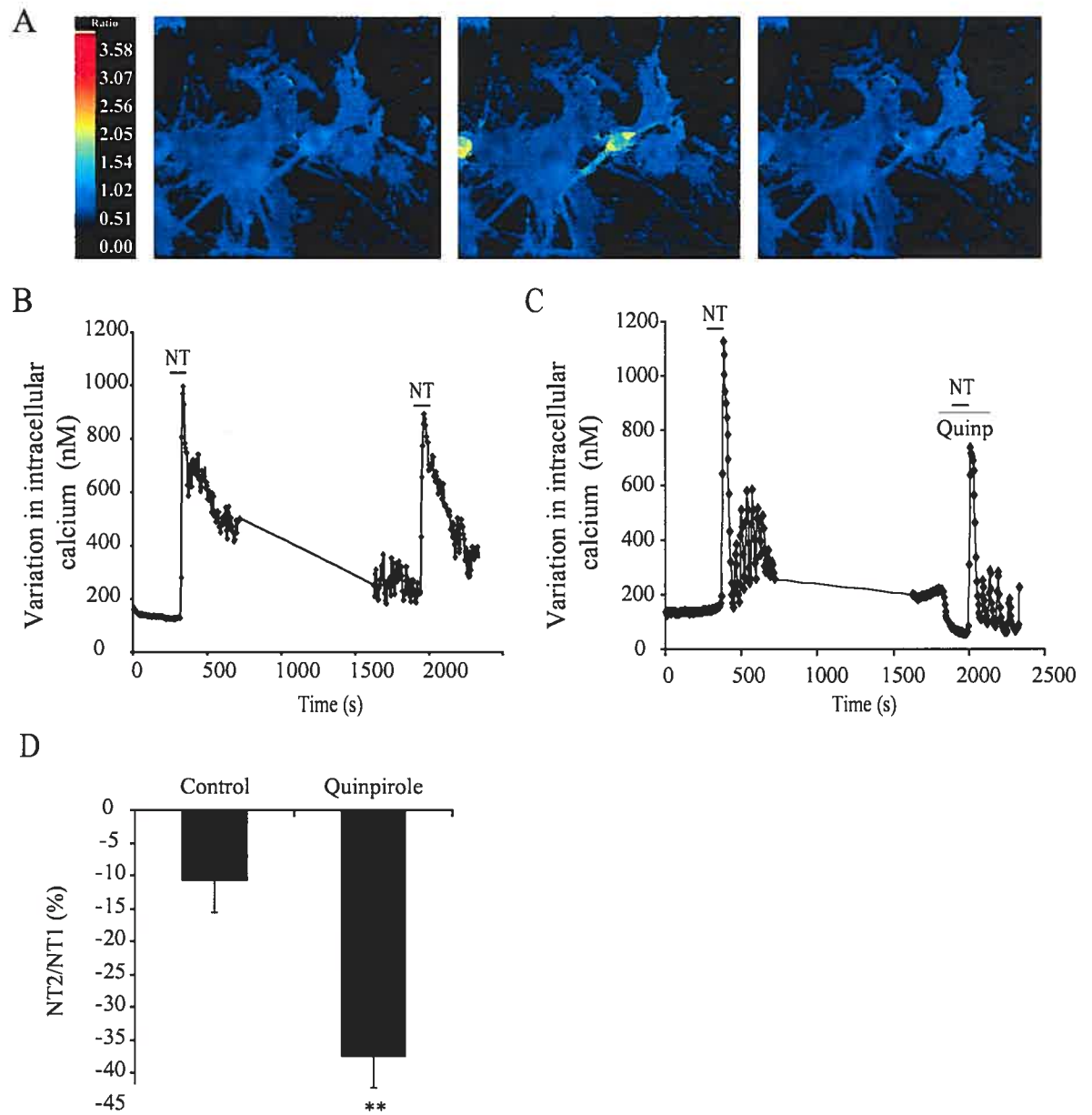


Figure 8.6



TROISIÈME PARTIE
DISCUSSION ET CONCLUSION

CHAPITRE 9. Considérations méthodologiques

9.1 Utilisation de la culture cellulaire

De nombreux modèles expérimentaux ont été utilisés afin d'étudier les divers aspects de la fonction du récepteur D2, dont son rôle d'autorécepteur. Depuis la première observation *in vivo* (Kehr et al, 1972), plusieurs études ont confirmé que les agonistes dopaminergiques peuvent réduire la libération et la synthèse de dopamine en agissant sur un autorécepteur de sous-type D2 situé sur les terminaisons des neurones DA (Stoof & Keabian, 1984). En effet, les agonistes pergolide et quinpirole, qui agissent préférentiellement sur le récepteur D2, produisent une réduction substantielle de la libération de dopamine dans le NAc et le striatum, telle que mesurée *in vivo* par voltamétrie (Stamford et al, 1991). Toutefois, on ne peut exclure la possibilité que ces drogues interagissent avec d'autres récepteurs ou que des effets indirects sur le circuit local contribuent aux effets observés sur la libération de dopamine. D'ailleurs, l'expression du récepteur D3 dans certaines régions du striatum riches en terminaisons dopaminergiques (Diaz et al, 1995), ainsi que la capacité de l'agoniste quinpirole à activer ce récepteur, soulèvent la possibilité d'une implication de ce récepteur dans la régulation de la libération de DA. Cependant, les études réalisées sur des souris dont le gène du récepteur D2 a été inactivé ont permis de confirmer la fonction d'autorécepteur au récepteur D2 (Mercuri et al, 1997; L'hirondel et al, 1998) et plus spécifiquement de son isoforme courte (Wang et al, 2000; Centonze et al, 2002). Bien que le récepteur D3 ne soit pas impliqué en tant qu'autorécepteur, il a été démontré qu'il peut réguler la libération de DA en participant à une boucle de rétroaction négative locale (Koeltzow et al, 1998). Le modèle de tranches de cerveaux de striatum a aussi été utilisé afin d'étudier l'auto-inhibition de la libération de DA par les autorécepteurs D2 (Kennedy et al, 1992; Zahniser et al, 1992; Cragg & Greenfield, 1997). Bien que ce type de modèle ne comporte ni les afférences ni les efférences de la région étudiée, il n'en demeure pas moins que le circuit local peut contribuer à la réponse observée.

Le modèle de culture cellulaire et particulièrement celui où les cellules adhèrent sur des micro-gouttes de substrat est un autre modèle permettant l'étude de la modulation de la libération de neurotransmetteur par un autorécepteur. Lorsqu'un seul neurone se développe sur une micro-goutte de substrat, il tend à faire des contacts synaptiques avec lui-même (Sulzer et al, 1998; Joyce &Rayport, 2000; Congar et al, 2002). Les synapses ainsi formées sont appelées «autapses». Il est donc possible de stimuler électriquement ce neurone et d'enregistrer la réponse post-synaptique générée à l'aide de l'électrophysiologie. Toutefois, la libération de dopamine ne provoque pas de courant post-synaptique détectable (Sulzer et al, 1998; Congar et al, 2002) ni *in vivo*, ni *in vitro*. Par contre, il est possible d'enregistrer des courants synaptiques glutamatergiques dans les neurones DA isolés et ces courants sont inhibés par les récepteurs D2 terminaux (Sulzer et al, 1998; Joyce &Rayport, 2000). Ce modèle apparaît donc avantageux pour étudier la fonction d'autorécepteur du récepteur D2 terminal. D'abord, il s'agit d'un système simplifié qui permet d'isoler l'effet direct de la stimulation du récepteur D2 terminal sur la libération de glutamate des effets indirects associés à des boucles de rétroaction ou aux circuits locaux. Par contre, il est possible que les mécanismes de régulation présynaptique de la libération de glutamate par le récepteur D2 diffèrent de ceux impliqués dans la régulation de dopamine. Une façon de confirmer les observations observées par les courants autaptiques serait d'évaluer directement la libération de dopamine par HPLC.

Par ailleurs, le modèle de culture permet la surexpression de récepteurs. Il est donc possible d'étudier le comportement d'une seule isoforme du récepteur D2 à la fois, contrairement aux modèles dérivés des souris modifiées génétiquement. Les souris générées par transgénèse expriment soit les deux isoformes (témoin), soit le récepteur D2S uniquement (D2L^{-/-}) ou aucun des deux isoformes (D2^{-/-}). La fonction du récepteur D2L a donc été déduite par la comparaison des effets d'un agoniste dans les trois modèles. Les effets absents dans le modèle de souris (D2L^{-/-}) ont ainsi été associés aux récepteurs D2L. Suite à ces études, la fonction d'autorécepteur a été attribué à l'isoforme courte du

récepteur D2 (Wang et al, 2000; Centonze et al, 2002). Toutefois la complexité de ces modèles de souris ne permet pas d'expliquer la plus grande efficacité du D2S à réguler la libération de DA. La surexpression de chacune des isoformes dans un modèle de culture primaire de neurones sur micro-goutte de substrat permet d'aborder cette question.

La seconde fonction associée à l'autorécepteur D2 est sa capacité de réguler la fréquence de décharge des neurones DA. Cette propriété de l'autorécepteur D2 somatodendritique a été caractérisée à la fois *in vivo* et *in vitro*. Même si le patron de décharge des neurones dopaminergiques diffère selon le modèle expérimental choisi, puisqu'il dépend à la fois des propriétés intrinsèques des neurones et des contacts synaptiques qu'ils reçoivent, l'inhibition du taux de décharge en réponse à un agoniste D2 est une réponse robuste et reproductible, quel que soit le modèle expérimental étudié (revu dans Mercuri et al, 1992). Cette réponse propre aux neurones DA peut donc être utilisée comme critère d'identification et s'avère un choix judicieux pour une étude fonctionnelle du récepteur D2. De plus, l'expression du récepteur D2 dans un autre type neuronal est suffisante pour générer une inhibition de la fréquence de décharge en réponse à l'agoniste, ce qui n'est pas le cas des systèmes d'expression hétérologues non neuronaux.

Même si les conditions de culture sont très différentes de l'environnement tissulaire duquel les neurones ont été isolés, la culture cellulaire a comme avantage de présenter un environnement accessible à la manipulation et un accès direct des agents utilisés aux neurones. Toutefois, un des inconvénients de la culture neuronale est l'absence des cibles post-synaptiques. En effet, lors de la mise en culture, les neurones de la région isolée se développent et établissent de nouvelles connections synaptiques entre eux de façon aléatoire. La régulation exercée par l'élément post-synaptique dans les régions de projection est absente. Il est toujours possible afin de minimiser cet effet de faire des co-cultures d'un noyau et d'une de ces cibles (ex. VTA et noyau acumbens).

Néanmoins, ce modèle semble donc tout à fait approprié pour l'étude des mécanismes intracellulaires expliquant l'efficacité des isoformes du récepteur D2 à réguler

la fréquence de décharge. Finalement, contrairement aux systèmes d'expression hétérologue dérivés de cellules immortalisées, la culture permet aussi l'étude de phénomènes de ciblage cellulaire, puisque les neurones sont des cellules polarisées avec des domaines de spécialisation cellulaire.

9.2 Transfection

Le développement de la biologie moléculaire au cours des dernières années a mis à notre disposition de nouvelles approches expérimentales permettant de manipuler l'expression des gènes. Ces techniques peuvent s'avérer particulièrement utiles lorsque les outils pharmacologiques disponibles manquent de spécificité, comme c'est le cas pour les deux isoformes du récepteur D2 qui montrent un profil pharmacologique similaire (Castro & Strange, 1993; Leysen et al, 1993). L'étude fonctionnelle de l'une ou l'autre des isoformes dans un système d'expression naturelle s'avère donc virtuellement impossible, puisque les deux isoformes issues du même gène sont toujours exprimées même si leur proportion peut varier d'un tissu à l'autre ou d'une région à l'autre du cerveau (Giros et al, 1989; Chronwall et al, 1994; Khan et al, 1998).

La génération d'un système d'expression hétérologue est l'une des approches permettant d'éviter ce problème. À l'opposé des «systèmes d'expression naturelle», les «systèmes d'expression hétérologue» expriment le récepteur uniquement après transfection ou infection. Parmi les systèmes d'expression hétérologue couramment utilisés, notons les lignées cellulaires HEK293 et NIH 3T3 (dérivées de carcinomes humains), de même que les cellules COS, CHO et HeLa. Ces lignées cellulaires sont le résultat de la sélection de transfectants stables et l'ensemble des cellules mis en culture possède le récepteur. Ces modèles ont d'ailleurs été utilisés pour identifier des différences entre les variants d'épissage du récepteur D2 quant à leur liaison et leur fonction. Les résultats obtenus à l'aide de ces modèles ont démontré le couplage préférentiel de chacune des isoformes à des

sous-types de protéines $G_{i/o}$, notamment pour inhiber l'activité de l'adénylyl cyclase (Montmayeur et al, 1993) ou encore pour moduler certains canaux sensibles au voltage (Liu et al, 1994; 1996; 1999; Wolfe & Morris, 1999). Bien qu'une spécificité de couplage ait été notée dans chacun des modèles d'expression hétérologue, celle-ci diffère d'un modèle à l'autre. Par exemple, il a été démontré dans les cellules JEG3 que l'isoforme longue du récepteur D2 se couple plus efficacement à une protéine G de type $G_{\alpha_{i2}}$ pour inhiber l'activité de l'adénylyl cyclase (Guiramand et al, 1995), tandis que cette même isoforme se couple plus efficacement à une protéine $G_{\alpha_{i3}}$ dans les cellules GH4C1 (Senogles, 1994). La divergence entre la spécificité de couplage décrite, d'un modèle cellulaire à l'autre, peut aussi s'expliquer par la différence de voie de signalisation étudiée (Albert, 2002).

Les différences observées peuvent être en partie expliquées par l'environnement cellulaire différent d'une lignée cellulaire à l'autre. Le type de protéines G et leur localisation en micro-domaines ainsi que la présence de protéines accessoires ayant la capacité de réguler l'interaction récepteur/protéine G ou protéine G/effecteur, sont déterminés par l'environnement cellulaire (Sato et al, 1995). Il est possible aussi que la différence de niveau d'expression soit directement en cause. En effet, les travaux de Zhu et collaborateurs (Zhu et al, 1994) ont montré que quatre différents récepteurs couplés à une protéine G_s , le récepteur V2 de la vasopressine, le récepteur à l'hormone lutéinisante et les récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques, ne sont pas en mesure d'activer la PLC lorsqu'ils sont exprimés à de faibles niveaux dans les cellules L. Par contre, ces mêmes récepteurs peuvent se coupler efficacement à une protéine G_q et activer la PLC lorsque sont fortement exprimés. Il semble donc que certains RCPG qui ont la capacité d'activer diverses protéines G peuvent montrer un couplage préférentiel et que ce couplage puisse être modifié par le niveau d'expression des récepteurs.

Tel que mentionné à la section précédente, le modèle expérimental choisi est un modèle de culture primaire de neurones. Ce type de modèle ne permet pas la sélection de transfectants stables et la génération d'une lignée cellulaire où l'ensemble de la population

de cellules exprime le récepteur de façon homogène. Toutefois, plusieurs méthodes de transfection transitoire se sont révélées efficaces pour le transfert d'ADN dans des neurones en culture (revu dans (Washbourne &McAllister, 2002) dont la co-précipitation au phosphate de calcium (Xia et al, 1996; Watanabe et al, 1999; Passafaro et al, 2003), l'électroporation (Teruel et al, 1999; Dityateva et al, 2003), les transporteurs lipidiques d'ADN (Kaech et al, 1996; Ma et al, 2002), et finalement les nombreux vecteurs viraux (revu dans Craig, 1998). Chaque méthode, cependant, comporte des limitations. Les méthodes virales c'est-à-dire celles employant des virus (Semliki Forest, Sindbis ou encore le virus Herpes simplex) comme vecteurs d'expression sont celles qui généralement montrent les meilleurs taux de transfection. Toutefois la toxicité pour les neurones est l'une des sérieuses limitations de ces méthodes. De plus, la génération des vecteurs viraux exige du temps et de nombreux efforts et la taille de l'insert d'ADN est limitée sans parler des risques associés à la manipulation des virus (revu dans Washbourne &McAllister, 2002). Les méthodes «chimiques» de transfection, regroupant la co-précipitation au phosphate de calcium et la lipofection, sont habituellement plus simples et moins coûteuses mais leur efficacité est relativement faible. Récemment, il a été rapporté que le transfert de gène dans les neurones par la nucléofection s'avère efficace (Dityateva et al, 2003). Cependant, trois inconvénients majeurs limitent l'utilisation de cette approche. La première est son coût élevé, la seconde est qu'elle exige un grand nombre de cellules et la troisième est que les neurones doivent être transfectés avant leur mise en culture. La dernière limitation est un inconvénient majeur particulièrement pour l'utilisation de neurones matures. Enfin, les méthodes «physiques» telle que l'électroporation, l'approche balistique et la microinjection sont se révélées plutôt inefficaces sur les modèles de culture primaire de neurones (révisé dans (Washbourne &McAllister, 2002). Les deux premières approches en plus d'être relativement toxiques pour les neurones exigent beaucoup d'optimisation. Quant à la microinjection, elle requiert beaucoup d'habileté et permet la transfection de seulement un petit nombre de neurones à la fois (Washbourne &McAllister, 2002). Tous les obstacles

techniques associés à la transfection de neurones en culture ont donc occasionné des difficultés dans l'expression courante de protéines exogènes pour les études fonctionnelles.

Le choix de la méthode de transfection est avant tout dicté par les buts expérimentaux. Il est certain que la méthode idéale devrait être efficace pour la transfection de neurones en culture primaire, devrait permettre la transfection de constructions d'ADN de taille variable et finalement devrait rendre possible la co-transfection de plusieurs constructions. Elle devrait aussi montrer une faible toxicité, être sécuritaire et facile d'utilisation. Suite à des essais infructueux avec la méthode de lipofection, la co-précipitation au phosphate de calcium s'est avérée le meilleur choix pour la transfection des isoformes du récepteur D2 dans notre modèle de culture primaire de neurones du mésencéphale. Bien que le taux de transfection demeure limité, cette méthode a l'avantage de permettre une expression de longue durée dans les neurones permettant ainsi l'enregistrement électrophysiologique de neurones matures. Puisque cette méthode permet une co-transfection efficace, elle offre plusieurs possibilités, dont le contrôle des niveaux d'expression en modifiant la proportion du vecteur d'intérêt par rapport à un vecteur témoin.

9.3 Modèle de souris TH-EGFP

Le modèle de culture primaire de neurones du mésencéphale provenant de souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente EGFP sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase est décrit dans le deuxième article présenté, de même que les principaux avantages et inconvénients liés à son utilisation. Il est aussi à noter que ce modèle demeure un modèle de culture cellulaire et est donc sujet aux mêmes limitations que celles exposées à la section 9.1.

Les neurones dopaminergiques du mésencéphale expriment de façon endogène le récepteur D2 de la dopamine (Schalling et al, 1990; Goldstein et al, 1990; Jomphe et al,

2003), ainsi que de nombreux autres récepteurs dont le récepteur NTS1 de la neurotensine (Palacios & Kuhar, 1981; Szigethy & Beaudet, 1989; Dana et al, 1991). La mise en culture de ces neurones représente donc un «système d'expression naturelle» permettant d'étudier la régulation de la fonction du récepteur D2, dont celle exercée par le récepteur NTS1 de la neurotensine. Bien que l'interaction entre deux récepteurs puisse être étudiée et caractérisée dans un système d'expression hétérologue, l'interprétation des résultats peut en être biaisée. En effet, la surexpression des récepteurs peut en soi être à l'origine d'interactions entre les récepteurs et certaines composantes de la membrane qui ne sont normalement pas recrutées par les récepteurs endogènes (Kenakin, 1997). C'est pourquoi l'utilisation d'un système d'expression naturelle présente un net avantage en plus de représenter un environnement cellulaire qui se rapproche davantage des conditions observées *in vivo*.

Il faut aussi mentionner que le comportement des récepteurs dans un tel modèle correspond à celui de récepteurs murins. Malgré la grande homologie entre les récepteurs humains et ceux de la souris, il est possible que l'espèce soit à l'origine de légères différences. Par exemple, il a été démontré qu'un même ligand pouvait se comporter à la fois comme un agoniste (Sarret et al, 1998) et un antagoniste (Vita et al, 1998; Richard et al, 2001) du récepteur NTS2 selon l'espèce à partir de laquelle le récepteur a été isolé.

CHAPITRE 10. Equivalence des isoformes du récepteur D2 dans leur fonction d'autorécepteur : implications et perspectives.

Dans la première étude présentée, l'expression des récepteurs EGFP-D2S et EGFP-D2L dans des neurones en culture primaire a révélé que les deux isoformes du récepteur D2 étaient aussi efficaces l'une que l'autre à agir comme autorécepteur somatodendritique ou terminal. En effet, les deux variants d'épissage du récepteur D2 inhibent l'excitabilité neuronale et la libération de neurotransmetteur de façon équivalente. Ces résultats sont en accord avec la localisation subcellulaire observée pour chaque isoforme, puisque les neurones transfectés montrent une expression du récepteur EGFP-D2L ou EGFP-D2S à la fois dans leur axone et leur compartiment somatodendritique. Toutefois, nous n'avons pas vérifié à l'aide de marquage immunocytochimique la présence des deux isoformes dans les terminaisons et si cette proportion diffère entre les deux isoformes.

Il semble que le rôle préférentiel d'autorécepteur attribué au récepteur D2S dans les études *in vivo* réalisées sur des souris n'exprimant pas l'isoforme longue (D2L^{-/-}) (Wang et al, 2000; Uziel et al, 2000) ne dépende pas simplement d'une meilleure efficacité de couplage entre cette isoforme et les conductances ioniques impliquées dans la régulation de l'excitabilité neuronale et la libération de neurotransmetteur. Une meilleure explication veut que le rôle d'autorécepteur préférentiel du D2S résulte plutôt de son expression dominante dans les neurones dopaminergiques (Khan et al, 1998). En effet, puisque les deux isoformes sont exprimées par les neurones dopaminergiques et sont aussi efficace l'un que l'autre à agir comme autorécepteur lorsqu'exprimées à un niveau d'expression similaire, le rôle préférentiel d'autorécepteur préférentiel du récepteur D2S ne peut qu'être lié à sa plus grande densité d'expression.

Dans un premier temps, il était important de vérifier si l'efficacité des isoformes à se coupler aux effecteurs impliqués dans la fonction d'autorécepteur n'était pas dépendante d'un niveau d'expression différent entre le D2S et le D2L dans notre modèle. La

quantification de la densité de récepteurs exprimés à la membrane s'avère toutefois problématique puisque seulement 1 à 5 % des neurones expriment les récepteurs fusionnés à la EGFP après transfection et qu'il est impossible d'isoler sélectivement ces neurones transfectés pour en préparer des membranes et faire des essais de liaison. Dans un premier temps, la densité d'expression des isoformes dans les neurones transfectés a été évaluée par une quantification de l'intensité de la fluorescence primaire émise par la EGFP. Bien que cette méthode ne permette pas de discriminer les récepteurs exprimés à la surface de ceux retenus dans les compartiments intracellulaires, elle peut néanmoins donner une estimation de la densité relative des récepteurs EGFP-D2S et EGFP-D2L. Suite à cette estimation, il ne semblait pas y avoir de différence marquée entre les niveaux d'expression des isoformes du récepteur D2 couplés à la EGFP. Un marquage des récepteurs de surface aura permis de tenir compte uniquement des récepteurs fonctionnels dans les études de localisation. Malheureusement, la localisation subcellulaire des récepteurs dans les compartiments somatodendritique et axonal se base sur la co-localisation avec des protéines cytoplasmiques propres à ces compartiments ce qui requiert la perméabilisation des membranes.

Dans un deuxième temps, afin de s'assurer qu'un couplage préférentiel d'une des deux isoformes aux effecteurs impliqués dans la fonction d'autorécepteur n'était pas masqué par un effet de surexpression, les récepteurs EGFP-D2S et EGFP-D2L ont été co-transfectés avec un vecteur encodant la EGFP dans une proportion de 1/10. La co-transfection, qui avait pour but de réduire la densité d'expression des récepteurs, n'a pas modifié l'amplitude des effets produits après la stimulation de l'un ou l'autre des variants d'épissage du récepteur D2. Même si la réduction de la densité de récepteurs n'a pu être évaluée suite à la co-transfection, il est fort probable que la celle-ci ait réduit la quantité de récepteurs EGFP-D2S et EGFP-D2L exprimés dans les neurones transfectés. Ces résultats permettent donc d'exclure la possibilité d'un couplage préférentiel du D2S aux effecteurs régulant l'excitabilité neuronale et la libération de neurotransmetteur.

L'amplitude d'une réponse produite par l'activation d'un récepteur dépend de la densité des récepteurs, mais aussi de l'efficacité de couplage du récepteur avec son effecteur. Une seconde hypothèse pouvant expliquer le rôle préférentiel d'autorécepteur attribué au D2S *in vivo* est que celui-ci montre une meilleure efficacité de couplage aux conductances ioniques régulant la fréquence de décharge. Si tel était le cas, l'amplitude de la réponse mesurée, ici la réduction de la fréquence de décharge, devrait être plus importante dans les neurones transfectés avec le EGFP-D2S que dans ceux exprimant le EGFP-D2L suite à une stimulation avec une même concentration non saturante d'agoniste. Toutefois, la comparaison de l'amplitude de la réduction du taux de décharge des neurones transfectés provoquée par l'activation des deux isoformes n'a pas mis en évidence de différence d'efficacité de couplage lors de la stimulation à une dose sous maximale d'agoniste. Cependant, la seule concentration d'agoniste utilisée s'est avérée non saturante, de sorte qu'une relation dose-réponse complète n'a pu être établie. Puisque que des différences d'efficacité de signalisation entre deux récepteurs se traduisent parfois par de légères différences quant à leur position sur l'axe horizontal d'une telle relation, on ne peut totalement exclure cette possibilité. La concentration efficace à 50% (EC50) est un autre indicateur de l'efficacité de couplage d'un récepteur : plus celle-ci est faible, plus le récepteur est efficace à traduire l'activation induite par l'agoniste en réponse cellulaire. Même si cet indicateur est déterminé à l'aide de la relation concentration-réponse, nous avons observé qu'à une concentration de 1 nM de l'agoniste quinpirole les deux variants d'épissage du récepteur D2 produisent une réponse d'amplitude de près de 50% de la réponse maximale et que celle-ci n'est pas statistiquement différente entre les deux récepteurs. Cette observation, pour indirecte qu'elle soit, va à l'encontre d'une efficacité de couplage préférentiel comme explication du rôle d'autorécepteur attribué au seul récepteur D2S.

Puisque le récepteur D2 est aussi exprimé de façon post-synaptique dans les régions de projection des neurones dopaminergiques, notamment dans la striatum, il était

intéressant de vérifier, dans un deuxième temps, l'efficacité des isoformes à agir comme récepteur post-synaptique. Comme il a été démontré sur des neurones isolés de striatum que l'activation du récepteur D2 peut induire une mobilisation calcique (Hernandez-Lopez et al, 2000), une réponse observée aussi dans différentes lignées cellulaires (Vallar et al, 1990; Tang et al, 1994; Ghahremani et al, 1999), cette réponse a été évaluée dans les neurones transfectés exprimant le récepteur EGFP-D2S ou EGFP-D2L. Malheureusement, la stimulation de chacune des isoformes du récepteur D2, même avec une très forte concentration d'agoniste (quinpirole 50 μ M), n'a pas produit de mobilisation calcique et ce même dans les neurones dopaminergiques. En fait nous avons plutôt observé une diminution du niveau basal de calcium intracellulaire suite à l'activation de chacune des isoformes du récepteur D2 que nous n'avons pas caractérisée. Il ne s'agit pas d'un problème de détection du signal, puisque qu'une telle réponse a pu être mesurée en réponse à la neurotensine dans ce modèle (St-Gelais et al, 2004). La cause la plus probable de cette absence de réponse est qu'un élément essentiel faisait défaut dans l'environnement cellulaire des neurones en culture. En effet, il a été démontré que la co-activation du récepteur D2 avec le D1 serait nécessaire pour produire la mobilisation calcique (Lee et al, 2004). Puisque dans notre modèle, le récepteur D1 n'est pas exprimé (Boyson et al, 1986; Mengod et al, 1991), il serait intéressant de vérifier si la co-expression du récepteur D1 par co-transfection avec chacune des isoformes du récepteur D2 permettrait la mobilisation calcique. Advenant une réponse positive, il serait alors possible de vérifier si l'amplitude de cette réponse diffère selon l'isoforme avec laquelle le récepteur D2 aura été co-exprimé.

Il est à noter que notre étude a été réalisée à l'aide de vecteurs encodant la version courte et longue du récepteur D2 humain couplé dans son extrémité N-terminale à une EGFP. Bien que l'addition d'épitope se soit avérée une approche expérimentale utile dans les études fonctionnelles des RCPG (von Zastrow & Kobilka, 1992; Fritze & Anderson, 2000; Gomes et al, 2001), elle n'est pas sans limitations. En effet, la contrainte majeure à l'addition d'un épitope de reconnaissance comme la GFP et ses variantes est qu'elle peut altérer les propriétés fonctionnelles du récepteur (revu dans Kallal & Benovic, 2000). La

fusion de la GFP à l'extrémité C-terminale d'un RCPG provoque un encombrement stérique qui peut modifier le couplage du récepteur à la protéine G, l'association du récepteur à certains partenaires intracellulaires en plus d'influencer le transport du récepteur vers la membrane (Hall et al, 1999; Bockaert et al, 2004). En contrepartie, la conjugaison de la GFP à l'extrémité N-terminale pourrait théoriquement altérer la liaison de l'agoniste au récepteur. Cependant, cet inconvénient peut se résoudre par l'ajout d'un peptide de liaison (linker) entre la GFP et le récepteur, réduisant ainsi l'encombrement stérique causé par la GFP en N-terminale. Malgré tout, il est important de vérifier que le comportement des récepteurs chimériques se compare à celui des récepteurs natifs. La validation des constructions des récepteurs EGFP-D2S et EGFP-D2L dans les cellules HEK293, a démontré que ces récepteurs inhibent la production d'AMPC de façon identique aux récepteurs natifs à une densité d'expression similaire (Sedaghat, 2006). Il est peu probable qu'une interférence de la EGFP contribue aux effets mesurés dans notre modèle. Toutefois, elle pourrait interférer avec l'adressage des récepteurs vers la membrane. Cette éventualité pourrait être écartée en comparant la localisation cellulaire d'un même récepteur lorsque couplé à la GFP en N-terminal, en C-terminal ou encore à des épitopes de plus petite taille (ex. HA, flag, his). De plus, l'utilisation de vecteurs codant chacune des isoformes couplés à des épitopes différents permettrait de vérifier si leur expression dans un même neurone montre un profil d'expression subcellulaire semblable.

Il est bien connu que l'efficacité thérapeutique des antipsychotiques utilisés dans le traitement de la schizophrénie corrèle avec leur affinité pour le récepteur D2. Toutefois le développement d'effets secondaires de type extrapyramidaux après la prise d'antipsychotiques typiques est aussi tributaire de l'activation des récepteurs D2. Tandis que les effets bénéfiques reflètent l'inhibition des autorécepteurs D2, les effets non désirés sur les mouvements volontaires dépendent de l'inhibition des récepteurs D2 situés dans le striatum. À la lumière des résultats sur le rôle différentiel des isoformes du récepteurs D2 (Wang et al, 2000; Centonze et al, 2002), le développement d'un antagoniste qui aurait une action sélective sur le récepteur D2S pourrait en principe réduire l'incidence des

symptômes extrapyramidaux généralement associés aux antipsychotiques à forte affinité pour les récepteurs D2. Puisque le profil pharmacologique et le site de liaison des deux isoformes du récepteur D2 sont similaires, le développement traditionnel de nouveaux antagonistes ne semble pas une méthode prometteuse. Si le rôle d'autorécepteur préférentiel attribué au récepteur D2S avait été le résultat de sa plus grande efficacité à se coupler aux voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'excitabilité neuronale et la libération de neurotransmetteur, une avenue intéressante aurait été l'utilisation d'oligonucléotides antisens. L'utilité thérapeutique de certains oligonucléotides antisens comme modulateur de l'épissage alternatif a en effet été démontré (revu dans Sazani & Kole, 2003). Malheureusement nos observations ne vont pas dans ce sens.

Plusieurs questions demeurent encore sans réponse. Par exemple : (1) Quels sont les mécanismes qui contrôlent l'épissage alternatif du récepteur D2? (2) Comment expliquer l'expression préférentielle de l'isoforme D2S dans les neurones dopaminergiques? (3) Le ratio D2S/D2L change-t-il au cours du développement, en condition pathologique ou encore suite à un traitement chronique avec des ligands sélectifs pour le récepteur D2? Autant de questions qui pourraient constituer la suite de nos travaux.

CHAPITRE 11 Régulation bidirectionnelle des récepteurs D2 et NTS1 dans les neurones dopaminergiques : implications et perspectives.

La dernière étude présentée a été réalisée à l'aide d'un modèle de culture primaire de neurones provenant du mésencéphale de souris qui expriment la GFP sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase (article 3). Cette étude rapporte trois observations majeures quant à l'interaction *in vitro* entre les récepteurs D2 de la dopamine et NTS1 de la neurotensine. Elle démontre d'abord que la neurotensine, par l'activation du récepteur NTS1, peut réduire efficacement la fonction de l'autorécepteur D2 dans les neurones dopaminergiques en culture et ce de façon indépendante de son effet sur l'excitabilité neuronale. En second lieu, nous avons constaté que l'interaction entre les récepteurs D2 et NTS1 nécessite le Ca^{2+} et l'activation de la PKC. Finalement, nous avons montré que l'interaction entre les récepteurs D2 et NTS1 n'est pas à sens unique mais bien bidirectionnelle.

Trois principales hypothèses de travail ont été émises afin d'expliquer les mécanismes moléculaires à l'origine de l'interaction entre les récepteurs D2 et NTS1 (Fig 8.1). Puisque la neurotensine, via l'activation du récepteur NTS1, a un effet excitateur sur les neurones DA (Palacios & Kuhar, 1981; Pinnock, 1985; Seutin et al, 1989; St-Gelais et al, 2004 ;Jomphe et al, 2005) et que l'activation du récepteur D2 entraîne un effet inverse (Lacey et al, 1987;Mercuri et al, 1989; Roeper et al, 1990; Chiodo & Kapatos, 1992; Jomphe et al, 2005), une possibilité est que l'interaction entre les deux récepteurs résulte de leur action opposée sur les conductances ioniques régulant l'excitabilité des neurones DA. Il a été démontré en effet que la neurotensine peut inhiber une conductance potassique activée par le récepteur D2 dans les neurones dopaminergiques en culture (Farkas et al, 1997).

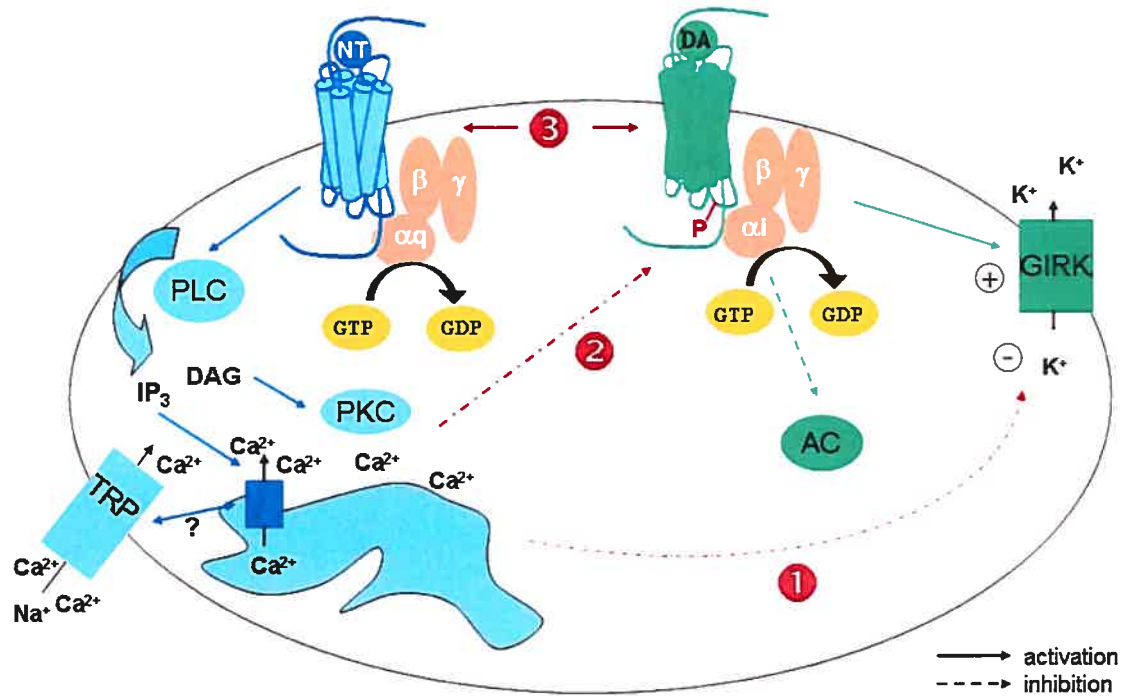


Figure 11.1 Principales hypothèses expliquant les mécanismes moléculaires à l'origine de l'interaction entre les récepteurs D2 et NTS1. 1) Action opposée des récepteurs D2 et NTS1 sur des conductances ioniques régulant l'excitabilité des neurones DA. 2) Désensibilisation hétérologue du récepteur D2 impliquant les seconds messagers activés par le récepteur NTS1, comme par exemple la PKC. 3) Oligomérisation des récepteur D2 et NTS1.

Même si l'activité des canaux ioniques influençant l'excitabilité des neurones DA n'a pas été directement mesurée dans les études présentées ici, les résultats obtenus lors de l'étude de l'interaction entre les récepteurs D2 et NTS1 permettent d'écarter cette possibilité. Ces résultats suggèrent que l'effet excitateur de la neurotensine n'est pas impliqué dans l'interaction puisqu'il est possible de bloquer l'effet excitateur de la neurotensine sans interférer avec l'interaction. En effet, nous avons montré qu'en présence d'héparine, un antagoniste des récepteurs à l'IP₃, l'interaction est maintenue tandis que l'effet excitateur de la neurotensine est complètement bloqué. Il semble donc que ces deux mécanismes soient indépendants. Par ailleurs, il a été démontré que la neurotensine peut réduire de façon efficace l'effet inhibiteur des agonistes du récepteur D2 sur l'excitabilité neuronale même à des concentrations où ce peptide ne peut augmenter la taux de décharge par lui-même (Shi & Bunney, 1990; 1992a; Nalivaiko et al, 1998; Werkman et al, 2000). Il faut toutefois mentionner qu'il a été démontré dans les cellules HEK que l'activation de la PKC- δ réduit la conductance de canaux GIRK de type Kir3.1/3.2 (Brown et al, 2005). Par contre, l'existence d'un tel mécanisme dans les neurones demeure à déterminer.

La seconde hypothèse mise de l'avant est que la stimulation du récepteur NTS1 par l'activation de seconds messagers, notamment la PKC, puisse réguler la capacité du récepteur D2 à signaler par l'entremise d'un phénomène de désensibilisation hétérologue. Cette hypothèse se base sur deux séries d'observations. D'une part, il a été démontré que l'activation de la PKC peut induire une désensibilisation du récepteur D2 dans les cellules HEK293 (Namkung & Sibley, 2004). D'autre part, le récepteur NTS1 est couplé par une protéine G_q à la voie de signalisation de la PKC via la production d'IP₃ et l'activation de la PLC (revu dans Hermans & Maloteaux, 1998). Puisque la PKC est impliquée dans la désensibilisation hétérologue de nombreux RCPG (Haga et al, 1996; et al, 1996; Zhang et al, 1996; Hipkin et al, 2000), nous avons donc évalué la possibilité que la régulation de la fonction du récepteur D2 par le récepteur NTS1 soit la conséquence d'une désensibilisation hétérologue dépendant de l'activation de la PKC. Les résultats obtenus avec un inhibiteur

peptidique sélectif de la PKC confirment le rôle de la PKC dans l'interaction entre ces deux récepteurs. Toutefois nos résultats ne permettent pas de conclure que la PKC induit une désensibilisation du récepteur D2 par l'intermédiaire d'une action directe sur ce récepteur. Les expériences complémentaires pourraient être réalisées afin de confirmer cette hypothèse. Dans un premier temps, il serait important de démontrer que la stimulation du récepteur NTS1 dans notre modèle augmente la phosphorylation du récepteur D2 et que cet effet est spécifique à la PKC. Dans un deuxième temps, une approche de co-transfection du récepteur NTS1 avec des versions du récepteur D2 dans lesquelles les sites consensus de phosphorylation par la PKC ont été mutés (Namkung & Sibley, 2004) permettrait de prouver directement l'implication de la PKC dans le découplage fonctionnel du récepteur D2 induit par le récepteur NTS1.

Cependant, les mécanismes à l'origine de la désensibilisation hétérologue ne sont pas encore très bien compris. Il est donc probable que plusieurs mécanismes, en plus de la phosphorylation du récepteur D2 par la PKC, puissent contribuer à ce processus. Par exemple nous avons déjà mentionné dans la discussion de l'article la possibilité que la PKC puisse produire son effet par la phosphorylation d'une GRK et ainsi favoriser la désensibilisation homologue du récepteur D2. Il semble en effet que la GRK2, la principale GRK impliquée dans l'internalisation du récepteur D2 (Ito et al, 1999; Iwata et al, 1999; Kim et al, 2001), puisse être directement phosphorylée par la PKC (Chuang et al, 1995). D'autre part, la PKC augmente la capacité de la GRK2 à interagir avec le récepteur (Mundell, 2004), ce qui se traduit par une augmentation de sa capacité à induire la désensibilisation (Chuang et al, 1996).

Bien que l'inhibition de la PKC par l'inhibiteur peptidique PKC(19-36) bloque de façon significative la régulation du récepteur D2 exercée par le récepteur NTS1, il est possible que d'autres protéines kinases activées par les seconds messagers participent à la désensibilisation hétérologue (revu dans Ferguson, 2001). Puisqu'il a été démontré par des enregistrements extracellulaires des neurones dopaminergiques dans un modèle de tranche

du mésencéphale de rat qu'un inhibiteur de la PKA (H8) prévient la régulation de la fonction du récepteur D2 exercée par la neurotensine (Shi & Bunney, 1992b), des expériences complémentaires ont été réalisées afin de vérifier l'implication de la PKA dans l'interaction des récepteurs D2 et NTS1 dans notre modèle (Jomphe et Trudeau, résultats non publiés). L'inclusion du Rp-cAMPS, un inhibiteur compétitif de la PKA, dans la pipette de patch n'a pas modifié la réponse induite par le quinpirole sur la fréquence de décharge des neurones DA (Rp-cAMPS+ Q = inhibition de 83.0 ± 8.0 %). Toutefois, la présence de Rp-cAMPS a atténué la régulation exercée par le récepteur NTS1 sur le récepteur D2 puisque la seconde réponse au quinpirole en présence de neurotensine n'était pas significativement différente de la première en absence de neurotensine (Rp-cAMPS+ Q+ NT = inhibition de 67.5 ± 15.6 %, n=5, test de Student pour observations paires P=0.17). Cependant, ces résultats sont préliminaires. Il serait important d'augmenter le nombre d'observations avant de conclure à un rôle de la PKA dans l'interaction observée entre les récepteurs D2 et NTS1. Il n'est pas impossible qu'une grande variabilité masque l'effet réel du Rp-cAMPS. Par ailleurs, il serait important de confirmer cette observation en vérifiant si un activateur de la PKA peut mimer la régulation de la fonction du récepteur D2 exercée par le récepteur NTS1. Si toutefois la PKA participe à cette interaction, il est peu probable que cela implique une phosphorylation directe du récepteur D2. En effet, il a été démontré que l'activation de la PKA n'a aucun effet sur la phosphorylation du récepteur D2 (Namkung & Sibley, 2004).

Par ailleurs, les résultats obtenus avec le BAPTA, un chélateur de calcium, suggèrent que le calcium soit requis pour que l'interaction entre les récepteurs D2 et NTS1 puisse avoir lieu. Il est probable que l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire induite par l'activation du récepteur NTS1 participe à l'activation de la PKC. Toutefois, le calcium est impliqué dans plusieurs voies de signalisation intracellulaire et régule notamment l'activité de la calmoduline. À la lumière d'une étude récente démontrant que la calmoduline peut se lier à un motif de la troisième boucle intracellulaire du récepteur D2 pour réduire l'efficacité du récepteur D2 à inhiber l'adénylyl cyclase (Park et al, 2005),

une possibilité est que l'activation de la calmoduline participe au découplage fonctionnel du récepteur D2 induit par la neurotensine. Afin d'évaluer cette possibilité, un bloqueur de la calmoduline (W7, 100 μ M) a été inclus dans la solution intrapipette. La présence du W7 n'a pas modifié la réponse induite par le quinpirole sur la fréquence de décharge (W7+ Q = inhibition de 85.6 ± 6.5 %) et n'a pas été en mesure de prévenir l'effet de la neurotensine sur l'amplitude de la réponse au quinpirole (W7+ Q+NT= inhibition de 71.3 ± 8.8 %, n=5, test de Student pour observations paires P=0.01) (Jomphe et Trudeau, résultats non publiés). Ces observations sont à l'encontre d'une implication de la calmoduline dans l'interaction entre les récepteurs D2 et NTS1. Néanmoins, il serait intéressant pour appuyer ces résultats de vérifier si l'activation de la calmoduline en soi peut mimer l'interaction entre les récepteurs D2 et NTS1.

La dernière hypothèse envisagée est qu'une interaction directe entre les deux récepteurs soit à l'origine de la régulation de la fonction du récepteur D2 par le récepteur NTS1. Cette hypothèse a été initialement proposée par von Euler (von Euler, 1991) qui a montré que la neurotensine diminue l'affinité du récepteur D2 pour la DA et les agonistes dopaminergiques (von Euler et al, 1989; Fuxe et al, 1992). Bien qu'une interaction directe entre les récepteurs D2 et NTS1 reste à démontrer, la capacité du récepteur D2 à hétérodimériser avec d'autres RGCP, dont le A2A de l'adénosine (Fuxe et al, 1998; Hillion et al, 2002; Canals et al, 2003; Kamiya et al, 2003), le récepteur SST5 de la somatostatine (Rocheville et al, 2000) et le récepteur cannabinoïde CB1 (Kearn et al, 2005), est maintenant bien établie. D'ailleurs, les données montrant que l'hétérodimérisation du récepteur D2 avec le récepteur A2A est responsable de la désensibilisation hétérologue du récepteur D2 après la stimulation du récepteur A2A (Yang et al, 1995; Salim et al, 2000; Hillion et al, 2002) supportent cette hypothèse. Cependant, le modèle expérimental que nous avons utilisé ne permet pas d'évaluer une telle possibilité qui ne peut donc être exclue pour le moment.

Toutefois, il serait possible d'évaluer cette possibilité dans un système d'expression hétérologue où une majorité de cellules peuvent exprimer les deux récepteurs chimériques après transfection. Pour ce faire, il faudrait produire de nouveaux vecteurs d'expression encodant le récepteur NTS1 lié à CFP (donneur) et le récepteur D2 fusionné à la YFP (accepteur), ou l'inverse, et pouvoir utiliser une approche de FRET (fluorescence resonance energy transfert). Cette approche se basant sur le transfert d'énergie est en effet toute indiquée pour la détection d'interactions moléculaires. Si une telle interaction se produit entre les deux récepteurs chimériques, l'énergie accumulée par la CFP sera transférée au second fluorophore, la YFP, permettant ainsi son excitation (revu dans Trugnan et al, 2004). L'augmentation de l'intensité de la fluorescence de la YFP représenterait alors la formation de complexes entre les deux récepteurs. Afin de confirmer qu'une telle interaction se produit aussi dans les neurones, une approche de co-immunoprécipitation pourrait être utilisée si toutefois des anticorps sélectifs contre chacun des récepteurs deviennent disponibles.

Parmi les mécanismes pouvant expliquer la désensibilisation du récepteur D2 suite à une interaction directe avec le récepteur NTS1, il faudrait considérer la co-internalisation des récepteurs D2 et NTS1. En effet, il est possible que le récepteur NTS1, un récepteur reconnu pour sa capacité à internaliser (Beaudet et al, 1994; Hermans et al, 1997; Jerez et al, 2004), agisse comme chaperonne moléculaire pour favoriser l'internalisation du récepteur D2. Cette hypothèse a déjà fait l'objet d'études préliminaires au par Karine Bouvrée, lors d'un stage d'été au laboratoire. Des cultures primaires de neurones de rat ont été co-transfectées avec les récepteurs NTS1-HA et EGFP-D2S, et la distribution subcellulaire des récepteurs a été évaluée par immunocytochimie et microscopie confocale à l'aide d'anticorps dirigés contre la EGFP et l'épitope HA. Étant donné que nous avons déjà visualisé l'internalisation du récepteur NTS1 (NTS1-GFP, étude réalisée par Catherine Poisson), nous voulions vérifier si l'activation du récepteur NTS1 pouvait favoriser l'internalisation du récepteur D2. Les résultats obtenus suggèrent une interaction entre les

deux récepteurs mais il semble plutôt que ce soit le récepteur D2 qui empêche le ciblage du NTS1 vers la membrane. L'expression exclusivement membranaire du récepteur NTS1-HA a permis la visualisation de son internalisation et de sa redistribution suite à une co-expression avec le récepteur D2. Toutefois, la rétention du récepteur EGFP-D2S dans les compartiments intracellulaires a compliqué la visualisation de l'internalisation du récepteur D2 dans les neurones. Il s'est donc avéré difficile d'évaluer des changements de l'internalisation des récepteurs D2 suite à une stimulation des récepteurs NTS1. Une solution alternative serait l'utilisation d'anticorps reconnaissant des épitopes à la surface des récepteurs ainsi que la mise au point un protocole d'immunocytochimie sans perméabilisation. Il serait également possible d'évaluer l'internalisation par ELISA.

Finalement, notre étude a révélé que l'interaction entre les récepteurs D2 et NTS1 n'est pas à sens unique c'est-à-dire que la stimulation du récepteur D2 peut aussi réduire l'efficacité du récepteur NTS1 à signaler. En fait, nous avons montré que l'activation du récepteur D2 réduit l'efficacité du récepteur NTS1 à produire une mobilisation calcique. Même si l'activation du récepteur D2 réduit le niveau de calcium basal, il est peu probable que cet effet interfère avec la régulation observée puisque la mobilisation calcique induite par le NTS1 dépend de l'activation de récepteurs à l' IP_3 et d'un influx calcique par des canaux cationiques non sélectifs (St Gelais et al, 2004) tandis que le récepteur D2 régule des canaux calciques de type voltage dépendants. Toutefois, afin de confirmer cette hypothèse, il faudrait dans un premier temps identifier les canaux calciques régulés par le récepteur D2 (à l'aide de toxines sélectives); et dans un deuxième temps, vérifier si le blocage de ces canaux modifie la réponse calcique induite par la neurotoxine. Si la réponse n'est pas modulée, l'interaction est réelle.

Bien qu'une étude ait démontré un phénomène semblable dans les cellules hypophysaires de rat (Mémo et al, 1985), les mécanismes responsables de cette régulation demeurent à élucider. Une hypothèse possible permettant d'expliquer la régulation bidirectionnelle est que les deux récepteurs interagissent directement ensemble, ce qui pourrait influencer la signalisation de l'un ou l'autre des récepteurs.

Même si des interactions bidirectionnelles ont été rapportées pour certains récepteurs (Rogers et al, 2000; Shapira et al, 2003; Jerez et al, 2004), nous ne pouvons que spéculer quant à l'implication physiologique d'une telle interaction entre les récepteurs D2 et NTS1. Le récepteur D2 agit comme autorécepteur et exerce une rétroaction négative sur l'activité des neurones DA (Lacey et al, 1987; Chiodo & Kapatos, 1992; Mercuri et al, 1997). Par ailleurs, ce récepteur est reconnu pour montrer une désensibilisation homologue relativement faible (Sibley & Neve, 1997). Sa régulation fonctionnelle par la neurotensine, via l'activation du récepteur NTS1 pourrait représenter un mécanisme additionnel pour réguler l'activité des neurones DA. Les conséquences de la régulation du récepteur NTS1 par le D2 ont été beaucoup moins explorées. Cependant, une telle régulation représenterait un système de rétroaction idéal pour atténuer l'activité excessive des neurones DA puisque qu'une accumulation de DA extracellulaire en plus d'activer directement les autorécepteurs D2 et ses conductances potassiques associées, produirait en même temps une inhibition partielle du système excitateur neurotensinergique.

Conclusion

En résumé, l'ensemble des travaux réalisés a permis de mieux comprendre la régulation de la fonction du récepteur D2 dans les neurones. La régulation physiologique de la signalisation via le récepteur dopaminergique D2 peut s'exercer à divers niveaux impliquant autant l'ARNm que la protéine. Dans un premier temps, nous avons étudié les mécanismes responsables de la fonction d'autorécepteur préférentiel attribué à l'isoforme courte du récepteur D2. Les résultats obtenus suggèrent que l'épissage alternatif n'est pas le mécanisme qui détermine l'efficacité de couplage du récepteur aux voies de signalisation régulant l'excitabilité neuronale et la libération de neurotransmetteur. Il semble donc que le récepteur D2S soit l'autorécepteur préférentiel simplement du fait qu'il est transcrit en plus grande quantité que le D2L dans les neurones dopaminergiques.

La découverte de rôles fonctionnels différents entre les deux isoformes du récepteur D2 (Uziel et al, 2000; Wang et al, 2000) a suscité beaucoup d'intérêt pour le traitement des pathologies associées au système dopaminergique. Puisque le récepteur D2S est l'autorécepteur préférentiel, nous pouvons supposer qu'un antagoniste agissant sélectivement sur ce récepteur provoquerait beaucoup moins d'effets secondaires de type parkinsonien associés aux récepteurs D2 post-synaptiques. À l'opposé, on peut supposer qu'un ciblage préférentiel du récepteur D2L post-synaptique serait favorable dans le traitement des symptômes moteurs observés dans la maladie de Parkinson. Toutefois, aucune étude n'a évalué si les dérèglements de la transmission dopaminergique dans ces pathologies s'accompagnent de changements dans le profil d'expression des isoformes du récepteur D2 dans le cerveau.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la régulation de la fonction d'autorécepteur du récepteur D2 suite à l'activation d'un autre récepteur, celui de la neurotensine. Les mécanismes de régulation hétérologue impliquant les récepteurs membranaires découlent habituellement directement des cascades de signalisation qu'ils activent. Il semble dans le cas présent que la désensibilisation hétérologue du récepteur D2 par le récepteur NTS1 implique le calcium et nécessite l'activation de la PKC.

Il a été suggéré que la neurotensine pourrait être un antipsychotique endogène (revu dans (St-Gelais et al, 2006). Nous pouvons donc se demander si cette propriété de la neurotensine dépend de son action sur le récepteur dopaminergique D2. Et si tel était le cas, il serait intéressant de déterminer si cette action est différente selon l'isoforme du récepteur D2 étudié. En effet, il a déjà été démontré dans les cellules CHO que les récepteurs D2S et D2L peuvent être régulés différemment par la PKC (Choi et al, 1999), un effecteur important dans la régulation exercée par le récepteur NTS1 sur la fonction du récepteur D2.

BIBLIOGRAPHIE

- Abi-Dargham, A., Gil, R., Krystal, J., Baldwin, R.M., Seibyl, J.P., Bowers, M., van Dyck, C.H., Charney, D.S., Innis, R.B. & Laruelle, M. (1998) Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. *Am J Psychiatry*, 155, 761-7.
- Adell, A. & Artigas, F. (2004) The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev*, 28, 415-31.
- Aghajanian, G.K. & Bunney, B.S. (1977) Dopamine "autoreceptors": pharmacological characterization by microiontophoretic single cell recording studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 297, 1-7.
- Aghajanian, G.K. & Marek, G.J. (2000) Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res Brain Res Rev*, 31, 302-12.
- Agnati, L.F., Fuxe, K., Benfenati, F. & Battistini, N. (1983) Neurotensin in vitro markedly reduces the affinity in subcortical limbic 3H-N-propylnorapomorphine binding sites. *Acta Physiol Scand*, 119, 459-61.
- Aizman, O., Brismar, H., Uhlen, P., Zettergren, E., Levey, A.I., Forssberg, H., Greengard, P. & Aperia, A. (2000) Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci*, 3, 226-30.
- Albert, P.R. (2002) G protein preferences for dopamine D2 inhibition of prolactin secretion and DNA synthesis in GH4 pituitary cells. *Mol Endocrinol*, 16, 1903-11.
- Almenoff, J., Wilk, S. & Orlowski, M. (1981) Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 102, 206-14.

- Andersen, O.M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C.A., Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., Bales, K.R., Cappai, R., Masters, C.L., Gliemann, J., Mufson, E.J., Hyman, B.T., Paul, S.M., Nykjaer, A. & Willnow, T.E. (2005) Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13461-6.
- Ariano, M.A., Wang, J., Noblett, K.L., Larson, E.R. & Sibley, D.R. (1997) Cellular distribution of the rat D1B receptor in central nervous system using anti-receptor antisera. *Brain Res*, 746, 141-50.
- Artymyshyn, R.P., Ivins, K.J., Monks, B.R., Luedtke, R.R. & Molinoff, P.B. (1992) Quantitation of isotypes of D2 receptors using solution hybridization. *Neurochem Int*, 20 Suppl, 189S-195S.
- Atwater, J.A., Wisdom, R. & Verma, I.M. (1990) Regulated mRNA stability. *Annu Rev Genet*, 24, 519-41.
- Beaudet, A., Mazella, J., Nouel, D., Chabry, J., Castel, M.N., Laduron, P., Kitabgi, P. & Faure, M.P. (1994) Internalization and intracellular mobilization of neurotensin in neuronal cells. *Biochem Pharmacol*, 47, 43-52.
- Beckstead, M.J., Grandy, D.K., Wickman, K. & Williams, J.T. (2004) Vesicular dopamine release elicits an inhibitory postsynaptic current in midbrain dopamine neurons. *Neuron*, 42, 939-46.
- Beitz, A.J. (1982) The sites of origin brain stem neurotensin and serotonin projections to the rodent nucleus raphe magnus. *J Neurosci*, 2, 829-42.
- Benne, R. (1996) RNA editing: how a message is changed. *Curr Opin Genet Dev*, 6, 221-31.
- Benoit-Marand, M., Borrelli, E. & Gonon, F. (2001) Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics in vivo. *J Neurosci*, 21, 9134-41.

- Bergson, C., Mrzljak, L., Smiley, J.F., Pappy, M., Levenson, R. & Goldman-Rakic, P.S. (1995) Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci*, 15, 7821-36.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V. & Greenamyre, J.T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 3, 1301-6.
- Binda, A.V., Kabbani, N. & Levenson, R. (2005) Regulation of dense core vesicle release from PC12 cells by interaction between the D2 dopamine receptor and calcium-dependent activator protein for secretion (CAPS). *Biochem Pharmacol*, 69, 1451-61.
- Binder, E.B., Kinkead, B., Owens, M.J. & Nemeroff, C.B. (2001) Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacol Rev*, 53, 453-86.
- Bjorklof, K., Lundstrom, K., Abuin, L., Greasley, P.J. & Cotecchia, S. (2002) Co- and posttranslational modification of the alpha(1B)-adrenergic receptor: effects on receptor expression and function. *Biochemistry*, 41, 4281-91.
- Björklund A. & Hökfelt T. (1984) *Handbook of chemical neuroanatomy: Classifical neurotransmitters in the CNS. Part I.* Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Blaha, C.D. & Phillips, A.G. (1992) Pharmacological evidence for common mechanisms underlying the effects of neurotensin and neuroleptics on in vivo dopamine efflux in the rat nucleus accumbens. *Neuroscience*, 49, 867-77.
- Bockaert, J., Fagni, L., Dumuis, A. & Marin, P. (2004) GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther*, 103, 203-21.
- Bofill-Cardona, E., Kudlacek, O., Yang, Q., Ahorn, H., Freissmuth, M. & Nanoff, C. (2000) Binding of calmodulin to the D2-dopamine receptor reduces receptor signaling by arresting the G protein activation switch. *J Biol Chem*, 275, 32672-80.
- Botto, J.M., Chabry, J., Sarret, P., Vincent, J.P. & Mazella, J. (1998) Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 243, 585-90.

- Botto, J.M., Guillemare, E., Vincent, J.P. & Mazella, J. (1997) Effects of SR 48692 on neurotensin-induced calcium-activated chloride currents in the *Xenopus* oocyte expression system: agonist-like activity on the levocabastine-sensitive neurotensin receptor and absence of antagonist effect on the levocabastine insensitive neurotensin receptor. *Neurosci Lett*, 223, 193-6.
- Boudin, H., Pelaprat, D., Rostene, W. & Beaudet, A. (1996) Cellular distribution of neurotensin receptors in rat brain: immunohistochemical study using an antipeptide antibody against the cloned high affinity receptor. *J Comp Neurol*, 373, 76-89.
- Boudin, H., Pelaprat, D., Rostene, W., Pickel, V.M. & Beaudet, A. (1998) Correlative ultrastructural distribution of neurotensin receptor proteins and binding sites in the rat substantia nigra. *J Neurosci*, 18, 8473-84.
- Bouthenet, M.L., Souil, E., Martres, M.P., Sokoloff, P., Giros, B. & Schwartz, J.C. (1991) Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res*, 564, 203-19.
- Bouvier, M. (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci*, 2, 274-86.
- Bowyer, J.F. & Weiner, N. (1989) K⁺ channel and adenylate cyclase involvement in regulation of Ca²⁺-evoked release of. *J Pharmacol Exp Ther*, 248, 514-20.
- Boyson, S.J., McGonigle, P. & Molinoff, P.B. (1986) Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *J Neurosci*, 6, 3177-88.
- Breier, A., Su, T.P., Saunders, R., Carson, R.E., Kolachana, B.S., de Bartolomeis, A., Weinberger, D.R., Weisenfeld, N., Malhotra, A.K., Eckelman, W.C. & Pickar, D. (1997) Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 2569-74.
- Broussolle, E. & Thobois, S. (2002) [Genetic and environmental factors of Parkinson's disease]. *Rev Neurol (Paris)*, 158, 11-23.

- Brown, S.G., Thomas, A., Dekker, L.V., Tinker, A. & Leaney, J.L. (2005) PKC-delta sensitizes Kir3.1/3.2 channels to changes in membrane phospholipid levels after M3 receptor activation in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289, C543-56.
- Bunzow, J.R., Van Tol, H.H., Grandy, D.K., Albert, P., Salon, J., Christie, M., Machida, C.A., Neve, K.A. & Civelli, O. (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature*, 336, 783-7.
- Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S.R., Neve, K., Fuxe, K., Agnati, L.F., Woods, A.S., Ferre, S., Lluís, C., Bouvier, M. & Franco, R. (2003) Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem*, 278, 46741-9.
- Canonico, P.L., Speciale, C., Sortino, M.A. & Scapagnini, U. (1985) Involvement of arachidonate metabolism in neurotensin-induced prolactin release in vitro. *Am J Physiol*, 249, E257-63.
- Carlsson, A. (1988) The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 1, 179-86.
- Carraway, R. & Leeman, S.E. (1973) The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem*, 248, 6854-61.
- Cass, W.A. & Zahniser, N.R. (1991) Potassium channel blockers inhibit D2 dopamine, but not A1 adenosine, receptor-mediated inhibition of striatal dopamine release. *J Neurochem*, 57, 147-52.
- Castro, S.W. & Strange, P.G. (1993) Differences in the ligand binding properties of the short and long versions of the D2 dopamine receptor. *J Neurochem*, 60, 372-5.
- Cathala, L. & Paupardin-Tritsch, D. (1997) Neurotensin inhibition of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in the rat substantia nigra pars compacta implicates the protein kinase C pathway. *J Physiol*, 503 (Pt 1), 87-97.
- Centonze, D., Gubellini, P., Usiello, A., Rossi, S., Tschertter, A., Bracci, E., Erbs, E., Tognazzi, N., Bernardi, G., Pisani, A., Calabresi, P. & Borrelli, E. (2004) Differential contribution of dopamine D2S and D2L receptors in the modulation of glutamate and GABA transmission in the striatum. *Neuroscience*, 129, 157-66.

- Centonze, D., Usiello, A., Gubellini, P., Pisani, A., Borrelli, E., Bernardi, G. & Calabresi, P. (2002) Dopamine D2 receptor-mediated inhibition of dopaminergic neurons in mice lacking D2L receptors. *Neuropsychopharmacology*, 27, 723-6.
- Chabry, J., Gaudriault, G., Vincent, J.P. & Mazella, J. (1993) Implication of various forms of neurotensin receptors in the mechanism of internalization of neurotensin in cerebral neurons. *J Biol Chem*, 268, 17138-44.
- Chalon, P., Vita, N., Kaghad, M., Guillemot, M., Bonnin, J., Delpech, B., Le Fur, G., Ferrara, P. & Caput, D. (1996) Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site. *FEBS Lett*, 386, 91-4.
- Checler, F., Barelli, H., Kitabgi, P. & 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.
- Checler, F., Barelli, H. & Vincent, J.P. (1989) Tissue distribution of a novel neurotensin-degrading metallopeptidase. An immunological approach using monospecific polyclonal antibodies. *Biochem J*, 257, 549-54.
- Checler, F., Vincent, J.P. & Kitabgi, P. (1986) Purification and characterization of a novel neurotensin-degrading peptidase from rat brain synaptic membranes. *J Biol Chem*, 261, 11274-81.
- Chen, C. & Lokhandwala, M.F. (1993) Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase in rat renal proximal tubules by dopamine involved DA-1 receptor activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 347, 289-95.
- Chio, C.L., Drong, R.F., Riley, D.T., Gill, G.S., Slightom, J.L. & Huff, R.M. (1994) D4 dopamine receptor-mediated signaling events determined in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 269, 11813-9.
- Chiodo, L.A. & Kapatos, G. (1992) Membrane properties of identified mesencephalic dopamine neurons in primary dissociated cell culture. *Synapse*, 11, 294-309.
- Choi, E.Y., Jeong, D., Won, K., Park & Baik, J.H. (1999) G protein-mediated mitogen-activated protein kinase activation by two dopamine D2 receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 256, 33-40.

- Choi, W.S., Machida, C.A. & Ronnekleiv, O.K. (1995) Distribution of dopamine D1, D2, and D5 receptor mRNAs in the monkey brain: ribonuclease protection assay analysis. *Brain Res Mol Brain Res*, 31, 86-94.
- Chronwall, B.M., Dickerson, D.S., Huerter, B.S., Sibley, D.R. & Millington, W.R. (1994) Regulation of heterogeneity in D2 dopamine receptor gene expression among individual melanotropes in the rat pituitary intermediate lobe. *Mol Cell Neurosci*, 5, 35-45.
- Chuang, T.T., Iacovelli, L., Sallese, M. & De Blasi, A. (1996) G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications. *Trends Pharmacol Sci*, 17, 416-21.
- Chuang, T.T., LeVine, H. 3rd & De Blasi, A. (1995) Phosphorylation and activation of beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *J Biol Chem*, 270, 18660-5.
- Chung, K.K., Dawson, V.L. & Dawson, T.M. (2001) The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, 24, S7-14.
- Ciliax, B.J., Nash, N., Heilman, C., Sunahara, R., Hartney, A., Tiberi, M., Rye, D.B., Caron, M.G., Niznik, H.B. & Levey, A.I. (2000) Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. *Synapse*, 37, 125-45.
- Civelli, O., Bunzow, J.R. & Grandy, D.K. (1993) Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 33, 281-307.
- Clagett-Dame, M. & McKelvy, J.F. (1989) N-linked oligosaccharides are responsible for rat striatal dopamine D2 receptor heterogeneity. *Arch Biochem Biophys*, 274, 145-54.
- Cleveland, D.W. & Yen, T.J. (1989) Multiple determinants of eukaryotic mRNA stability. *New Biol*, 1, 121-6.
- Cohen, A.I., Todd, R.D., Harmon, S. & O'Malley, K.L. (1992) Photoreceptors of mouse retinas possess D4 receptors coupled to adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 12093-7.

- Congar, P., Bergevin, A. & Trudeau, L.E. (2002) D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K⁺ channels. *J Neurophysiol*, 87, 1046-56.
- Cragg, S.J. & Greenfield, S.A. (1997) Differential autoreceptor control of somatodendritic and axon terminal dopamine release in substantia nigra, ventral tegmental area, and striatum. *J Neurosci*, 17, 5738-46.
- Craig AM (1998) Transfecting cultured neurons. In Banker, G. & Goslin, K. (eds), *Culturing nerve cells*. pp. 79-111.
- Creese, I., Burt, D.R. & Snyder, S.H. (1976) Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*, 192, 481-3.
- Cussac, D., Newman-Tancredi, A., Pasteau, V. & Millan, M.J. (1999) Human dopamine D(3) receptors mediate mitogen-activated protein kinase activation via a phosphatidylinositol 3-kinase and an atypical protein kinase C-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*, 56, 1025-30.
- Dahlstrom, A. & Fuxe, K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20, 398-9.
- Dal Farra, C., Sarret, P., Navarro, V., Botto, J.M., Mazella, J. & Vincent, J.P. (2001) Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines. *Int J Cancer*, 92, 503-9.
- Dal Toso, R., Sommer, B., Ewert, M., Herb, A., Pritchett, D.B., Bach, A., Shivers, B.D. & Seeburg, P.H. (1989) The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J*, 8, 4025-34.
- Dana, C., Pelaprat, D., Vial, M., Brouard, A., Lhiaubet, A.M. & Rostene, W. (1991) Characterization of neurotensin binding sites on rat mesencephalic cells in primary culture. *Brain Res Dev Brain Res*, 61, 259-64.
- Dauch, P., Masuo, Y., Vincent, J.P. & Checler, F. (1992) Endopeptidase 24-16 in murines: tissue distribution, cerebral regionalization, and ontogeny. *J Neurochem*, 59, 1862-7.
- Dauer, W. & Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39, 889-909.

- Davila, V., Yan, Z., Craciun, L.C., Logothetis, D. & Sulzer, D. (2003) D3 dopamine autoreceptors do not activate G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel currents in substantia nigra dopamine neurons. *J Neurosci*, 23, 5693-7.
- de Quidt, M.E. & Emson, P.C. (1983) Neurotensin facilitates dopamine release in vitro from rat striatal slices. *Brain Res*, 274, 376-80.
- Dearry, A., Gingrich, J.A., Falardeau, P., Fremeau, R.T. Jr, Bates, M.D. & Caron, M.G. (1990) Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature*, 347, 72-6.
- Delle Donne, K.T., Chan, J., Boudin, H., Pelaprat, D., Rostene, W. & Pickel, V.M. (2004) Electron microscopic dual labeling of high-affinity neurotensin and dopamine D2 receptors in the rat nucleus accumbens shell. *Synapse*, 52, 176-87.
- Diaz-Cabiale, Z., Fuxe, K., Narvaez, J.A., Finetti, S., Antonelli, T., Tanganelli, S. & Ferraro, L. (2002) Neurotensin-induced modulation of dopamine D2 receptors and their function in rat striatum: counteraction by a NTR1-like receptor antagonist. *Neuroreport*, 13, 763-6.
- Diaz, J., Levesque, D., Griffon, N., Lammers, C.H., Martres, M.P., Sokoloff, P. & Schwartz, J.C. (1994) Opposing roles for dopamine D2 and D3 receptors on neurotensin mRNA expression in nucleus accumbens. *Eur J Neurosci*, 6, 1384-7.
- Diaz, J., Levesque, D., Lammers, C.H., Griffon, N., Martres, M.P., Schwartz, J.C. & Sokoloff, P. (1995) Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience*, 65, 731-45.
- Diaz, J., Pilon, C., Le Foll, B., Gros, C., Triller, A., Schwartz, J.C. & Sokoloff, P. (2000) Dopamine D3 receptors expressed by all mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci*, 20, 8677-84.
- Di Chiara, G. & Imperato, A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 5274-8.
- Di Chiara, G. & North, R.A. (1992) Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol Sci*, 13, 185-93.

- Dityateva, G., Hammond, M., Thiel, C., Ruonala, M.O., Delling, M., Siebenkotten, G., Nix, M. & Dityatev, A. (2003) Rapid and efficient electroporation-based gene transfer into primary dissociated neurons. *J Neurosci Methods*, 130, 65-73.
- Dobner, P.R., Barber, D.L., Villa-Komaroff, L. & McKiernan, C. (1987) Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 3516-20.
- Dziewczapolski, G., Menalled, L.B., Garcia, M.C., Mora, M.A., Gershanik, O.S. & Rubinstein, M. (1998) Opposite roles of D1 and D5 dopamine receptors in locomotion revealed by selective antisense oligonucleotides. *Neuroreport*, 9, 1-5.
- Ehlers, R.A., Zhang, Y., Hellmich, M.R. & Evers, B.M. (2000) Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 269, 704-8.
- Elde, R., Schalling, M., Ceccatelli, S., Nakanishi, S. & Hokfelt, T. (1990) Localization of neuropeptide receptor mRNA in rat brain: initial observations using probes for neurotensin and substance P receptors. *Neurosci Lett*, 120, 134-8.
- Elton, T.S. & Martin, M.M. (2003) Alternative splicing: a novel mechanism to fine-tune the expression and function of the human AT1 receptor. *Trends Endocrinol Metab*, 14, 66-71.
- Everett, P.B. & Senogles, S.E. (2004) D3 dopamine receptor activates phospholipase D through a pertussis toxin-insensitive pathway. *Neurosci Lett*, 371, 34-9.
- Farkas, R.H., Chien, P.Y., Nakajima, S. & Nakajima, Y. (1996) Properties of a slow nonselective cation conductance modulated by neurotensin and other neurotransmitters in midbrain dopaminergic neurons. *J Neurophysiol*, 76, 1968-81.
- Farkas, R.H., Chien, P.Y., Nakajima, S. & Nakajima, Y. (1997) Neurotensin and dopamine D2 activation oppositely regulate the same K⁺ conductance in rat midbrain dopaminergic neurons. *Neurosci Lett*, 231, 21-4.
- Fassio, A., Evans, G., Grisshammer, R., Bolam, J.P., Mimmack, M. & Emson, P.C. (2000) Distribution of the neurotensin receptor NTS1 in the rat CNS studied using an amino-terminal directed antibody. *Neuropharmacology*, 39, 1430-42.

- Felder, C.C., Albrecht, F.E., Campbell, T., Eisner, G.M. & Jose, P.A. (1993) cAMP-independent, G protein-linked inhibition of Na⁺/H⁺ exchange in renal brush border by D1 dopamine agonists. *Am J Physiol*, 264, F1032-7.
- Felder, C.C., Campbell, T., Albrecht, F. & Jose, P.A. (1990) Dopamine inhibits Na(+)-H⁺ exchanger activity in renal BBMV by stimulation of adenylate cyclase. *Am J Physiol*, 259, F297-303.
- Feldman, R., Meyer, JS. & Quenzer, LF. (1997) Catecholamines. In Feldman, R., Meyer, JS. & Quenzer, LF. (eds), *Principles of Neuropsychopharmacology*. pp. 277-344.
- Ferguson, S.S. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53, 1-24.
- Fishburn, C.S., Elazar, Z. & Fuchs, S. (1995) Differential glycosylation and intracellular trafficking for the long and short isoforms of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem*, 270, 29819-24.
- Forno, L.S. (1996) Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55, 259-72.
- Forno, L.S., Langston, J.W., DeLanney, L.E. & Irwin, I. (1988) An electron microscopic study of MPTP-induced inclusion bodies in an old monkey. *Brain Res*, 448, 150-7.
- Fortin, G.D., Desrosiers, C.C., Yamaguchi, N. & Trudeau, L.E. (2006) Basal somatodendritic dopamine release requires snare proteins. *J Neurochem*, 96, 1740-9.
- Freneau, R.T. Jr, Duncan, G.E., Fornaretto, M.G., Dearry, A., Gingrich, J.A., Breese, G.R. & Caron, M.G. (1991) Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3772-6.
- Fritze, C.E. & Anderson, T.R. (2000) Epitope tagging: general method for tracking recombinant proteins. *Methods Enzymol*, 327, 3-16.
- Fuxe, K., Ferre, S., Zoli, M. & Agnati, L.F. (1998) Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev*, 26, 258-73.

- Fuxe, K., Von Euler, G., Agnati, L.F., Merlo Pich, E., O'Connor, W.T., Tanganelli, S., Li, X.M., Tinner, B., Cintra, A., Carani, C. & et, a.l. (1992) Intramembrane interactions between neurotensin receptors and dopamine D2 receptors as a major mechanism for the neuroleptic-like action of neurotensin. *Ann N Y Acad Sci*, 668, 186-204.
- Gailly, P. (1998) Ca²⁺ entry in CHO cells, after Ca²⁺ stores depletion, is mediated by arachidonic acid. *Cell Calcium*, 24, 293-304.
- Ganz, M.B., Pachter, J.A. & Barber, D.L. (1990) Multiple receptors coupled to adenylate cyclase regulate Na-H exchange independent of cAMP. *J Biol Chem*, 265, 8989-92.
- Gendron, L., Perron, A., Payet, M.D., Gallo-Payet, N., Sarret, P. & Beaudet, A. (2004) Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Mol Pharmacol*, 66, 1421-30.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J. Jr & Sibley, D.R. (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, 250, 1429-32.
- Ghahremani, M.H., Cheng, P., Lembo, P.M. & Albert, P.R. (1999) Distinct roles for Galphai2, Galphai3, and Gbeta gamma in modulation offorskolin- or Gs-mediated cAMP accumulation and calcium mobilization by dopamine D2S receptors. *J Biol Chem*, 274, 9238-45.
- Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M.P., Riou, J.F., Emorine, L.J. & Schwartz, J.C. (1989) Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature*, 342, 923-6.
- Goedert, M., Lightman, S.L., Mantyh, P.W., Hunt, S.P. & Emson, P.C. (1985) Neurotensin-like immunoreactivity and neurotensin receptors in the rat hypothalamus and in the neurointermediate lobe of the pituitary gland. *Brain Res*, 358, 59-69.
- Goldstein, M., Harada, K., Meller, E., Schalling, M. & Hokfelt, T. (1990) Dopamine autoreceptors. Biochemical, pharmacological, and morphological studies. *Ann N Y Acad Sci*, 604, 169-75.

- Gomes, I., Jordan, B.A., Gupta, A., Rios, C., Trapaidze, N. & Devi, L.A. (2001) G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med*, 79, 226-42.
- Grandy, D.K., Marchionni, M.A., Makam, H., Stofko, R.E., Alfano, M., Frothingham, L., Fischer, J.B., Burke-Howie, K.J., Bunzow, J.R., Server, A.C. & et, a.l. (1989) Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 9762-6.
- Grigoriadis, D.E., Niznik, H.B., Jarvie, K.R. & Seeman, P. (1988) Glycoprotein nature of D2 dopamine receptors. *FEBS Lett*, 227, 220-4.
- Grunewald, S., Haase, W., Reilander, H. & Michel, H. (1996) Glycosylation, palmitoylation, and localization of the human D2S receptor in baculovirus-infected insect cells. *Biochemistry*, 35, 15149-61.
- Guiramand, J., Montmayeur, J.P., Ceraline, J., Bhatia, M. & Borrelli, E. (1995) Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins. *J Biol Chem*, 270, 7354-8.
- Gully, D., Canton, M., Boigegrain, R., Jeanjean, F., Molimard, J.C., Poncelet, M., Gueudet, C., Heaulme, M., Leyris, R., Brouard, A. & et, a.l. (1993) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 65-9.
- Gully, D., Labeeuw, B., Boigegrain, R., Oury-Donat, F., Bachy, A., Poncelet, M., Steinberg, R., Suaud-Chagny, M.F., Santucci, V., Vita, N., Pecceu, F., Labbe-Jullie, C., Kalivas, P.W. & Volkow, N.D. (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry*, 162, 1403-13.
- Kitabgi, P., Soubrie, P., Le Fur, G. & Maffrand, J.P. (1997) Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 280, 802-12.
- Haga, K., Kameyama, K., Haga, T., Kikkawa, U., Shiozaki, K. & Uchiyama, H. (1996) Phosphorylation of human m1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J Biol Chem*, 271, 2776-82.

- Hall, R.A., Premont, R.T. & Lefkowitz, R.J. (1999) Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol*, 145, 927-32.
- Hardy, J., Cookson, M.R. & Singleton, A. (2003) Genes and parkinsonism. *Lancet Neurol*, 2, 221-8.
- Hellwinkel, O.J., Holterhus, P.M., Struve, D., Marschke, C., Homburg, N. & Hiort, O. (2001) A unique exonic splicing mutation in the human androgen receptor gene indicates a physiologic relevance of regular androgen receptor transcript variants. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 2569-75.
- Helmeste, D.M. & Tang, S.W. (2000) Dopamine D4 receptors. *Jpn J Pharmacol*, 82, 1-14.
- Hermans, E. & Maloteaux, J.M. (1998) Mechanisms of regulation of neurotensin receptors. *Pharmacol Ther*, 79, 89-104.
- Hermans, E., Vanisberg, M.A., Geurts, M. & Maloteaux, J.M. (1997) Down-regulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons. *Neurochem Int*, 31, 291-9.
- Hernandez-Lopez, S., Tkatch, T., Perez-Garci, E., Galarraga, E., Bargas, J., Hamm, H. & Surmeier, D.J. (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[beta]1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci*, 20, 8987-95.
- Herve, D., Levi-Strauss, M., Marey-Semper, I., Verney, C., Tassin, J.P., Glowinski, J. & Girault, J.A. (1993) G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase. *J Neurosci*, 13, 2237-48.
- Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M.E., Mallol, J., Canela, E.I., Zoli, M., Agnati, L.F., Ibanez, C.F., Lluís, C., Franco, R., Ferre, S. & Fuxe, K. (2002) Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem*, 277, 18091-7.
- Hipkin, R.W., Wang, Y. & Schonbrunn, A. (2000) Protein kinase C activation stimulates the phosphorylation and internalization of the sst2A somatostatin receptor. *J Biol Chem*, 275, 5591-9.

- Hollon, T.R., Bek, M.J., Lachowicz, J.E., Ariano, M.A., Mezey, E., Ramachandran, R., Wersinger, S.R., Soares-da-Silva, P., Liu, Z.F., Grinberg, A., Drago, J., Young, W.S. 3rd, Westphal, H., Jose, P.A. & Sibley, D.R. (2002) Mice lacking D5 dopamine receptors have increased sympathetic tone and are hypertensive. *J Neurosci*, 22, 10801-10.
- Holst, B., Holliday, N.D., Bach, A., Elling, C.E., Cox, H.M. & Schwartz, T.W. (2004) Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem*, 279, 53806-17.
- Huntley, G.W., Morrison, J.H., Prikhozhan, A. & Sealfon, S.C. (1992) Localization of multiple dopamine receptor subtype mRNAs in human and monkey motor cortex and striatum. *Brain Res Mol Brain Res*, 15, 181-8.
- Inagaki, S., Kubota, Y., Shinoda, K., Kawai, Y. & Tohyama, M. (1983a) Neurotensin-containing pathway from the endopiriform nucleus and the adjacent prepiriform cortex to the dorsomedial thalamic nucleus in the rat. *Brain Res*, 260, 143-6.
- Inagaki, S., Shinoda, K., Kubota, Y., Shiosaka, S., Matsuzaki, T. & Tohyama, M. (1983b) Evidence for the existence of a neurotensin-containing pathway from the endopiriform nucleus and the adjacent prepiriform cortex to the anterior olfactory nucleus and nucleus of diagonal band (Broca) of the rat. *Neuroscience*, 8, 487-93.
- Iravani, M.M., Muscat, R. & Kruk, Z.L. (1996) Comparison of somatodendritic and axon terminal dopamine release in the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Neuroscience*, 70, 1025-37.
- Ito, K., Haga, T., Lameh, J. & Sadee, W. (1999) Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5. *Eur J Biochem*, 260, 112-9.
- Iversen, L.L., Iversen, S.D., Bloom, F., Douglas, C., Brown, M. & Vale, W. (1978) Calcium-dependent release of somatostatin and neurotensin from rat brain in vitro. *Nature*, 273, 161-3.
- Iwata, K., Ito, K., Fukuzaki, A., Inaki, K. & Haga, T. (1999) Dynamin and rab5 regulate GRK2-dependent internalization of dopamine D2 receptors. *Eur J Biochem*, 263, 596-602.

- Jacobsen, L., Madsen, P., Jacobsen, C., Nielsen, M.S., Gliemann, J. & Petersen, C.M. (2001) Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chem*, 276, 22788-96.
- Jarvie, K.R., Niznik, H.B. & Seeman, P. (1988) Dopamine D2 receptor binding subunits of Mr congruent to 140,000 and 94,000 in brain: deglycosylation yields a common unit of Mr congruent to 44,000. *Mol Pharmacol*, 34, 91-7.
- Jay, T.M. (2003) Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog Neurobiol*, 69, 375-90.
- Jenner, P. (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3, S26-36; discussion S36-8.
- Jennes, L., Stumpf, W.E. & Kalivas, P.W. (1982) Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J Comp Neurol*, 210, 211-24.
- Jerez, S., Peral de Bruno, M. & Coviello, A. (2004) Cross talk between angiotensin II and alpha 1 adrenergic receptors in rabbit aorta: role of endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol*, 43, 402-9.
- Jiang, H. & Lucy, M.C. (2001) Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. *Gene*, 265, 45-53.
- Jomphe, C., Bourque, M.J., Fortin, G.D., St-Gelais, F., Okano, H., Kobayashi, K. & Trudeau, L.E. (2005) Use of TH-EGFP transgenic mice as a source of identified dopaminergic neurons for physiological studies in postnatal cell culture. *J Neurosci Methods*, 146, 1-12.
- Jomphe, C., Levesque, D. & Trudeau, L.E. (2003) Calcium-dependent, D2 receptor-independent induction of c-fos by haloperidol in dopamine neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 367, 480-9.
- Joyce, M.P. & Rayport, S. (2000) Mesoaccumbens dopamine neuron synapses reconstructed in vitro are glutamatergic. *Neuroscience*, 99, 445-56.
- Kabbani, N., Negyessy, L., Lin, R., Goldman-Rakic, P. & Levenson, R. (2002) Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J Neurosci*, 22, 8476-86.

- Kaech, S., Kim, J.B., Cariola, M. & Ralston, E. (1996) Improved lipid-mediated gene transfer into primary cultures of hippocampal neurons. *Brain Res Mol Brain Res*, 35, 344-8.
- Kalivas, P.W. & Miller, J.S. (1984) Neurotensin neurons in the ventral tegmental area project to the medial nucleus accumbens. *Brain Res*, 300, 157-60.
- Kallal, L. & Benovic, J.L. (2000) Using green fluorescent proteins to study G-protein-coupled receptor localization and trafficking. *Trends Pharmacol Sci*, 21, 175-80.
- Kamiya, T., Saitoh, O., Yoshioka, K. & Nakata, H. (2003) Oligomerization of adenosine A2A and dopamine D2 receptors in living cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 306, 544-9.
- Kearn, C.S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K. & Glass, M. (2005) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol*, 67, 1697-704.
- Kebabian, J.W. & Calne, D.B. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277, 93-6.
- Kehr, W., Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T. & Atack, C. (1972) Evidence for a receptor-mediated feedback control of striatal tyrosine hydroxylase activity. *J Pharm Pharmacol*, 24, 744-7.
- Kenakin, T. (1997) Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor/G protein stoichiometry. *Trends Pharmacol Sci*, 18, 456-64.
- Kendall, R.T. & Senogles, S.E. (2006) Investigation of the alternatively spliced insert region of the D2L dopamine receptor by epitope substitution. *Neurosci Lett*, 393, 155-9.
- Kennedy, R.T., Jones, S.R. & Wightman, R.M. (1992) Dynamic observation of dopamine autoreceptor effects in rat striatal slices. *J Neurochem*, 59, 449-55.
- Khan, Z.U., Gutierrez, A., Martin, R., Penafiel, A., Rivera, A. & de la Calle, A. (2000) Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience*, 100, 689-99.
- Khan, Z.U., Mrzljak, L., Gutierrez, A., de la Calle, A. & Goldman-Rakic, P.S. (1998) Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7731-6.

- Kim, K.M., Nakajima, Y. & Nakajima, S. (1995) G protein-coupled inward rectifier modulated by dopamine agonists in cultured substantia nigra neurons. *Neuroscience*, 69, 1145-58.
- Kim, K.M., Valenzano, K.J., Robinson, S.R., Yao, W.D., Barak, L.S. & Caron, M.G. (2001) Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J Biol Chem*, 276, 37409-14.
- Kim, S.J., Kim, M.Y., Lee, E.J., Ahn, Y.S. & Baik, J.H. (2004) Distinct regulation of internalization and mitogen-activated protein kinase activation by two isoforms of the dopamine D2 receptor. *Mol Endocrinol*, 18, 640-52.
- Kislauskis, E., Bullock, B., McNeil, S. & Dobner, P.R. (1988) The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *J Biol Chem*, 263, 4963-8.
- Kitabgi, P., De Nadai, F., Cuber, J.C., Dubuc, I., Nouel, D. & Costentin, J. (1990) Calcium-dependent release of neuromedin N and neurotensin from mouse hypothalamus. *Neuropeptides*, 15, 111-4.
- Kitabgi, P., Masuo, Y., Nicot, A., Berod, A., Cuber, J.C. & Rostene, W. (1991) Marked variations of the relative distributions of neurotensin and neuromedin N in micropunched rat brain areas suggest differential processing of their common precursor. *Neurosci Lett*, 124, 9-12.
- Kiyama, H., Shiosaka, S., Sakamoto, N., Michel, J.P., Pearson, J. & Tohyama, M. (1986) A neurotensin-immunoreactive pathway from the subiculum to the mammillary body in the rat. *Brain Res*, 375, 357-9.
- Koob, G.F. & Le Moal, M. (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24, 97-129.
- Koeltzow, T.E., Xu, M., Cooper, D.C., Hu, X.T., Tonegawa, S., Wolf, M.E. & White, F.J. (1998) Alterations in dopamine release but not dopamine autoreceptor function in dopamine D3 receptor mutant mice. *J Neurosci*, 18, 2231-8.
- Kudwa, A.E., Dominguez-Salazar, E., Cabrera, D.M., Sibley, D.R. & Rissman, E.F. (2005) Dopamine D5 receptor modulates male and female sexual behavior in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 180, 206-14.

- Kuzhikandathil, E.V. & Oxford, G.S. (1999) Activation of human D3 dopamine receptor inhibits P/Q-type calcium channels and secretory activity in AtT-20 cells. *J Neurosci*, 19, 1698-707.
- L'hirondel, M., Cheramy, A., Godeheu, G., Artaud, F., Saiardi, A., Borrelli, E. & Glowinski, J. (1998) Lack of autoreceptor-mediated inhibitory control of dopamine release in striatal synaptosomes of D2 receptor-deficient mice. *Brain Res*, 792, 253-62.
- Lacey, M.G., Mercuri, N.B. & North, R.A. (1987) Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J Physiol*, 392, 397-416.
- Laitinen, J.T. (1993) Dopamine stimulates K⁺ efflux in the chick retina via D1 receptors independently of adenylyl cyclase activation. *J Neurochem*, 61, 1461-9.
- Landwehrmeyer, B., Mengod, G. & Palacios, J.M. (1993a) Differential visualization of dopamine D2 and D3 receptor sites in rat brain. A comparative study using in situ hybridization histochemistry and ligand binding autoradiography. *Eur J Neurosci*, 5, 145-53.
- Landwehrmeyer, B., Mengod, G. & Palacios, J.M. (1993b) Dopamine D3 receptor mRNA and binding sites in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 18, 187-92.
- Lang, A.E. & Lozano, A.M. (1998a) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*, 339, 1044-53.
- Lang, A.E. & Lozano, A.M. (1998b) Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*, 339, 1130-43.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W. & Irwin, I. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219, 979-80.
- Laruelle, M., Abi-Dargham, A., van Dyck, C.H., Gil, R., D'Souza, C.D., Erdos, J., McCance, E., Rosenblatt, W., Fingado, C., Zoghbi, S.S., Baldwin, R.M., Seibyl, J.P., Krystal, J.H., Charney, D.S. & Innis, R.B. (1996) Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9235-40.

- Lavine, N., Ethier, N., Oak, J.N., Pei, L., Liu, F., Trieu, P., Rebois, R.V., Bouvier, M., Hebert, T.E. & Van Tol, H.H. (2002) G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, 277, 46010-9.
- Le Moine, C., Normand, E. & Bloch, B. (1991) Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4205-9.
- Le Moine, C., Normand, E., Guitteny, A.F., Fouque, B., Teoule, R. & Bloch, B. (1990) Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 230-4.
- Lee, F.J., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chery, N., Wang, Y., Wang, Y.T., Niznik, H.B., Yu, X.M. & Liu, F. (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell*, 111, 219-30.
- Lee, N.H., Earle-Hughes, J. & Fraser, C.M. (1994) Agonist-mediated destabilization of m1 muscarinic acetylcholine receptor mRNA. Elements involved in mRNA stability are localized in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem*, 269, 4291-8.
- Lee, S.P., So, C.H., Rashid, A.J., Varghese, G., Cheng, R., Lanca, A.J., O'Dowd, B.F. & George, S.R. (2004) Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem*, 279, 35671-8.
- Leonetti, M., Brun, P., Clerget, M., Steinberg, R., Soubrie, P., Renaud, B. & Suaud-Chagny, M.F. (2004) Specific involvement of neurotensin type 1 receptor in the neurotensin-mediated in vivo dopamine efflux using knock-out mice. *J Neurochem*, 89, 1-6.
- Lepee-Lorgeoux, I., Betancur, C., Rostene, W. & Pelaprat, D. (1999) Differential ontogenetic patterns of levocabastine-sensitive neurotensin NT2 receptors and of NT1 receptors in the rat brain revealed by in situ hybridization. *Brain Res Dev Brain Res*, 113, 115-31.
- Lester, J., Fink, S., Aronin, N. & DiFiglia, M. (1993) Colocalization of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in striatal neurons. *Brain Res*, 621, 106-10.

- Leysen, J.E., Gommeren, W., Mertens, J., Luyten, W.H., Pauwels, P.J., Ewert, M. & Seeburg, P. (1993) Comparison of in vitro binding properties of a series of dopamine antagonists and agonists for cloned human dopamine D2S and D2L receptors and for D2 receptors in rat striatal and mesolimbic tissues, using. *Psychopharmacology (Berl)*, 110, 27-36.
- Li, X.M., Ferraro, L., Tanganelli, S., O'Connor, W.T., Hasselrot, U., Ungerstedt, U. & Fuxe, K. (1995) Neurotensin peptides antagonistically regulate postsynaptic dopamine D2 receptors in rat nucleus accumbens: a receptor binding and microdialysis study. *J Neural Transm Gen Sect*, 102, 125-37.
- Lindgren, N., Usiello, A., Goigny, M., Haycock, J., Erbs, E., Greengard, P., Hokfelt, T., Borrelli, E. & Fisone, G. (2003) Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4305-9.
- Liu, F., Yang, P., Baez, M. & Ni, B. (2004) Neurotensin negatively modulates Akt activity in neurotensin receptor-1-transfected AV12 cells. *J Cell Biochem*, 92, 603-11.
- Liu, L.X., Burgess, L.H., Gonzalez, A.M., Sibley, D.R. & Chiodo, L.A. (1999) D2S, D2L, D3, and D4 dopamine receptors couple to a voltage-dependent potassium current in N18TG2 x mesencephalon hybrid cell (MES-23.5) via distinct G proteins. *Synapse*, 31, 108-18.
- Liu, L.X., Monsma, F.J. Jr, Sibley, D.R. & Chiodo, L.A. (1996) D2L, D2S, and D3 dopamine receptors stably transfected into NG108-15 cells couple to a voltage-dependent potassium current via distinct G protein mechanisms. *Synapse*, 24, 156-64.
- Liu, Y.F., Civelli, O., Grandy, D.K. & Albert, P.R. (1992) Differential sensitivity of the short and long human dopamine D2 receptor subtypes to protein kinase C. *J Neurochem*, 59, 2311-7.
- Liu, Y.F., Jakobs, K.H., Rasenick, M.M. & Albert, P.R. (1994) G protein specificity in receptor-effector coupling. Analysis of the roles of G0 and Gi2 in GH4C1 pituitary cells. *J Biol Chem*, 269, 13880-6.

- Ma, H., Zhu, J., Maronski, M., Kotzbauer, P.T., Lee, V.M., Dichter, M.A. & Diamond, S.L. (2002) Non-classical nuclear localization signal peptides for high efficiency lipofection of primary neurons and neuronal cell lines. *Neuroscience*, 112, 1-5.
- Maeda, K. & Frohman, L.A. (1981) Neurotensin release by rat hypothalamic fragments in vitro. *Brain Res*, 210, 261-9.
- Manning-Bog, A.B., McCormack, A.L., Li, J., Uversky, V.N., Fink, A.L. & Di Monte, D.A. (2002) The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem*, 277, 1641-4.
- Martin, S., Navarro, V., Vincent, J.P. & Mazella, J. (2002) Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology*, 123, 1135-43.
- Martin, S., Vincent, J.P. & Mazella, J. (2003) Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J Neurosci*, 23, 1198-205.
- May, L.J. & Wightman, R.M. (1989) Effects of D-2 antagonists on frequency-dependent stimulated dopamine overflow in nucleus accumbens and caudate-putamen. *J Neurochem*, 53, 898-906.
- Mazella, J. (2001) Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal*, 13, 1-6.
- Mazella, J., Botto, J.M., Guillemare, E., Coppola, T., Sarret, P. & Vincent, J.P. (1996) Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J Neurosci*, 16, 5613-20.
- Mazella, J., Zsurger, N., Navarro, V., Chabry, J., Kaghad, M., Caput, D., Ferrara, P., Vita, N., Gully, D., Maffrand, J.P. & Vincent, J.P. (1998) The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 273, 26273-6.

- McAllister, G., Knowles, M.R., Ward-Booth, S.M., Sinclair, H.A., Patel, S., Marwood, R., Emms, F., Patel, S., Smith, A., Seabrook, G.R. & et, a.l. (1995) Functional coupling of human D2, D3, and D4 dopamine receptors in HEK293 cells. *J Recept Signal Transduct Res*, 15, 267-81.
- McHale, M., Coldwell, M.C., Herrity, N., Boyfield, I., Winn, F.M., Ball, S., Cook, T., Robinson, J.H. & Gloger, I.S. (1994) Expression and functional characterisation of a synthetic version of the human D4 dopamine receptor in a stable human cell line. *FEBS Lett*, 345, 147-50.
- McNaught, K.S., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P. & Olanow, C.W. (2003) Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 179, 38-46.
- McNaught, K.S., Belizaire, R., Jenner, P., Olanow, C.W. & Isacson, O. (2002) Selective loss of 20S proteasome alpha-subunits in the substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 326, 155-8.
- McNaught, K.S., Perl, D.P., Brownell, A.L. & Olanow, C.W. (2004) Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 56, 149-62.
- Meador-Woodruff, J.H., Mansour, A., Bunzow, J.R., Van Tol, H.H., Watson, S.J. Jr & Civelli, O. (1989) Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7625-8.
- Meador-Woodruff, J.H., Mansour, A., Grandy, D.K., Damask, S.P., Civelli, O. & Watson, S.J. Jr (1992) Distribution of D5 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett*, 145, 209-12.
- Memo, M., Carboni, E., Trabucchi, M., Carruba, M.O. & Spano, P.F. (1985) Dopamine inhibition of neurotensin-induced increase in Ca²⁺ influx into rat pituitary cells. *Brain Res*, 347, 253-7.
- Mengod, G., Vilaro, M.T., Niznik, H.B., Sunahara, R.K., Seeman, P., O'Dowd, B.F. & Palacios, J.M. (1991) Visualization of a dopamine D1 receptor mRNA in human and rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 10, 185-91.

- Mercuri, N.B., Calabresi, P. & Bernardi, G. (1989) The mechanism of amphetamine-induced inhibition of rat substantia nigra compacta neurones investigated with intracellular recording in vitro. *Br J Pharmacol*, 98, 127-34.
- Mercuri, N.B., Calabresi, P. & Bernardi, G. (1992) The electrophysiological actions of dopamine and dopaminergic drugs on neurons of the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. *Life Sci*, 51, 711-8.
- Mercuri, N.B., Saiardi, A., Bonci, A., Picetti, R., Calabresi, P., Bernardi, G. & Borrelli, E. (1997) Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience*, 79, 323-7.
- Mercuri, N.B., Stratta, F., Calabresi, P. & Bernardi, G. (1993) Neurotensin induces an inward current in rat mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci Lett*, 153, 192-6.
- Minneman, K.P. (2001) Splice variants of G protein-coupled receptors. *Mol Interv*, 1, 108-16.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M. & Caron, M.G. (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 78, 189-225.
- Mitchusson, K.D., Blaxall, B.C., Pende, A. & Port, J.D. (1998) Agonist-mediated destabilization of human beta1-adrenergic receptor mRNA: role of the 3' untranslated translated region. *Biochem Biophys Res Commun*, 252, 357-62.
- Miyamoto, S., Mailman, R.B., Lieberman, J.A. & Duncan, G.E. (2001) Blunted brain metabolic response to ketamine in mice lacking D(1A) dopamine receptors. *Brain Res*, 894, 167-80.
- Moga, M.M., Saper, C.B. & Gray, T.S. (1989) Bed nucleus of the stria terminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 283, 315-32.
- Monsma, F.J. Jr, Mahan, L.C., McVittie, L.D., Gerfen, C.R. & Sibley, D.R. (1990) Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6723-7.

- Monsma, F.J. Jr, McVittie, L.D., Gerfen, C.R., Mahan, L.C. & Sibley, D.R. (1989) Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature*, 342, 926-9.
- Montmayeur, J.P., Bausero, P., Amlaiky, N., Maroteaux, L., Hen, R. & Borrelli, E. (1991) Differential expression of the mouse D2 dopamine receptor isoforms. *FEBS Lett*, 278, 239-43.
- Montmayeur, J.P. & Borrelli, E. (1991) Transcription mediated by a cAMP-responsive promoter element is reduced upon activation of dopamine D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3135-9.
- Montmayeur, J.P., Guiramand, J. & Borrelli, E. (1993) Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G-proteins. *Mol Endocrinol*, 7, 161-70.
- Moore, D.J., Dawson, V.L. & Dawson, T.M. (2003) Role for the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease and other neurodegenerative brain amyloidoses. *Neuromolecular Med*, 4, 95-108.
- Moore, D.J., West, A.B., Dawson, V.L. & Dawson, T.M. (2005) Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, 28, 57-87.
- Moran, L.A., Horton, R.H., Ochs, R.S., Scrimgeour, K.G. & Rawn, D. (1994) *Biochemistry* Neil Patterson Publishers, Englewood Cliffs, NJ .
- Morello, J.P. & Bouvier, M. (1996) Palmitoylation: a post-translational modification that regulates signalling from G-protein coupled receptors. *Biochem Cell Biol*, 74, 449-57.
- Morinville, A., Martin, S., Lavallee, M., Vincent, J.P., Beaudet, A. & Mazella, J. (2004) Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 2153-68.
- Morris, A.J. & Malbon, C.C. (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev*, 79, 1373-430.
- Morris, N.J., Ross, S.A., Lane, W.S., Moestrup, S.K., Petersen, C.M., Keller, S.R. & Lienhard, G.E. (1998) Sortilin is the major 110-kDa protein in GLUT4 vesicles from adipocytes. *J Biol Chem*, 273, 3582-7.

- Mrzljak, L., Bergson, C., Pappy, M., Huff, R., Levenson, R. & Goldman-Rakic, P.S. (1996) Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature*, 381, 245-8.
- Nalivaiko, E., Michaud, J.C., Soubrie, P. & Le Fur, G. (1998) Electrophysiological evidence for putative subtypes of neurotensin receptors in guinea-pig mesencephalic dopaminergic neurons. *Neuroscience*, 86, 799-811.
- Namkung, Y. & Sibley, D.R. (2004) Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem*, 279, 49533-41.
- Navarro, V., Martin, S., Sarret, P., Nielsen, M.S., Petersen, C.M., Vincent, J. & Mazella, J. (2001) Pharmacological properties of the mouse neurotensin receptor 3. Maintenance of cell surface receptor during internalization of neurotensin. *FEBS Lett*, 495, 100-5.
- Neve, K.A., Kozlowski, M.R. & Rosser, M.P. (1992) Dopamine D2 receptor stimulation of Na⁺/H⁺ exchange assessed by quantification of extracellular acidification. *J Biol Chem*, 267, 25748-53.
- Ng, G.Y., O'Dowd, B.F., Caron, M., Dennis, M., Brann, M.R. & George, S.R. (1994) Phosphorylation and palmitoylation of the human D2L dopamine receptor in Sf9 cells. *J Neurochem*, 63, 1589-95.
- Nguyen, H.M., Cahill, C.M., McPherson, P.S. & Beaudet, A. (2002) Receptor-mediated internalization of. *Neuropharmacology*, 42, 1089-98.
- Nickenig, G., Michaelsen, F., Muller, C., Berger, A., Vogel, T., Sachinidis, A., Vetter, H. & Bohm, M. (2002) Destabilization of AT(1) receptor mRNA by calreticulin. *Circ Res*, 90, 53-8.
- Nicot, A., Rostene, W. & Berod, A. (1994) Neurotensin receptor expression in the rat forebrain and midbrain: a combined analysis by in situ hybridization and receptor autoradiography. *J Comp Neurol*, 341, 407-19.
- Nicot, A., Rostene, W. & Berod, A. (1995) Differential expression of neurotensin receptor mRNA in the dopaminergic cell groups of the rat diencephalon and mesencephalon. *J Neurosci Res*, 40, 667-74.

- Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Olivecrona, G., Gliemann, J. & Petersen, C.M. (1999) Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem*, 274, 8832-6.
- Niswender, C.M., Sanders-Bush, E. & Emeson, R.B. (1998) Identification and characterization of RNA editing events within the 5-HT_{2C} receptor. *Ann N Y Acad Sci*, 861, 38-48.
- Nomura, A., Iwasaki, Y., Saito, M., Aoki, Y., Yamamori, E., Ozaki, N., Tachikawa, K., Mutsuga, N., Morishita, M., Yoshida, M., Asai, M., Oiso, Y. & Saito, H. (2001) Involvement of upstream open reading frames in regulation of rat V(1b) vasopressin receptor expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280, E780-7.
- Nouel, D., Faure, M.P., St Pierre, J.A., Alonso, R., Quirion, R. & Beaudet, A. (1997) Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors. *J Neurosci*, 17, 1795-803.
- Nouel, D., Sarret, P., Vincent, J.P., Mazella, J. & Beaudet, A. (1999) Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors. *Neuroscience*, 94, 1189-97.
- Oak, J.N., Lavine, N. & Van Tol, H.H. (2001) Dopamine D(4) and D(2L) Receptor Stimulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Is Dependent on trans-Activation of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor. *Mol Pharmacol*, 60, 92-103.
- O'Brien, P.J. & Zatz, M. (1984) Acylation of bovine rhodopsin by. *J Biol Chem*, 259, 5054-7.
- Olds, J. & Milner, P. (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*, 47, 419-27.
- O'Malley, K.L., Harmon, S., Tang, L. & Todd, R.D. (1992) The rat dopamine D4 receptor: sequence, gene structure, and demonstration of expression in the cardiovascular system. *New Biol*, 4, 137-46.
- Onali, P., Mosca, E. & Olanas, M.C. (1992) Presynaptic dopamine autoreceptors and second messengers controlling tyrosine hydroxylase activity in rat brain. *Neurochem Int*, 20 Suppl, 89S-93S.

- Onali, P., Olanas, M.C. & Bunse, B. (1988) Evidence that adenosine A2 and dopamine autoreceptors antagonistically regulate tyrosine hydroxylase activity in rat striatal synaptosomes. *Brain Res*, 456, 302-9.
- Oppermann, M., Freedman, N.J., Alexander, R.W. & Lefkowitz, R.J. (1996) Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J Biol Chem*, 271, 13266-72.
- Orlowski, M., Michaud, C. & Chu, T.G. (1983) A soluble metalloendopeptidase from rat brain. Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. *Eur J Biochem*, 135, 81-8.
- Palacios, J.M. & Kuhar, M.J. (1981) Neurotensin receptors are located on dopamine-containing neurones in rat midbrain. *Nature*, 294, 587-9.
- Parent, J.L., Labrecque, P., Driss Rochdi, M. & Benovic, J.L. (2001) Role of the differentially spliced carboxyl terminus in thromboxane A2 receptor trafficking: identification of a distinct motif for tonic internalization. *J Biol Chem*, 276, 7079-85.
- Park, S.K., Nguyen, M.D., Fischer, A., Luke, M.P., Affar el, B., Dieffenbach, P.B., Tseng, H.C., Shi, Y. & Tsai, L.H. (2005) Par-4 links dopamine signaling and depression. *Cell*, 122, 275-87.
- Passafaro, M., Nakagawa, T., Sala, C. & Sheng, M. (2003) Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature*, 424, 677-81.
- Petaja-Repo, U.E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P. & 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, 4416-23.
- Petersen, C.M., Nielsen, M.S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H.H., Roigaard, H., Gliemann, J., Madsen, P. & Moestrup, S.K. (1997) Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem*, 272, 3599-605.

- Pettibone, D.J., Hess, J.F., Hey, P.J., Jacobson, M.A., Leviten, M., Lis, E.V., Mallorga, P.J., Pascarella, D.M., Snyder, M.A., Williams, J.B. & Zeng, Z. (2002) The effects of deleting the mouse neurotensin receptor NTR1 on central and peripheral responses to neurotensin. *J Pharmacol Exp Ther*, 300, 305-13.
- Pierce, R.C. & Kalivas, P.W. (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev*, 25, 192-216.
- Pierce, K.L. & Regan, J.W. (1998) Prostanoid receptor heterogeneity through alternative mRNA splicing. *Life Sci*, 62, 1479-83.
- Pillai, G., Brown, N.A., McAllister, G., Milligan, G. & Seabrook, G.R. (1998) Human D2 and D4 dopamine receptors couple through betagamma G-protein subunits to inwardly rectifying K⁺ channels (GIRK1) in a Xenopus oocyte expression system: selective antagonism by L-741,626 and L-745,870 respectively. *Neuropharmacology*, 37, 983-7.
- Pindon, A., van Hecke, G., van Gompel, P., Lesage, A.S., Leysen, J.E. & Jurzak, M. (2002) Differences in signal transduction of two 5-HT₄ receptor splice variants: compound specificity and dual coupling with G_αphs- and G_αphai/o-proteins. *Mol Pharmacol*, 61, 85-96.
- Pinnock, R.D. (1985) Neurotensin depolarizes substantia nigra dopamine neurones. *Brain Res*, 338, 151-4.
- Piomelli, D., Pilon, C., Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M.P. & Schwartz, J.C. (1991) Dopamine activation of the arachidonic acid cascade as a basis for D1/D2 receptor synergism. *Nature*, 353, 164-7.
- Poinot-Chazel, C., Portier, M., Bouaboula, M., Vita, N., Pecceu, F., Gully, D., Monroe, J.G., Maffrand, J.P., Le Fur, G. & Casellas, P. (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase couples neurotensin receptor stimulation to induction of the primary response gene Krox-24. *Biochem J*, 320 (Pt 1), 145-51.
- Qanbar, R. & Bouvier, M. (2003) Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol Ther*, 97, 1-33.

- Quirion, R., Chiueh, C.C., Everist, H.D. & Pert, A. (1985) Comparative localization of neurotensin receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic terminals. *Brain Res*, 327, 385-9.
- Quirion, R., Gaudreau, P., St-Pierre, S., Rioux, F. & Pert, C.B. (1982) Autoradiographic distribution of 3H-neurotensin receptors in rat brain: visualization by tritium sensitive film. *Peptides*, 3, 757-63.
- Rappaport, M.S., Sealfon, S.C., Prikhozhan, A., Huntley, G.W. & Morrison, J.H. (1993) Heterogeneous distribution of D1, D2 and D5 receptor mRNAs in monkey striatum. *Brain Res*, 616, 242-50.
- Reinecke, M. (1985) Neurotensin. Immunohistochemical localization in central and peripheral nervous system and in endocrine cells and its functional role as neurotransmitter and endocrine hormone. *Prog Histochem Cytochem*, 16, 1-172.
- Remaury, A., Vita, N., Gendreau, S., Jung, M., Arnone, M., Poncelet, M., Culouscou, J.M., Le Fur, G., Soubrie, P., Caput, D., Shire, D., Kopf, M. & Ferrara, P. (2002) Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res*, 953, 63-72.
- Richard, F., Barroso, S., Martinez, J., Labbe-Jullie, C. & Kitabgi, P. (2001) Agonism, inverse agonism, and neutral antagonism at the constitutively active human neurotensin receptor 2. *Mol Pharmacol*, 60, 1392-8.
- Roberts, G.W., Crow, T.J. & Polak, J.M. (1981) Neurotensin: first report of a cortical pathway. *Peptides*, 2 Suppl 1, 37-43.
- Robinson, T.E. & Berridge, K.C. (2003) Addiction. *Annu Rev Psychol*, 54, 25-53.
- Robinson, S.W. & Caron, M.G. (1997) Selective inhibition of adenylyl cyclase type V by the dopamine D3 receptor. *Mol Pharmacol*, 52, 508-14.
- Rocheville, M., Lange, D.C., Kumar, U., Patel, S.C., Patel, R.C. & Patel, Y.C. (2000) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science*, 288, 154-7.

- Roeper, J., Hainsworth, A.H. & Ashcroft, F.M. (1990) Tolbutamide reverses membrane hyperpolarisation induced by activation of D2 receptors and GABAB receptors in isolated substantia nigra neurones. *Pflugers Arch*, 416, 473-5.
- Rogers, T.J., Steele, A.D., Howard, O.M. & Oppenheim, J.J. (2000) Bidirectional heterologous desensitization of opioid and chemokine receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 917, 19-28.
- Rogue, P., Zwiller, J., Malviya, A.N. & Vincendon, G. (1990) Phosphorylation by protein kinase C modulates agonist binding to striatal dopamine D2 receptors. *Biochem Int*, 22, 575-82.
- Rovere, C., Barbero, P. & Kitabgi, P. (1996) Evidence that PC2 is the endogenous pro-neurotensin convertase in rMTC 6-23 cells and that PC1- and PC2-transfected PC12 cells differentially process pro-neurotensin. *J Biol Chem*, 271, 11368-75.
- Salim, H., Ferre, S., Dalal, A., Peterfreund, R.A., Fuxe, K., Vincent, J.D. & Lledo, P.M. (2000) Activation of adenosine A1 and A2A receptors modulates dopamine D2 receptor-induced responses in stably transfected human neuroblastoma cells. *J Neurochem*, 74, 432-9.
- Samad, T.A., Krezel, W., Chambon, P. & Borrelli, E. (1997) Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 14349-54.
- Sarret, P., Beaudet, A., Vincent, J.P. & Mazella, J. (1998) Regional and cellular distribution of low affinity neurotensin receptor mRNA in adult and developing mouse brain. *J Comp Neurol*, 394, 344-56.
- Sarret, P., Esdaile, M.J., Perron, A., Martinez, J., Stroh, T. & Beaudet, A. (2005) Potent spinal analgesia elicited through stimulation of NTS2 neurotensin receptors. *J Neurosci*, 25, 8188-96.
- Sarret, P., Gendron, L., Kilian, P., Nguyen, H.M., Gallo-Payet, N., Payet, M.D. & Beaudet, A. (2002) Pharmacology and functional properties of NTS2 neurotensin receptors in cerebellar granule cells. *J Biol Chem*, 277, 36233-43.

- Sarret, P., Krzywkowski, P., Segal, L., Nielsen, M.S., Petersen, C.M., Mazella, J., Stroh, T. & Beaudet, A. (2003a) Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 461, 483-505.
- Sarret, P., Perron, A., Stroh, T. & Beaudet, A. (2003b) Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 461, 520-38.
- Sato, M., Kataoka, R., Dingus, J., Wilcox, M., Hildebrandt, J.D. & Lanier, S.M. (1995) Factors determining specificity of signal transduction by G-protein-coupled receptors. Regulation of signal transfer from receptor to G-protein. *J Biol Chem*, 270, 15269-76.
- Sawa, A. & Snyder, S.H. (2002) Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science*, 296, 692-5.
- Sazani, P. & Kole, R. (2003) Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing. *J Clin Invest*, 112, 481-6.
- Schalling, M., Dagerlind, A., Goldstein, M., Ehrlich, M., Greengard, P. & Hokfelt, T. (1990) Comparison of gene expression of the dopamine D-2 receptor and DARPP-32 in rat brain, pituitary and adrenal gland. *Eur J Pharmacol*, 188, 277-81.
- Schinelli, S., Paolillo, M. & Corona, G.L. (1994) Opposing actions of D1- and D2-dopamine receptors on arachidonic acid release and cyclic AMP production in striatal neurons. *J Neurochem*, 62, 944-9.
- Schotte, A., Leysen, J.E. & Laduron, P.M. (1986) Evidence for a displaceable non-specific. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 333, 400-5.
- Schulz, J.B. & Falkenburger, B.H. (2004) Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res*, 318, 135-47.
- Seabrook, G.R., Knowles, M., Brown, N., Myers, J., Sinclair, H., Patel, S., Freedman, S.B. & McAllister, G. (1994) Pharmacology of high-threshold calcium currents in GH4C1 pituitary cells and their regulation by activation of human D2 and D4 dopamine receptors. *Br J Pharmacol*, 112, 728-34.

- Sedaghat, K., Nantel, M.F., Ginsberg, S., Lalonde, V. & Tiberi, M. (2006) Molecular characterization of dopamine D2 receptor isoforms tagged with green fluorescent protein. *Mol Biotechnol*, 34, 1-14.
- Seeman, P. (1987) Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse*, 1, 133-52.
- Seeman, P., Lee, T., Chau-Wong, M. & Wong, K. (1976) Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature*, 261, 717-9.
- Senogles, S.E. (1994) The D2 dopamine receptor isoforms signal through distinct Gi alpha proteins to inhibit adenylyl cyclase. A study with site-directed mutant Gi alpha proteins. *J Biol Chem*, 269, 23120-7.
- Seroogy, K.B., Mehta, A. & Fallon, J.H. (1987) Neurotensin and cholecystokinin coexistence within neurons of the ventral mesencephalon: projections to forebrain. *Exp Brain Res*, 68, 277-89.
- Seutin, V., Massotte, L. & Dresse, A. (1989) Electrophysiological effects of neurotensin on dopaminergic neurones of the ventral tegmental area of the rat in vitro. *Neuropharmacology*, 28, 949-54.
- Shahedi, M., Laborde, K., Azimi, S., Hamdani, S. & Sachs, C. (1995) Mechanisms of dopamine effects on Na-K-ATPase activity in Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells. *Pflugers Arch*, 429, 832-40.
- Shapira, M., Gafni, M. & Sarne, Y. (2003) Long-term interactions between opioid and cannabinoid agonists at the cellular level: cross-desensitization and downregulation. *Brain Res*, 960, 190-200.
- Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A. & Lefkowitz, R.J. (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science*, 294, 1307-13.
- Sherer, T.B., Betarbet, R. & Greenamyre, J.T. (2002) Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *Neuroscientist*, 8, 192-7.
- Shi, W.S. & Bunney, B.S. (1990) Neurotensin attenuates dopamine D2 agonist quinpirole-induced inhibition of midbrain dopamine neurons. *Neuropharmacology*, 29, 1095-7.

- Shi, W.X. & Bunney, B.S. (1992a) Actions of neurotensin: a review of the electrophysiological studies. *Ann N Y Acad Sci*, 668, 129-45.
- Shi, W.X. & Bunney, B.S. (1992b) Roles of intracellular cAMP and protein kinase A in the actions of dopamine and neurotensin on midbrain dopamine neurons. *J Neurosci*, 12, 2433-8.
- Sibley, DR. & Neve KA. (1997) Regulation of dopamine receptor function and expression. In Neve KA and Neve RL (ed), *The Dopamine Receptors*. Humana Press, pp. 383-424.
- Sidhu, A., Laruelle, M. & Vernier, S. (2003) *Dopamine Receptors and Transporters: Function, Imaging and Clinical Implication* Marcel Dekker, New York .
- Skidgel, R.A., Engelbrecht, S., Johnson, A.R. & Erdos, E.G. (1984) Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides*, 5, 769-76.
- Snyder, S.H., Banerjee, S.P., Yamumura, H.I. & Greenberg, D. (1974) Drugs, neurotransmitters, and schizophrenia. *Science*, 184, 1243-1253.
- Snyder, S.H. & D'Amato, R.J. (1986) MPTP: a neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. The 1985 George C. Cotzias lecture. *Neurology*, 36, 250-8.
- Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M.P., Bouthenet, M.L. & Schwartz, J.C. (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature*, 347, 146-51.
- Sotty, F., Souliere, F., Brun, P., Chouvet, G., Steinberg, R., Soubrie, P., Renaud, B. & Suaud-Chagny, M.F. (1998) Differential effects of neurotensin on dopamine release in the caudal and rostral nucleus accumbens: a combined in vivo electrochemical and electrophysiological study. *Neuroscience*, 85, 1173-82.
- St-Gelais, F., Jomphe, C. & Trudeau, L.E. (2006) The role of neurotensin in central nervous system pathophysiology: what is the evidence? *J Psychiatry Neurosci*, 31, 229-45.
- St-Gelais, F., Legault, M., Bourque, M.J., Rompre, P.P. & Trudeau, L.E. (2004) Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci*, 24, 2566-74.

- Stamford, J.A., Kruk, Z.L. & Millar, J. (1991) Differential effects of dopamine agonists upon stimulated limbic and striatal dopamine release: in vivo voltammetric data. *Br J Pharmacol*, 102, 45-50.
- Steinberg, R., Brun, P., Souilhac, J., Bougault, I., Leyris, R., Le Fur, G. & Soubrie, P. (1995) Neurochemical and behavioural effects of neurotensin vs (D-Tyr11)neurotensin on mesolimbic dopaminergic function. *Neuropeptides*, 28, 43-50.
- Steiner, D.F., Smeeckens, S.P., Ohagi, S. & Chan, S.J. (1992) The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J Biol Chem*, 267, 23435-8.
- Stolerman, I.P. & Jarvis, M.J. (1995) The scientific case that nicotine is addictive. *Psychopharmacology (Berl)*, 117, 2-10; discussion 14-20.
- Stoof, J.C. & Kebabian, J.W. (1984) Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. *Life Sci*, 35, 2281-96.
- Sulzer, D., Joyce, M.P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S.N., Hattori, T. & Rayport, S. (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci*, 18, 4588-602.
- Sulzer, D., Sonders, M.S., Poulsen, N.W. & Galli, A. (2005) Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol*, 75, 406-33.
- Sunahara, R.K., Guan, H.C., O'Dowd, B.F., Seeman, P., Laurier, L.G., Ng, G., George, S.R., Torchia, J., Van Tol, H.H. & Niznik, H.B. (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*, 350, 614-9.
- Surmeier, D.J., Bargas, J., Hemmings, H.C. Jr, Nairn, A.C. & Greengard, P. (1995) Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron*, 14, 385-97.
- Szigethy, E. & Beaudet, A. (1989) Correspondence between high affinity 125I-neurotensin binding sites and dopaminergic neurons in the rat substantia nigra and ventral tegmental area: a combined radioautographic and immunohistochemical light microscopic study. *J Comp Neurol*, 279, 128-37.
- Tanaka, K., Masu, M. & Nakanishi, S. (1990) Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron*, 4, 847-54.

- Tang, L., Todd, R.D., Heller, A. & O'Malley, K.L. (1994) Pharmacological and functional characterization of D2, D3 and D4 dopamine receptors in fibroblast and dopaminergic cell lines. *J Pharmacol Exp Ther*, 268, 495-502.
- Tanganelli, S., Li, X.M., Ferraro, L., Von Euler, G., O'Connor, W.T., Bianchi, C., Beani, L. & Fuxe, K. (1993) Neurotensin and cholecystokinin octapeptide control synergistically dopamine release and dopamine D2 receptor affinity in rat neostriatum. *Eur J Pharmacol*, 230, 159-66.
- Tanganelli, S., O'Connor, W.T., Ferraro, L., Bianchi, C., Beani, L., Ungerstedt, U. & Fuxe, K. (1994) Facilitation of GABA release by neurotensin is associated with a reduction of dopamine release in rat nucleus accumbens. *Neuroscience*, 60, 649-57.
- Tauris, J., Ellgaard, L., Jacobsen, C., Nielsen, M.S., Madsen, P., Thogersen, H.C., Gliemann, J., Petersen, C.M. & Moestrup, S.K. (1998) The carboxy-terminal domain of the receptor-associated protein binds to the Vps10p domain of sortilin. *FEBS Lett*, 429, 27-30.
- Tepper, J.M., Sun, B.C., Martin, L.P. & Creese, I. (1997) Functional roles of dopamine D2 and D3 autoreceptors on nigrostriatal neurons analyzed by antisense knockdown in vivo. *J Neurosci*, 17, 2519-30.
- Teruel, M.N., Blanpied, T.A., Shen, K., Augustine, G.J. & Meyer, T. (1999) A versatile microporation technique for the transfection of cultured CNS neurons. *J Neurosci Methods*, 93, 37-48.
- Thiruchelvam, M., Richfield, E.K., Baggs, R.B., Tank, A.W. & Cory-Slechta, D.A. (2000) The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci*, 20, 9207-14.
- Thomas, M.J., Beurrier, C., Bonci, A. & Malenka, R.C. (2001) Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat Neurosci*, 4, 1217-23.
- Tiberi, M. & Caron, M.G. (1994) High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. *J Biol Chem*, 269, 27925-31.

- Tiberi, M., Jarvie, K.R., Silvia, C., Falardeau, P., Gingrich, J.A., Godinot, N., Bertrand, L., Yang-Feng, T.L., Fremeau, R.T. Jr & Caron, M.G. (1991) Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 7491-5.
- Trugnan, G., Fontanges, P., Delautier, D. & Ait-Slimane, T. (2004) [FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM...new techniques for a colourful life]. *Med Sci (Paris)*, 20, 1027-34.
- Uchida, S., Akaike, N. & Nabekura, J. (2000) Dopamine activates inward rectifier K⁺ channel in acutely dissociated rat substantia nigra neurones. *Neuropharmacology*, 39, 191-201.
- Uhl, G.R., Kuhar, M.J. & Snyder, S.H. (1977) Neurotensin: immunohistochemical localization in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 4059-63.
- Uhl, G.R. & Snyder, S.H. (1979) Neurotensin: a neuronal pathway projecting from amygdala through stria terminalis. *Brain Res*, 161, 522-6.
- Ungerstedt, U. (1971) Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl*, 367, 1-48.
- Usiello, A., Baik, J.H., Rouge-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P.V. & Borrelli, E. (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*, 408, 199-203.
- Valdenaire, O., Maus-Moatti, M., Vincent, J.D., Mallet, J. & Vernier, P. (1998) Retinoic acid regulates the developmental expression of dopamine D2 receptor in rat striatal primary cultures. *J Neurochem*, 71, 929-36.
- Valdenaire, O., Vernier, P., Maus, M., Dumas Milne Edwards, J.B. & Mallet, J. (1994) Transcription of the rat dopamine-D2-receptor gene from two promoters. *Eur J Biochem*, 220, 577-84.
- Vallar, L., Muca, C., Magni, M., Albert, P., Bunzow, J., Meldolesi, J. & Civelli, O. (1990) Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in LtK- fibroblasts,

- hyperpolarization, and cytosolic-free Ca^{2+} concentration decrease in GH4C1 cells. *J Biol Chem*, 265, 10320-6.
- Van Tol, H.H., Bunzow, J.R., Guan, H.C., Sunahara, R.K., Seeman, P., Niznik, H.B. & Civelli, O. (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350, 610-4.
- Vandenbulcke, F., Nouel, D., Vincent, J.P., Mazella, J. & Beaudet, A. (2000) Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor. *J Cell Sci*, 113 (Pt 17), 2963-75.
- Vankova, M., Arluison, M., Leviel, V. & Tramu, G. (1992) Afferent connections of the rat substantia nigra pars lateralis with special reference to peptide-containing neurons of the amygdalo-nigral pathway. *J Chem Neuroanat*, 5, 39-50.
- Villeneuve, P., Feliciangeli, S., Croissandeau, G., Seidah, N.G., Mbikay, M., Kitabgi, P. & Beaudet, A. (2002) Altered processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in PC2 knock down mice: a biochemical and immunohistochemical study. *J Neurochem*, 82, 783-93.
- Villeneuve, P., Lafortune, L., Seidah, N.G., Kitabgi, P. & Beaudet, A. (2000a) Immunohistochemical evidence for the involvement of protein convertases 5A and 2 in the processing of pro-neurotensin in rat brain. *J Comp Neurol*, 424, 461-75.
- Villeneuve, P., Seidah, N.G. & Beaudet, A. (2000b) Immunohistochemical evidence for the implication of PC1 in the processing of proneurotensin in rat brain. *Neuroreport*, 11, 3443-7.
- Vincent, B., Vincent, J.P. & Checler, F. (1994) Neurotensin and neuromedin N undergo distinct catabolic processes in murine astrocytes and primary cultured neurons. *Eur J Biochem*, 221, 297-306.
- Vincent, J.P., Mazella, J. & Kitabgi, P. (1999) Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 20, 302-9.
- Vita, N., Laurent, P., Lefort, S., Chalon, P., Dumont, X., Kaghad, M., Gully, D., Le Fur, G., Ferrara, P. & Caput, D. (1993) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a high affinity human neurotensin receptor. *FEBS Lett*, 317, 139-42.

- Vita, N., Oury-Donat, F., Chalon, P., Guillemot, M., Kaghad, M., Bachy, A., Thurneyssen, O., Garcia, S., Poinot-Chazel, C., Casellas, P., Keane, P., Le Fur, G., Maffrand, J.P., Soubrie, P., Caput, D. & Ferrara, P. (1998) Neurotensin is an antagonist of the human neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Pharmacol*, 360, 265-72.
- von Euler, G. (1991) Biochemical characterization of the intramembrane interaction between neurotensin and dopamine D2 receptors in the rat brain. *Brain Res*, 561, 93-8.
- von Euler, G., Fuxe, K., Benfenati, F., Hansson, T., Agnati, L.F. & Gustafsson, J.A. (1989) Neurotensin modulates the binding characteristics of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes also following treatment with toluene. *Acta Physiol Scand*, 135, 443-8.
- von Euler, G., Mailleux, P., Vanderhaeghen, J.J. & Fuxe, K. (1990a) Neurotensin reduces the affinity of dopamine D2 receptors in membranes from post mortem human caudate-putamen. *Neurosci Lett*, 109, 325-30.
- von Euler, G., Meister, B., Hokfelt, T., Eneroth, P. & Fuxe, K. (1990b) Intraventricular injection of neurotensin reduces dopamine D2 agonist binding in rat forebrain and intermediate lobe of the pituitary gland. Relationship to serum hormone levels and nerve terminal coexistence. *Brain Res*, 531, 253-62.
- von Euler, G., van der Ploeg, I., Fredholm, B.B. & Fuxe, K. (1991) Neurotensin decreases the affinity of dopamine D2 agonist binding by a G protein-independent mechanism. *J Neurochem*, 56, 178-83.
- von Zastrow, M. & Kobilka, B.K. (1992) Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem*, 267, 3530-8.
- Wagstaff, J.D., Bush, L.G., Gibb, J.W. & Hanson, G.R. (1994) Endogenous neurotensin antagonizes methamphetamine-enhanced dopaminergic activity. *Brain Res*, 665, 237-44.

- Walker, N., Lepee-Lorgeoux, I., Fournier, J., Betancur, C., Rostene, W., Ferrara, P. & Caput, D. (1998) Tissue distribution and cellular localization of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 57, 193-200.
- Wang, Y., Xu, R., Sasaoka, T., Tonegawa, S., Kung, M.P. & Sankoorikal, E.B. (2000) Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions. *J Neurosci*, 20, 8305-14.
- Washbourne, P. & McAllister, A.K. (2002) Techniques for gene transfer into neurons. *Curr Opin Neurobiol*, 12, 566-73.
- Watanabe, S.Y., Albsoul-Younes, A.M., Kawano, T., Itoh, H., Kaziro, Y., Nakajima, S. & Nakajima, Y. (1999) Calcium phosphate-mediated transfection of primary cultured brain neurons using GFP expression as a marker: application for single neuron electrophysiology. *Neurosci Res*, 33, 71-8.
- Weinberger, D.R. (1987) Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 44, 660-9.
- Weiner, D.M., Levey, A.I., Sunahara, R.K., Niznik, H.B., O'Dowd, B.F., Seeman, P. & Brann, M.R. (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 1859-63.
- Wellendorph, P., Goodman, M.W., Burstein, E.S., Nash, N.R., Brann, M.R. & Weiner, D.M. (2002) Molecular cloning and pharmacology of functionally distinct isoforms of the human histamine H(3) receptor. *Neuropharmacology*, 42, 929-40.
- Werkman, T.R., Kruse, C.G., Nievelstein, H., Long, S.K. & Wadman, W.J. (2000) Neurotensin attenuates the quinpirole-induced inhibition of the firing rate of dopamine neurons in the rat substantia nigra pars compacta and the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 95, 417-23.
- White, B.H., Kimura, K. & Sidhu, A. (1999) Inhibition of hormonally induced inositol trisphosphate production in Transfected GH4C1 cells: A novel role for the D5 subtype of the dopamine receptor. *Neuroendocrinology*, 69, 209-16.
- Winder, D.G., Egli, R.E., Schramm, N.L. & Matthews, R.T. (2002) Synaptic plasticity in drug reward circuitry. *Curr Mol Med*, 2, 667-76.

- Wise, R.A. & Rompre, P.P. (1989) Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol*, 40, 191-225.
- Wojcikiewicz, R.J. (2004) Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways. *Trends Pharmacol Sci*, 25, 35-41.
- Wolf, M.E. (1998) The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol*, 54, 679-720.
- Wolf, M.E. & Roth, R.H. (1990) Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Ann N Y Acad Sci*, 604, 323-43.
- Wolfe, S.E. & Morris, S.J. (1999) Dopamine D2 receptor isoforms expressed in AtT20 cells differentially couple to G proteins to acutely inhibit high voltage-activated calcium channels. *J Neurochem*, 73, 2375-82.
- Wong, A.C., Shetreat, M.E., Clarke, J.O. & Rayport, S. (1999) D1- and D2-like dopamine receptors are co-localized on the presynaptic varicosities of striatal and nucleus accumbens neurons in vitro. *Neuroscience*, 89, 221-33.
- Wong, A.H. & Van Tol, H.H. (2003) Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci Biobehav Rev*, 27, 269-306.
- Wu, T., Li, A. & Wang, H.L. (1995) Neurotensin increases the cationic conductance of rat substantia nigra dopaminergic neurons through the inositol 1,4,5-trisphosphate-calcium pathway. *Brain Res*, 683, 242-50.
- Wu, T. & Wang, H.L. (1995) Protein kinase C mediates neurotensin inhibition of inwardly rectifying potassium currents in rat substantia nigra dopaminergic neurons. *Neurosci Lett*, 184, 121-4.
- Xia, Z., Dudek, H., Miranti, C.K. & Greenberg, M.E. (1996) Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci*, 16, 5425-36.
- Yamada, M., Yamada, M., Lombet, A., Forgez, P. & Rostene, W. (1998) Distinct functional characteristics of levocabastine sensitive rat neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Life Sci*, 62, PL 375-80.

- Yang, S.N., Dasgupta, S., Lledo, P.M., Vincent, J.D. & Fuxe, K. (1995) Reduction of dopamine D2 receptor transduction by activation of adenosine A2a receptors in stably A2a/D2 (long-form) receptor co-transfected mouse fibroblast cell lines: studies on intracellular calcium levels. *Neuroscience*, 68, 729-36.
- Yang, Z., Asico, L.D., Yu, P., Wang, Z., Jones, J.E., Bai, R.K., Sibley, D.R., Felder, R.A. & Jose, P.A. (2005) D5 dopamine receptor regulation of phospholipase D. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288, H55-61.
- Zahm, D.S., Grosu, S., Williams, E.A., Qin, S. & Berod, A. (2001) Neurons of origin of the neurotensinergic plexus enmeshing the ventral tegmental area in rat: retrograde labeling and in situ hybridization combined. *Neuroscience*, 104, 841-51.
- Zahniser, N.R., Cass, W.A. & Fitzpatrick, F.A. (1992) Signal transduction pathways involved in presynaptic receptor-mediated inhibition of dopamine release in rat striatum. *Neurochem Int*, 20 Suppl, 85S-88S.
- Zhang, M., Turnbaugh, D., Cofie, D., Dogan, S., Koshida, H., Fugate, R. & Kem, D.C. (1996) Protein kinase C modulation of cardiomyocyte angiotensin II and vasopressin receptor desensitization. *Hypertension*, 27, 269-75.
- Zhou, Q.Y., Grandy, D.K., Thambi, L., Kushner, J.A., Van Tol, H.H., Cone, R., Pribnow, D., Salon, J., Bunzow, J.R. & Civelli, O. (1990) Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature*, 347, 76-80.
- Zhu, X., Gilbert, S., Birnbaumer, M. & Birnbaumer, L. (1994) Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density. *Mol Pharmacol*, 46, 460-9.
- Zupanc, G.K. (1996) Peptidergic transmission: from morphological correlates to functional implications. *Micron*, 27, 35-91.

ANNEXES

**ANNEXE 1 : Role of neurotensin in CNS pathophysiology:
what is the evidence?**

Contribution des co-auteurs

Cet article présenté en annexe est une revue de la littérature sur l'implication de la neurotensine dans diverses pathologies qui affectent le système nerveux central. La rédaction de l'article a été réalisée en collaboration avec Fannie St-Gelais et le Dr Louis-Éric Trudeau. J'ai été en charge de l'écriture de la section 1, qui traite principalement de la biologie et de la pharmacologie de la neurotensine.

ROLE OF NEUROTENSIN IN CNS PATHOPHYSIOLOGY:
WHAT IS THE EVIDENCE?

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

Journal of Psychiatry and Neuroscience 2006; 31(4): 229-45.

Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal

Montréal, QC, Canada

ABSTRACT / RÉSUMÉ

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

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

1. Neurotensin and neurotensin receptors

Neurotensin (NT) is a 13 amino acid peptide originally isolated in 1973 from bovine hypothalami (Tanaka et al., 1990). This neuropeptide is found in the central nervous system (CNS) as well as in the gastrointestinal tract. However, this review will focus on the CNS effects of NT. Like many others neuropeptides, NT acts as a neuromodulator in the nervous system where its close association between NT and dopamine (DA) systems has been well documented (for review see (Samad et al., 1997)). The neuromodulation of DA transmission by NT raises the possibility that the neurotensinergic system could be implicated in diseases where the common determinant is a deregulation of DAergic transmission such as schizophrenia, drug abuse and Parkinson's disease (Usiello et al., 2000). This review will attempt to provide a summary of current knowledge about NT with special emphasis on the evidence suggesting its implication in CNS diseases.

1.1. Biosynthesis, maturation, release and degradation of neurotensin

Like all neuropeptides, NT is synthesized as part of a larger inactive precursor which also contains neuromedin N (NN), a six amino acid NT-related peptide (Mazella et al., 1996;Chalon et al., 1996). In the rat, the NT/ NN precursor consists of 169-residues (Mazella et al., 1996) containing four pairs of dibasic residues (Lys-Arg). The endoproteolytic processing of this precursor at pairs of basic residues is mediated by members of the prohormone convertase (PC) family (Poinot-Chazel et al., 1996). The major prohormone convertase involved in this process in the brain is likely to be PC2 since

its expression co-localizes with all regions immunoreactive for NT (Nicot et al., 1994; Fassio et al., 2000). Although expression of PC1 and PC5A in the brain is more limited, these endoproteolytic enzymes also have the capacity to process the NT/NN precursor (Canonica et al., 1985; Nicot et al., 1994; Boudin et al., 1996) and could contribute to the regional differences observed in the relative proportions of NT and NN among brain structures (Bjorklof et al., 2002).

Once processed as an active peptide, NT is stored in dense core vesicles (Vandenbulcke et al., 2000; Liu et al., 2004) and released in a calcium-dependent manner (Beaudet et al., 1994; Hermans et al., 1997; Martin et al., 2003). NT transmission is terminated primarily by cleavage of NT in the C-terminal hexapeptide sequence that accounts for the biological activity of the peptide (Jiang et al., 1994). Several endopeptidases belonging to the family of metallopeptidases have also been shown to contribute to the physiological inactivation of NT such as neutral endopeptidase 24.11 (EC3.4.24.11) (Leonetti et al., 2004), angiotensin-converting enzyme (Nouel et al., 1999), endopeptidase 24.15 (EC3.4.24.15) (Pettibone et al., 2002) and endopeptidase 24.16 (EC3.4.24.16) (Lepee-Lorgeoux et al., 1999). However endopeptidase 24.16 is considered the main endopeptidase contributor to the inactivation of NT since it is expressed ubiquitously (Tanganelli et al., 1994; Remaury et al., 2002; Sarret et al., 2003b).

1.2 Neurotensin localisation in the CNS

NT-producing neurons and their projections are widely distributed in the CNS explaining the wide range of effects of this peptide. In the rat brain, a number of NT-

containing neural circuits have been suggested (Figure 1): (1) from cells in the central nucleus of the amygdala to the bed of the stria terminalis (Sato et al., 1995), to the substantia pars compacta (Chronwall et al., 1994), to the substantia nigra pars reticulata (Fortin et al., 2006), to the nucleus ventromedial of the hypothalamus (Giros et al., 1989); (2) from the hippocampus projecting through the cingulate cortex to the frontal cortex (Zhu et al., 1994); (3) from the arcuate and paraventricular nuclei of the hypothalamus to the neurointermediate lobe of the pituitary gland (Vincent et al., 1994); (4) from cells in the ventral tegmental area (VTA) to the nucleus accumbens, the diagonal band of Broca, the prefrontal cortex and the amygdala (Goldstein et al., 1990; Kenakin, 1997); (5) from cells in the endopyriform nucleus and prepyriform cortex to the anterior olfactory nucleus, the nucleus of the diagonal band, and the medio-dorsal thalamic nucleus (Stoof and Keibian, J. W., 1984; Diaz et al., 1995); (6) from cells in the periaqueducal gray matter (PAG), the parabrachial nucleus and the nucleus of the solitary tract to the nucleus raphe magnus (Szigethy and Beaudet, A., 1989); (7) from cells in the preoptic region and the rostral part of the lateral hypothalamus, the rostral part of the lateral septum, the bed nucleus of stria terminalis, the ventromedial ventral pallidum, the dorsal raphe nucleus and the diagonal band of Broca to the VTA (Morris and Malbon, C. C., 1999); (8) from the subiculum to the mammillary bodies (Giros et al., 1989); and (9) from the dorsal lateral portion of the bed nucleus of the stria terminalis to the parabrachial nucleus (Dana et al., 1991); (10) from the striatum to the substantia nigra reticulata (Kim et al., 1995), and (11) from the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis to the retrorubral field (Davila et al., 2003). In addition to neurotensinergic pathways to and from

VTA, high concentrations of NT have also been observed in regions associated to DAergic projections such as caudate nucleus, globus pallidus, and putamen (Malbon and Karoor, V., 1998;Bofill-Cardona et al., 2000) (for a review see (Samad et al., 1997)). At the spinal cord level, NT-containing cells have been found in the substantia gelatinosa (Malbon and Karoor, V., 1998).

1.3 Pharmacology of neurotensin receptors

Both central and peripheral actions of NT depend on recognition of the peptide by specific receptors at the plasma membrane of target cells. Three different NT receptors, referred to as NTS1, NTS2 and NTS3/sortilin have been cloned so far (2003) (for review, see (Carraway and Leeman, S. E., 1973;Petaja-Repo et al., 2001)). NTS1 and NTS2 belong to the G-protein-coupled receptor superfamily (Hellwinkel et al., 2001;Benoit-Marand et al., 2001;Oak et al., 2001;Nickenig et al., 2002) and were initially distinguished pharmacologically on the basis of their affinities for NT and their differential sensitivity to the histamine antagonist levocabastine (O'Brien and Zatz, M., 1984).

Indeed, the type 1 NT receptor is often referred to as the high-affinity binding site ($K_d = 0.1- 0.3$ nM) and is insensitive to levocabastine (O'Brien and Zatz, M., 1984). In rat brain, NTS1 transcripts are located primarily in neurons from septum, substantia nigra, ventral tegmental area, zona incerta, suprachiasmatic nucleus, as well as prefrontal, entorhinal and retrosplenial cortices (Montmayeur and Borrelli, E., 1991;Lee et al., 1994). NTS1-containing nerve terminals were seen by immunohistochemical studies in the caudate-putamen, bed nucleus of the stria terminalis, olfactory tubercule, as well as the

lateral septum, amygdala, lateral habenula and nucleus accumbens (Cleveland and Yen, T. J., 1989; Zhou et al., 1999).

NTS1 is functionally coupled to the phospholipase C (PLC) and inositol phosphate (IP) signalling cascade (for review see (Carraway and Leeman, S. E., 1973; 2003)). Other possible signalling could occur through activation of cGMP, cAMP, arachidonic acid production (Lang and Lozano, A. M., 1998b; Schulz and Falkenburger, B. H., 2004), MAP kinase phosphorylation (Forno, 1996; Lang and Lozano, A. M., 1998a; Duvernay et al., 2005) and inhibition of Akt activity (Jiang and Lucy, M. C., 2001). NTS1 undergoes agonist-dependent internalization when exposed to its natural agonist neurotensin. This phenomenon is well documented in neurons and in NTS1-expressing cell lines (review in (Dal Toso et al., 1988) see also (Vallar et al., 1990; Tang et al., 1994; Ghahremani et al., 1999)). The effects mediated by NTS1 are usually blocked by its selective non-peptide antagonist SR48692 (Hardy et al., 2003), or by the broad-spectrum antagonist SR142948A (Reinecke, 1985) that recognizes both NTS1 and NTS2. The generation of mice lacking NTS1 receptors (Okuma et al., 1983; Nomura et al., 2001) has allowed to attribute to NTS1 the hypothermic, impaired motor coordination, and gastrointestinal motility effects of NT. A role for NTS1 in analgesia has also been suggested (Kim et al., 2001; Elton and Martin, M. M., 2003), but this is still controversial (Okuma et al., 1983).

The NT type 2 receptor (NTS2) has a lower affinity for NT ($K_d = 3-10$ nM) than NTS1 and is sensitive to levocabastine. Unlike its high-affinity counterpart, NTS2 expression is more diffusely distributed throughout the brain. In the rat brain, high densities

of NTS2 mRNA and protein were detected in many regions documented to receive a dense neurotensinergic innervation, such as the bed nucleus of the stria terminalis, olfactory bulb, substantia nigra, ventral tegmental area and PAG (Blaxall et al., 2000;Bouvier, 2001;Bockaert et al., 2004). However, some of the highest concentrations of NTS2 receptor were found in areas devoid of neurotensinergic inputs such as the cerebral cortex, hippocampus and cerebellum (Blaxall et al., 2000), suggesting that endogenous ligands other than NT may activate this receptor (Namkung and Sibley, D. R., 2004). At the cellular level, NTS2 expression was initially detected in both neurons (Sherer et al., 2002;Bockaert et al., 2004) and astrocytes (Checler et al., 1989;Hawtin et al., 2001;Bockaert et al., 2004), although recent immunostaining experiments have reported signal only in neurons throughout the brain (Sarret et al., 2003b), a puzzling observation.

The pharmacological and signalling properties of NTS2 are still controversial. In particular, it is unclear whether NT acts as an agonist, inverse agonist or antagonist at this site. Depending upon the species from which the NTS2 was isolated (Nickenig et al., 2002) and the cell system used to evaluate signalling (oocytes, CHO cells, COS-7 cells, and HEK293 cells), different results have been reported. The only common result is the agonist action of SR48692 (Park et al., 2005), originally described as an antagonist with a higher affinity for NTS1 than NTS2 receptors (Bunzow et al., 1988;Schapira et al., 1990;Jenner, 2003;Hardy et al., 2003;Conner et al., 2004). Additionally, both NT and levocabastine exert a species-dependent agonist (mouse) (Nickenig et al., 2002) or antagonist (human) profile (Schapira et al., 1990;Jenner, 2003). Indeed, in cell lines expressing human NTS2, SR48692 activated Ca^{2+} mobilization or IP formation whereas both NT and levocabastine

antagonized this response. The species-dependent pharmacological properties of NTS2 could be linked to differences in the constitutive activity of this ghrelin-family receptor (Schapira et al., 1990; Kamiya et al., 2003). The most convincing data supporting an agonist role of NT at rodent and human NTS2 receptors is the ability of NT to produce ligand-induced internalization of receptor-ligand complexes (Bunzow et al., 1988; Sherer et al., 2002; Bulenger et al., 2005). This internalization of NTS2 is apparently associated with activation of ERK1/2 but not Ca^{2+} mobilization (Bulenger et al., 2005).

The type 3 NT receptor (NTS3) receptor, originally identified as the intracellular sorting protein sortilin, is unique among neuropeptide receptors in that it is a single transmembrane domain receptor of the type I family (Pierce and Regan, J. W., 1998). NTS3/sortilin, like NTS1, binds NT with high affinity once converted to its mature form upon cleavage by furin (Qanbar and Bouvier, M., 2003). This receptor is found in neurons, glia and adipocytes (Forno et al., 1988; Hawtin et al., 2001; Dauer and Przedborski, S., 2003). In the rat brain, regions expressing both high levels of NTS3/sortilin mRNA and protein include the piriform cortex, hippocampus, islands of Calleja, medial and lateral septal nuclei, amygdaloid nuclei, thalamic nuclei, supraoptic nucleus, substantia nigra and Purkinje cell layer of the cerebellar cortex (Pindon et al., 2002). NTS3/sortilin has the ability to bind a variety of other ligands in addition to NT such as the receptor-associated protein (RAP) (Betarbet et al., 2000; Thiruchelvam et al., 2000) and lipoprotein lipase (LpL) (Deslauriers et al., 1999). It is thus possible that NTS3/sortilin also subserves non NT-related functions in the mammalian CNS. To date, very little is known about the physiological role of NTS3/sortilin receptor. The strongest evidence that NTS3 can behave

as a true NT receptor lies on the recent demonstration that this protein may be involved in the NT-induced migration of human microglial cells via the stimulation of both MAP and PI3-kinase-dependent pathways (Petaja-Repo et al., 2000). NTS3/sortilin may also be involved in the growth of certain cancer cell lines (Wojcikiewicz, 2004) and in the modulation of NT signalling via mediation of NT uptake and degradation (O'Dowd et al., 1989; Shenoy et al., 2001; Dauer and Przedborski, S., 2003).

In closing, let us mention that a candidate fourth NT receptor has been proposed although little is currently known about its physiological relevance. This receptor, named SorLA/LR11 is, like NTS3, a single transmembrane spanning region receptor of the type 1 family (Hillion et al., 2002). In the CNS this receptor is expressed in neurons (Kearn et al., 2005), but its role in the effects of NT remains to be determined. It has otherwise been suggested to regulate the processing of the amyloid precursor protein (Salim et al., 2000).

2. Major physiological roles of neurotensin in the CNS

In this review we focus our attention on the roles of NT in the CNS. However it is important to point out that this peptide is also highly expressed peripherally where it acts as a modulator of the gastrointestinal and cardiovascular systems (Di Chiara and Imperato, A., 1988; Cass and Zahniser, N. R., 1991; Montmayeur et al., 1991; Volkow et al., 2004).

2.1 Action of NT on the DA system

2.1.1 Neurotensinergic innervation of DAergic neurons

The interaction between NT and the DAergic system is supported by strong anatomical evidence. Midbrain DAergic neurons located in the VTA, SN and retrorubral field (RRF) are densely innervated by NT-containing axons (Malbon and Karoor, V., 1998; Morris and Malbon, C. C., 1999). The origin of the NT plexus innervating DA neurons is not fully established, but some of the neurotensinergic input to the VTA originates from the lateral preoptic area and the rostral part of the lateral hypothalamus (Morris and Malbon, C. C., 1999). The origins of the neurotensinergic fibers innervating the SN and RRF remain controversial.

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

NT increases the firing rate of mesencephalic DAergic neurons and has a depolarizing effect, at least in part via NTS1 activation (Zhang et al., 1996; Oppermann et al., 1996; Haga et al., 1996). This increase in firing rate is Ca^{2+} -dependent and requires IP3 receptor activation (Hipkin et al., 2000). Since NT modulates the activity of DAergic neurons, it is thus not surprising that NT also modulates DA release. NT has been demonstrated to modulate DA release from striatal, accumbens nucleus and retinal slices (Monsma et al., 1989; Morello and Bouvier, M., 1996; Minneman, 2001; Martinez et al., 2004). Depending on the experimental model and the brain area where it is injected, NT can induce an increase or a decrease in DA release. Using electrochemical detection and a

carbon fibre electrode, NT, applied ICV, was found to increase DA levels in the nucleus accumbens (Wellendorph et al., 2002). However, using microdialysis, perfusion of NT in the accumbens nucleus was found to lead to a local decrease in DA release by a GABA_A receptor-dependant mechanism (Botto et al., 1997). Moreover, microdialysis of antibodies against NT in the cerebral ventricles leads to an increase in DA release in accumbens nucleus (Vita et al., 1998). NT could also act to facilitate DA release in the accumbens by decreasing the ability of the D2 receptor (D2R) to mediate presynaptic inhibition at DAergic axon terminals (Yamada et al., 1998). Finally, NT injected in the VTA causes an increase in DA release in the nucleus accumbens (Sarret et al., 2002). This is likely to be explained by the ability of NT to increase the firing rate of DAergic neurons. However, the possible contribution of a decrease in somatodendritic autoreceptor function remains to be evaluated.

2.1.3. Regulation of dopamine receptor function

In addition to its action on the excitability of DAergic neurons, NT can also act to regulate the function of DA receptors. Indeed, there are biochemical and electrophysiological evidence suggesting an interaction with D2R. First, binding experiments showed that NT induces a modest decrease in the affinity of D2R for its agonists (Botto et al., 1998; Giasson and Lee, V. M., 2003; Gendron et al., 2004; Holst et al., 2004). *In vivo* and *in vitro* studies showed that NT increases D2R K_d value without affecting B_{max}. These results suggest that the function of D2R receptors is affected by NT but the number of functional receptors remains unchanged (Uhl and Snyder, S. H.,

1979;Vankova et al., 1992;Dal Farra et al., 2001;McNaught et al., 2003;Morinville et al., 2004). The interaction between NT and D2R was also measured by evaluating DA release in the striatum. Perfusion of NT in this region decreases the ability of DA agonists to inhibit basal DA levels, an observation which is compatible with the existence of some functional interaction between NT and D2R. However, whether this interaction occurs directly on DAergic axon terminals is unclear (Richard et al., 2001). Modification of D2R function by NT was also evaluated electrophysiologically. Indeed, patch clamp recordings suggest that NT and D2R may oppositely regulate a similar potassium conductance in DAergic neurons, thus providing a possible explanation of a NT-D2R interaction (Mazella et al., 1998): NT would increase cellular excitability by inhibiting potassium channels while a D2 agonist would decrease excitability by activating the same channels. According to such a model, NT would thus simply prevent the D2 agonist from activating the potassium channels by independently inhibiting them. However, extracellular recordings of the firing of midbrain DAergic neurons showed that NT is able to reduce the inhibitory effect of D2R agonist, even at concentrations of NT that do not increase firing (Daaka et al., 1997;Nielsen et al., 1999;Volkow et al., 2001). This observation argues against the idea that the interaction depends on the regulation of a common potassium channel by the two receptors

2.2 Action of NT on other neurotransmitter systems

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

2.2.1. Evidence for the effect of NT on cholinergic transmission

In the CNS, cholinergic neurons are found in the midbrain, striatum and magnocellular complex of the basal forebrain (Inagaki et al., 1983b; Seroogy et al., 1987). There is evidence for the expression of NT receptors by cholinergic neurons in the basal forebrain and also for neurotensinergic innervation of this structure, suggesting a direct modulation of these neurons by NT (Inagaki et al., 1983a; Yang et al., 1995; Pierce and Kalivas, P. W., 1997). Anatomical data also suggest that some cholinergic neurons may be modulated indirectly by NT. For example, an indirect modulation of cholinergic neurons is mediated by NT receptors located on DAergic neurons innervating the striatum (Thomas et al., 2001). The effect of NT on acetylcholine (ACh) release was also studied and it was shown that NT increases K^+ -evoked ACh-release in striatal brain slices (Beitz, 1982). However, contradictory result has been obtained by *in vivo* microdialysis in the striatum, where no effect of NT on ACh release was detected (Moga et al., 1989). The effect of NT on ACh release in the cortex also seems to be complex. It was reported that NT depresses ACh release in frontal cortex slices, has no effect in the occipital cortex and has a potentiating effect in the parietal cortex (Wolf, 1998). Electrophysiological experiments showed that in cholinergic neurons of the basal forebrain magnocellular complex, NT

produces depolarization and rhythmic bursting (Dobner et al., 1987; Ito et al., 1999; St-Gelais et al., 2004). The same result has been obtained in cholinergic neurons of the medial septum and vertical limb of the diagonal band nuclei (Jennes et al., 1982). NT-induced excitation has been associated in nucleus basalis of Meynert cholinergic neurons to a reduction in inwardly rectifying K⁺ conductances (Binder et al., 2001).

2.2.2. Effect of NT on serotonergic neurotransmission

There is anatomical data suggesting interaction between NT and serotonergic neurons. Indeed, neurons of the rostral part of raphe synthesize NT while NT receptors are widely expressed in most of the raphe (Roberts et al., 1981; Agnati et al., 1983; Blaxall et al., 2000; Maltais et al., 2000). Much of the raphe nuclei also receive significant neurotensinergic innervation (Wagstaff et al., 1994; Diaz-Cabiale et al., 2002). There is physiological evidence for the presence of NTS1 on serotonergic neurons. Indeed, a subpopulation of serotonergic neurons located in the nucleus raphe magnus and in the dorsal raphe, respond to NT by an increase in their firing rate, an effect that is blocked by SR48692 (Kallal and Benovic, J. L., 2000; Zahm et al., 2001). The functional role of NT in the raphe remains to be determined, but it may participate in the modulation of some of the known functions of the serotonergic system including nociception (Trugnan et al., 2004), sleep-wakefulness cycle regulation (Kislauskis et al., 1988) and stress-related responses (Jerez et al., 2004).

2.2.3. Effect of NT on GABAergic neurotransmission

The activity of GABAergic neurons evaluated either by measuring firing rate or by sampling extracellular GABA can be increased by NT in the hippocampus, striatum, prefrontal cortex and globus pallidus (Moga et al., 1989;Steiner et al., 1992;Villeneuve et al., 2000a;Villeneuve et al., 2002). Other studies showed that NT decreases GABA release both in the SN and the ventral thalamus by a D2R-dependent mechanism (Zupanc, 1996). These effects were counteracted by SR48692 suggesting that they were mediated by NTS1. Such an increase in GABA release could result in a number of indirect effects. For example, NT-mediated GABA release in the striopallidal pathway inhibits pallidal GABAergic neurons projecting to the subthalamic nucleus, resulting ultimately in an increase in glutamate release (Iversen et al., 1978).

2.2.4. Effect of NT on glutamate neurons

NT increases glutamate release in some brain regions such as the striatum, globus pallidus, frontal cortex and the SN (Iversen et al., 1978;Kitabgi et al., 1990;Zupanc, 1996;Winder et al., 2002). Considering that an excess of glutamate can induce excitotoxicity within the context of conditions such as stroke, Alzheimer's and Parkinson's disease, it is interesting to note that NT can enhance glutamate excitotoxicity in both mesencephalic and cortical neurons (Chabry et al., 1993;Morris et al., 1998). In addition to enhancing glutamate release, NT can modify the function of glutamate receptors. Indeed, NT amplifies NMDA-mediated signals by a PKC-dependent mechanism (Chabry et al., 1993). Stimulation of the NMDA receptor is well known to mediate glutamate-induced

excitotoxicity leading to apoptotic cell death or necrosis (Olds and Milner, P., 1954; Kalivas and Volkow, N. D., 2005). NT can increase the number of apoptotic cells induced by glutamate exposure (Chabry et al., 1993).

2.3 Neuroendocrine effects of NT

One of the major central functions of NT is to regulate neuroendocrine systems (for review see (Maeda and Frohman, L. A., 1981)). A number of essential nuclei implicated in hormone secretion and regulation such as the arcuate nucleus, the parvocellular division of the paraventricular nucleus and the periventricular nucleus of the hypothalamus as well as the pituitary receive neurotensinergic projections and express NT binding sites (Almenoff et al., 1981; Vincent et al., 1994). NT influences neurons that synthesize and secrete gonadotropin-releasing hormone, somatostatin and corticotrophin releasing factor (CRF) (Iwata et al., 1999). In addition to neurotensinergic projections arriving from other regions, NT is synthesized in some hypothalamic secretory cells located for the most part in the arcuate and paraventricular nuclei (Skidgel et al., 1984; Tauris et al., 1998). It appears that NT produced locally contributes to the regulation of the release of some neuromodulators and hormones such as CRF, galanin, enkephalin, cholecystokinin and growth hormone-releasing hormone (Petersen et al., 1997; Mundell et al., 2004) and could thus be implicated in stress-related functions (Stolerman and Jarvis, M. J., 1995). Compatible with this, chronic delivery of SR48692 to the paraventricular nucleus of the hypothalamus attenuates stress-induced elevations of the release of corticosterone and ACTH (Hall et al., 1999). In addition, there is a mutual regulation between NT and neuroendocrine systems since

androgen, estrogen, glucocorticoid and thyroid hormone affect NT synthesis in the hypothalamus and anterior pituitary (Carlsson and Lindqvist, 1963;Creese et al., 1976;Shi and Bunney, B. S., 1990;Shi and Bunney, B. S., 1992a).

2.4 Action on non-neuronal cells

In addition to its action on neurons, NT has been reported to affect glial cells such as astrocytes and microglia. Effects of NT on astrocytes are supported by the fact that these cells express NT-binding sites in many brain areas such as the midbrain, cortex, striatum, brain stem and spinal cord (Orlowski et al., 1983;Checler et al., 1986). The subtype of NT receptor expressed by these cells is presently unclear. A functional study on cultured VTA astrocytes showed that the calcium increase induced by NT was partly sensitive to SR48692 and was not mimicked by the NTS2 agonist levocabastine (Sarret et al., 2003a). This result suggests that astrocytes express NTS1 but also that another undefined receptor could perhaps also be present on these cells. Other studies, using embryonic rat midbrain and postnatal cerebral cortex cell cultures showed that NTS2 was expressed by a subpopulation of glial cells and that NTS2 expression was increased in reactive astrocytes (Checler et al., 1989;Shi and Bunney, B. S., 1990;Hawtin et al., 2001). Compatible with the idea that NT receptors are expressed by a subpopulation of astrocytes, it was reported that while NT-induced intracellular Ca^{2+} mobilization can be detected in approximately 30% of primary mesencephalic astrocytes, this response is absent from purified adherent astrocytes from the same region (Hipkin et al., 2000). Single-cell RT-PCR experiments from acutely dissociated astrocytes as well as double in situ hybridization experiments at different

developmental time points would be useful to clarify the expression pattern of NT receptors in astrocyte subpopulations. The physiological role of NT receptors in astrocytes remains largely unknown. However, since there is increasing data suggesting the involvement of astrocytes-derived messengers in regulating neuronal activity and synaptic transmission (Farkas et al., 1997; Werkman et al., 2000), future work would be required to directly investigate the hypothesis that NT induces the release of chemical messengers from astrocytes, thus indirectly regulating neurons in the mesencephalon or other structures. Interestingly, it was recently shown that although NT-induced Ca^{2+} mobilization in astrocytes is not necessary for the excitatory effect of NT on midbrain DAergic neurons in culture, this excitation is enhanced when neurons are grown together with NT-responsive astrocytes (Hipkin et al., 2000).

Finally, NT also affects the activity of microglial cells. More specifically, NT elicits the migration of a microglial cell line by a NTS3-dependent process. It was also shown that ERK1/2 and PI3-kinase intracellular pathways are implicated in this effect (Petaja-Repo et al., 2000). Such results suggest that NT plays a role in cellular responses to inflammation or brain lesion since microglia motility is very important for these processes.

3. Role of neurotensin in schizophrenia?

Based on a growing literature suggesting the existence of anatomical and physiological interactions between NT and the mesolimbic DA system, Charles Nemeroff published 25 years ago an influential paper entitled “Neurotensin, perchance an endogenous neuroleptic?” (Manning-Bog et al., 2002). This much-cited paper introduced the bold

suggestion that NT could act to inhibit DA neurotransmission, much in the same way as antipsychotic (or neuroleptic) drugs. It also proposed that perhaps schizophrenia symptoms result in part from a deficit in brain NT, leading to excessive DA neurotransmission. Here we will briefly reconsider this hypothesis and ask whether there is sufficient data to support it.

First, what is the evidence supporting an intimate relationship between DA and NT? As stated previously, NT is indeed found to be abundantly expressed in the ventral midbrain in an intricate network of thin fibres. In addition, NT binding sites and NT receptors are expressed in high numbers by DA neurons. These basic observations certainly are in agreement with the idea that NT is a key regulator of the DA system. However, it is important to remember that NT is also abundant in a number of additional nuclei in the brain and unless a deficit in NT was restricted to the ventral midbrain or to the regions receiving the densest DA projections, a disease implicating a decrease in NT would be expected to be accompanied by a large variety of symptoms not restricted to those found in schizophrenia.

A first argument in favour of the role of NT as an endogenous antipsychotic-like compound is that animal studies have showed quite convincingly that injections of NT in the VTA or in projections areas such as the nucleus accumbens cause effects that are similar to those of acutely applied antipsychotic drugs. For example, when injected in the VTA, both NT and antipsychotic drugs increase the firing rate of DA neurons (Haga et al., 1996; Moore et al., 2003). Similarly, both NT (indirectly) and antipsychotics (directly) inhibit D2R function when injected in the nucleus accumbens (Uhl and Snyder, S. H.,

1979; Yamada et al., 1998; Botto et al., 1998; Richard et al., 2001; McNaught et al., 2003; Giasson and Lee, V. M., 2003; Morinville et al., 2004; Gendron et al., 2004; Holst et al., 2004). At the behavioural level, both agents cause sedative-like effects and muscle relaxation as well as hypothermia and vacuous chewing movements (reviewed in (McNaught et al., 2002; McNaught et al., 2004)). Dissimilarities have also been reported, so it would be fair to conclude that the match is not perfect. However, some of the reported differences could be dose-related. For example, at low doses NT may decrease D2 receptor function, thus leading to a partial disinhibition of DA signalling. However, at higher doses, NT apparently has additional effects that are unrelated to a decrease in D2 receptor function. For example, it directly depolarises DA neurons by activating cationic channels, an effect that antipsychotic drugs do not have (Chung et al., 2001).

A second and arguably the most direct argument for a role of NT in schizophrenia is that a number of published studies, all of them emanating from Nemeroff and collaborators, report that cerebrospinal (CSF) fluid NT levels are lower in a subgroup of schizophrenic subjects than in controls (Dal Toso et al., 1989; Montmayeur et al., 1993; Leysen et al., 1993; Castro and Strange, P. G., 1993; Liu et al., 1994; Senogles, 1994; Guiramand et al., 1995). What in fact has been observed is that CSF NT levels are lower in a subgroup of non-medicated schizophrenia patients that are most severely affected, with an inverse correlation between symptom severity and NT levels. In addition, in some of the studies, a partial normalization of CSF NT levels was noted in response to antipsychotic drug treatment, although there was no correlation between recovery of NT levels and extent of symptoms improvement (Leysen et al., 1993). It should also be noted that in one post-

mortem study, an increase in cortical NT levels was detected in schizophrenia patients (Liu et al., 1996). Although the finding of reduced CSF NT levels appears to be a reproducible observation, no reports replicating this work have yet to come from other laboratories. The results also have to be interpreted with caution. First, all the data come from CSF measurements and the relationship between CSF and brain NT levels is unclear, in part because part of the signal could reflect spinal cord levels. Second, the finding of reduced CSF NT levels is limited to a subgroup of patients; group comparisons have failed to find an overall decrease in CSF NT levels when all patients were considered. Finally, although the hypothesis of a link between compromised brain NT and schizophrenia is attractive, an alternate hypothesis is that NT levels are lower in some non-specific manner in the most severely affected non-medicated patients because of a generalized decrease in cognitive activity. If this were true, then perhaps the CSF and brain levels of a number of markers of neuronal activity will be found to be lower in the most severely affected patients. Antipsychotic drug treatment would then act indirectly to increase NT levels by promoting partial recovery of cognitive activity by reducing positive symptoms.

But then again, the possibility that antipsychotic drugs act at least in part by restoring brain NT levels should not be lightly considered since most antipsychotic drugs have been reported to increase the expression of NT mRNA in the ventral and dorsal striatum (Choi et al., 1999; Wolfe and Morris, S. J., 1999; Liu et al., 1999; Kendall and Senogles, S. E., 2006) (but see (Chuang et al., 1996)). If this hypothesis is correct, then one would expect that NT receptor antagonists could actually have negative effects on the symptoms of schizophrenia patients. Although NT receptor antagonists have been explored

for many years by pharmaceutical companies, to date, the results of only one clinical trial reporting the effect of a NT receptor antagonist (SR48692) on schizophrenia has been published. In that report, no significant effect of the antagonist was found (Kim et al., 2004). Based on the original hypothesis of a NT deficit in schizophrenia, some have proposed that NT receptor agonists hold more promise as potential antipsychotic drugs (Uhl et al., 1977;Liu et al., 1992;Khan et al., 1998;Wang et al., 2000;Pickel et al., 2002). A limited number of such agonists have been developed and some are reportedly able to cross the blood-brain barrier (Uhl et al., 1977;Tepper et al., 1997;Diaz et al., 2000;Centonze et al., 2002;Lindgren et al., 2003). No clinical trial using such agonists in the treatment of schizophrenia has yet been reported, but animal studies have shown that NT or some of these systemically-active agonists can display an antipsychotic-like profile (Uhl et al., 1977;Starke et al., 1989;Liu et al., 1992;Nicot et al., 1995;Tepper et al., 1997;Koeltzow et al., 1998;Wang et al., 2000;Pickel et al., 2002;Canals et al., 2003;Centonze et al., 2004). For example, a number of animal studies, many of which studying pre-pulse inhibition (PPI) of the startle reflex as a model of sensorimotor gating deficits in schizophrenia, have confirmed possible links between NT and DA in such schizophrenia-relevant paradigms. Injection of NT in the nucleus accumbens, but not in the VTA, reduces the ability of amphetamine to perturb PPI in the rat (Langer, 1997;Lang and Lozano, A. M., 1998b;Pickel et al., 2002) (but see (Ferguson, 2001)). This observation is compatible with the idea stated above that NT acts in the DA target structures to reduce DA signalling. In addition, a centrally active NT agonist administered sub-cutaneously produced a similar effect (Lang and Lozano, A. M., 1998b;Adell and Artigas, F., 2004) (but see (Shi and

Bunney, B. S., 1992b) for a psychostimulant-like effect of centrally-administered NT, suggesting that at certain doses, NT could also act to enhance DA-dependent behaviours). Although not tested in a PPI paradigm, a recently developed NTS1 ligand, KH28, was reported to reduce amphetamine-induced hyperlocomotion (Canals et al., 2003). Compatible with the idea that a deficit in NT could influence PPI, the NT receptor antagonist SR142948A prevented the ability of the antipsychotic haloperidol to reduce isolation-rearing-induced perturbation of PPI (Iravani et al., 1996). Finally, PPI is disrupted in NT knockout mice (Cragg and Greenfield, S. A., 1997). Such results, although far from proving a link between NT and schizophrenia, nonetheless can be taken as arguing in favour of the biological plausibility of this hypothesis.

Beyond clinical trials with NT agonists, it will not be easy to pursue further in human patients the hypothesis of a link between NT and schizophrenia. There is currently no approach to measure brain NT levels in living humans and no association between schizophrenia and mutations or polymorphisms in NT or NT receptor genes have been reported (Onali et al., 1992).

4. Implication of NT in drug abuse?

A possible implication of NT in drug abuse has been studied for close to 25 years (Chiodo and Kapatos, G., 1992). The primary drive for this hypothesis is based on the similarities between some of the effects of NT and some of the effects of psychostimulant drugs. This work has been somewhat controversial, in large part because the effect of NT depends on many parameters such as the dose used, the injection procedure and

localization, as well as the experimental model or species used. As mentioned in previous sections, injection of NT in the nucleus accumbens tends to reduce some behavioural effects of psychostimulant drugs. However, the psychostimulant-like actions of NT occur when the peptide is injected in the VTA (Lacey et al., 1987). For example, intra-VTA injections of NT in the rat increase locomotor activity and elevate DA release in the nucleus accumbens (Lacey et al., 1987; Onali et al., 1988; Lacey et al., 1988; Wolf and Roth, R. H., 1990; Pothos et al., 1998). This is compatible with the localization of excitatory NT receptors on VTA DA neurons that give rise to the mesocorticolimbic pathway (Farkas et al., 1996), as mentioned previously. NT could thus produce psychostimulant-like effects when injected in the VTA simply by enhancing the firing of DA neurons, leading to elevations of extracellular DA in the nucleus accumbens. NT can also increase the firing of SN DA neurons (Oppermann et al., 1996) and cause an elevation of glutamate levels in this structure (Zupanc, 1996; Nielsen et al., 1999).

Moreover, NT presents other psychostimulants characteristics. When injected in the rat VTA, NT acts as a primary reinforcer in the conditioned place preference paradigm (Kennedy et al., 1992) and can be self-administered (Stamford et al., 1991). In rats, NT potentiates brain-stimulation reward (Kehr et al., 1972; Roeper et al., 1990; Mercuri et al., 1992; Uchida et al., 2000). When injected intracerebroventricularly, NT also sensitizes rats to the locomotor activating effects of amphetamine (Binda et al., 2005) and increases the sensitivity of mice to ethanol (Bowyer and Weiner, N., 1989; Cardozo and Bean, B. P., 1995). Moreover, systemic administration of the NT receptor antagonists SR48692 and SR142948A reduce sensitization to amphetamine, suggesting that endogenous NT could

play some role in this drug-induced long-term plasticity (Snyder et al., 1974; Crow, 1980; Wong and Van Tol, H. H., 2003). Whether NT specifically in the VTA is critically involved is less clear. In fact, psychostimulants such as cocaine and amphetamine cause an increase in NT mRNA expression in the striatum and the nucleus accumbens (Seeman, 1987; Laruelle et al., 1996; Breier et al., 1997; Miyamoto et al., 2001), areas where NT has been shown to decrease the effects of psychostimulants. Interestingly, an increase in NT immunoreactivity after methamphetamine or cocaine administration has also been reported in the SN (Abi-Dargham et al., 1998; Sawa and Snyder, S. H., 2002), but no data is available for the VTA. Amphetamine and metamphetamine also increase NT levels in the medial prefrontal cortex (Weinberger, 1987). Finally, it should be noted that rhesus monkeys can reportedly not be trained to self-administer the centrally active NT receptor agonist NT69L intracerebroventricularly (Craig AM, 1998). Also, NT reduces bar-pressing for food rewards (Mercuri et al., 1989). Together, these results nonetheless suggest that NT may play a role in the effects of psychostimulants, but the mechanism involved is unclear.

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

A final and obviously critical question is whether NT is involved in direct drug effects or drug addiction mechanisms in humans. Currently, very little data has been

published. In one study, no association was found between a polymorphism in the proneurotensin gene and alcohol dependence in a Finnish population (Miyamoto et al., 2003). In summary, although cumulating animal research argues in favour of the implication of NT in drug abuse mechanisms, essentially no data is available in humans. The possibility of using NT receptor ligands as possible pharmacological tools to treat drug addiction (Uhl et al., 1977) can thus be considered promising but perhaps a bit premature.

5. Implications of NT in Parkinson disease?

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

Numerous studies tried to determine if PD is associated with changes in the neurotensinergic system. Biochemical and histological studies made on brain tissues from patients who died from PD showed a decrease in the number of NT-binding sites in the SN, VTA, caudate nucleus, putamen and globus pallidus compared to normal patients (Pinnock, 1985; Dauch et al., 1992; Rovere et al., 1996; Villeneuve et al., 2000b). Using *in situ* hybridization it was also possible to show more specifically that NTS1 mRNA was decreased in the substantia nigra of parkinsonian subjects (Seutin et al., 1989). PD can be partly mimicked in animal models by destroying the nigrostriatal pathway using toxins such as MPTP or 6-OHDA. In these PD animal models, there is a decrease in the number of

NT-binding sites in the striatum and SN (Bayer et al., 1991;Woulfe and Beaudet, 1992;Mercuri et al., 1993;Farkas et al., 1996). In SN, the decrease in NT-binding sites number surely is the result of the loss of DAergic neurons which express NT receptors. However, the interpretation of the decrease in NT binding sites in striatum is not that straightforward. Indeed, contradictory results concerning the exact localization (pre or postsynaptic) of NT receptors have been obtained in striatum. In some studies, it was reported that almost all NT receptors within the striatum were located on DAergic terminals (von Euler et al., 1989;Xia et al., 1996) while others reported that NT receptors were mostly expressed by striatal intrinsic neurons (Fuxe et al., 1992;Woulfe and Beaudet, A., 1992;Vincent et al., 1994). Another study showed that the decrease in NT receptors in monkey striatum treated with MPTP is smaller than the decrease in DA concentration, suggesting only a partial localization of NT receptors on nigrostriatal projections (Bayer et al., 1991). The same result was obtained comparing the presence of NT receptors and the DA content in post-mortem brain tissues from Parkinson's disease patients (Dauch et al., 1992;Villeneuve et al., 2000b). The decrease in striatal NT binding sites may not be only due to the loss of NT receptors on DAergic neurons but could be the result of an effect on striatal neurons themselves. More anatomical studies should be done to determine if NT receptors expressed by striatal medium spiny neurons are specifically decreased in PD.

In addition to the quantification of NT binding sites, the concentration of tissue NT has also been measured in order to determine changes induced by PD on the neurotensinergic system. It has been shown that plasma NT concentration is higher in parkinsonian patients compared to control patients and also higher in untreated patients

compared to levodopa-treated patients (Tanganelli et al., 1993). Studies made on post-mortem brains further showed that NT levels remain unchanged in PD compared to normal patients in the caudate nucleus, putamen and globus pallidus, while they were higher in substantia nigra compacta and reticulata (Kitabgi et al., 1991; Li et al., 1995) and decreased in the hippocampus (Li et al., 1995). Whether the increase in NT concentration in the SN is causally related to PD or whether it results indirectly from the loss of DA neurons or to drug therapy is not easy to determine. Indeed, since most PD patients are subjected to drug therapy, it is thus difficult to evaluate plasma NT concentration in non-medicated patients. However, it is interesting to compare PD to incidental Lewy Body disease. The presence of Lewy bodies in the brain is correlated with SN cell death even if the decrease is smaller than in PD (Teruel et al., 1999; Passafaro et al., 2003) and is considered to represent the PD presymptomatic phase (Jacobsen et al., 2001). These patients do not show any pathological symptoms and so do not receive medication. Interestingly, there is an increase in NT content in the post-mortem brain of patients afflicted by Lewy Body disease, even though the effect is not as large as in PD (Washbourne and McAllister, A. K., 2002). To the very least, this finding suggests that the increase in NT in PD is probably not secondary to pharmacotherapy.

In addition to human brains, NT levels were also measured in PD animal models and surprisingly, opposite results have been obtained. In 6-OHDA-lesioned rats, NT-immunoreactivity is increased in the striatum and globus pallidus while no change occurs in the substantia nigra (Hornykiewicz, 1966; Andersen et al., 2005). In MPTP-lesioned monkeys, no change in NT concentration was found in the striatum (Seeman et al., 1976).

In this same model, a previous study did not show any change in NT in the SN and striatum (Carlsson, 1988).

Although the relationship between NT and PD is not fully elucidated presently, one can speculate that the increase in NT levels observed in the human PD brain is the result of an adaptive mechanism in reaction to the loss of NT receptors and DAergic neurons. This increase in NT concentration could represent an attempt of the system to increase DAergic drive by stimulating the remaining NT receptors on DAergic neurons. Within this context, an obvious question is whether NT agonists could be useful as adjunctive treatment of PD. Some studies have indeed shown that exogenous NT can display antiparkinsonian properties in 6-OHDA-lesioned animals. In fact, intracerebroventricular administration of NT or some of its analogs results in attenuation of muscular rigidity and tremors observed in these animals (Grandy et al., 1989a; Grandy et al., 1989b). Also in 6-OHDA lesioned rats, the NT agonist NT-69L has an antiparkinson-like effect since it blocks rotating behaviour induced by D-amphetamine and apomorphine (Boudin et al., 1998). The exact mechanism of this NT-induced antiparkinsonian-like effect has not yet been determined. Based on the previously mentioned ability of NT to decrease D2R receptor function in the striatum, the use of NT receptor antagonists in the treatment of PD has also been considered. Administration of the NTS1 antagonist, SR48692 has been shown to enhance striatal DAergic transmission (Richard et al., 2001). However, a clinical trial with SR48692 in PD patients showed no improvement of symptoms (Delle Donne et al., 2004).

In conclusion, although no data is currently available to support a direct, causal role of NT in PD, some interesting correlative evidence has been obtained and some promising

recent studies on animal models support the potential role of NT agonists in the symptomatic treatment of PD.

6. Implication of NT in pain mechanisms?

The implication of NT in analgesia has been studied for many years (von Euler et al., 1990b). A high density of NT receptors is present throughout the PAG and the rostral ventromedial medulla (RVM), two structures implicated in descending nociceptive circuits (Quirion et al., 1985; Cleveland and Yen, T. J., 1989; Mitchusson et al., 1998; Trugnan et al., 2004). NT has analgesic effects that are naloxone-independent and consequently not dependent on opioids (von Euler et al., 1990a). The antinociceptive effect of NT has been reported after injection of the peptide in the many brain areas as well as intracisternally (Bauer et al., 1985), intrathecally (Kebabian and Calne, D. B., 1979), intracerebroventricularly (Civelli et al., 1993) or directly in areas rich in NT innervation such as the amygdala, medial preoptic area, thalamus, PAG and nucleus raphe magnus (Heinz et al., 2004). The location of the injection site can modify the intensity of the response to NT. Indeed, when injected in the central part of the amygdala, NT induces analgesia and increases hot plate response latency more effectively than if injected intracerebroventricularly (Missale et al., 1998). Compatible with the possible implication of endogenous NT in pain suppression mechanisms, a microdialysis study showed that NT is endogenously released in the PAG in mice after unilateral hindpaw inflammation using Complete Freund's Adjuvant (Nalivaiko et al., 1998).

Analgesic effects of NT have been widely reported, but in most of these studies, relatively high concentrations of NT were used. Studies performed using lower, perhaps more physiological concentrations, suggest that NT may actually induce hyperalgesia instead of analgesia. Such a phenomenon is observed when picomolar range concentrations (0,03 to 0,3 pmol) of NT are injected in the RVM, although injections at higher doses in the same nucleus induce analgesia (Wu and Wang, H. L., 1995; Wu et al., 1995; Cathala and Paupardin-Tritsch, D., 1997; Heinz et al., 2004). In addition, infusion of SR48692 in the RVM or intraperitoneal injection of this compound facilitates analgesia, therefore suggesting a hyperalgesia function for endogenous NT (Wu et al., 1995; Kaech et al., 1996; Cathala and Paupardin-Tritsch, D., 1997).

Both NTS1 and NTS2 appear to be implicated in NT-induced analgesia. The first studies on NT receptor subtypes mediating analgesia showed that the analgesic effect of NT was mediated by a subtype of receptor that is pharmacologically distinct from the previously characterized high affinity levocabastine-insensitive receptor and low affinity levocabastine-sensitive receptors (de Quidt and Emson, P. C., 1983; Hetier et al., 1988). Different results were obtained when suitable antagonists for the different receptors became available. Indeed, SR48692, a relatively selective antagonist of NTS1 when used at low doses, had no effect on NT-induced analgesia which suggested that another NT receptor subtype, presumably NTS2, was responsible for the phenomenon (Vincent et al., 1999). A subsequent study showed that levocabastine, a NTS2 agonist, displays an analgesic effect (Yang et al., 2004). However, another study showed that SR48692 inhibits NT-induced analgesia with complex multiphasic dose-response characteristics (Cathala and Paupardin-

Tritsch, D., 1997) suggesting the implication of more than one NT receptor subtype. A recent study also argues for the implication of NTS1, in addition to NTS2, in the analgesic effect of NT (Kim et al., 2001). Indeed, it was shown using the tail-flick test, that in addition to NT, the two NTS2 agonists levocabastine and JMV-431 both induce an antinociceptive response. However, the antinociceptive effect of NT was partly abolished by co-administration of SR48692, suggesting that in addition to NTS2, NTS1 also plays a modest role. Using NTS1 knock-out mice it was also possible to show that this receptor indeed plays a role in at least some kinds of painful stimuli since these mice present a defect in NT-induced analgesia in the hot-plate test (Elton and Martin, M. M., 2003), while no modification occurs in another nociceptive test, such as the phenyl-p-benzoquinone (PBQ)-induced writhings (Okuma et al., 1983). Concerning hyperalgesia, it has been shown that endogenous NT facilitates visceral pain response since in NT KO mice and in SR48692-treated rats there is attenuation of visceral nociception (Kaeck et al., 1996). The fact that both NTS1 and NTS2 are implicated in the central role of NT in pain control is compatible with the fact that both receptors are expressed in the PAG and raphe nuclei (Blaxall et al., 2000; Trugnan et al., 2004).

Taken together, the published data are thus compatible with a role of NT in pain mechanisms. Further evaluation of the possible use of NT agonists or antagonists as analgesic compounds thus seems warranted. Compatible with this, the NT analog NT69L has been reported to cause a rapid and persistent antinociceptive effect as determined by the hot plate test (Checler et al., 1988).

7. Possible implication of neurotensin in other diseases

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

7.1. Implication of in the central control of blood pressure

Hypotension was the first reported physiological effect of NT (Tanaka et al., 1990). A possible role of this peptide in hypertension would thus not be surprising. In anaesthetized rats, NT injected intracerebroventricularly induces hypotension while a smaller decrease is observed in non-anaesthetized rats (Sunahara et al., 1991; Ma et al., 2002). The NT receptor antagonist SR142948A is more effective than SR48692 to block this effect (Volkow et al., 2004). The nucleus of the solitary tract (NST) plays an important role in the central control of arterial pressure since it receives signals from baroreceptors and chemoreceptors of the cardiovascular system. NT injected into the NST causes a decrease in blood pressure (Steinberg et al., 1995; Sotty et al., 1998). NT69, a neurotensin receptor agonist that crosses the BBB induces hypotension (Congar et al., 2002). Opposite results were reported with conscious rats in which an intracerebroventricular injection of NT induces hypertension (White et al., 1999; Kudwa et al., 2005; Yang et al., 2005). Results obtained in these different studies are thus conflicting and the cause of this discrepancy remains unknown. However, we can speculate that differences in the site of injection or in anaesthesia may account for this. Nonetheless, the results presented here are clearly compatible with some role for NT in central regulation of blood pressure. In addition to

these results obtained using NT injections, it has been shown that in spontaneously hypertensive rats, there is a decrease in NT concentrations in many brain areas implicated in blood pressure regulation such as the hypothalamus, medulla oblongata pons, pituitary and spinal cord (Dityateva et al., 2003). Interestingly, suprachiasmatic nucleus neurotensin contents are greatly decreased in hypertensive patients compared to control (Shapira et al., 2003). The use of NT receptor knock-out mice would perhaps help to clarify the implication of NT in arterial pressure but changes in blood pressure have apparently not yet been evaluated in such animals.

7.2. NT and eating disorders

Food intake is controlled in part centrally by the hypothalamus, which is the site of integration of multiple signals such as hormones, neurotransmitters and peptides. Among them, NT is known to reduce food intake. Indeed, NT injected in the VTA or in the ventromedial part of the hypothalamus induces a decrease in food intake (Dziewczapolski et al., 1998; Hollon et al., 2002). There are also changes in NT expression in animals presenting eating disorders. Indeed, NT expression is increased in the hypothalamus of anorexic animals (Palacios and Kuhar, M. J., 1981). NT interacts with other food intake regulators such as leptin, a hormone produced by adipose tissues that reduces food intake. Indeed, administration of leptin increases hypothalamic NT expression in normal rats (von Euler et al., 1991) as well as in hypothalamic cell lines in vitro (Rogers et al., 2000). In addition, the NTS1 antagonist SR48692 appears to reverse leptin's action on satiety (Sibley and Neve KA., 1997). The expression of NT is also down-regulated in animal models

lacking leptin (Quirion et al., 1982). Other evidence for a role of NT in food intake comes from results obtained with NTS1-deficient mice (NTS1^{-/-}) which show a small increase in body weight compared to control (Okuma et al., 1983). Pharmacological studies also support a role of NT in body weight homeostasis. The NT analog, NT69L reduces body weight and food intake in normal and obese rats (Sokoloff et al., 1990). These results are promising with regards to the possible use of NT ligands as therapeutic drugs in eating disorders.

7.3. NT and cancer

NT expression arises early in embryonic development and it has been suggested that it could thus play a role in cell cycle regulation (Van Tol et al., 1991; Horstmeyer et al., 1996). Compatible with this hypothesis, NT has been associated with progression and differentiation of tumours in the periphery and central nervous systems (May and Wightman, R. M., 1989). The implication of NT in cancer has been studied extensively in the periphery where it has been shown that the size of some colon or lung tumours increases in the presence of NT (Helmeste and Tang, S. W., 2000; Everett and Senogles, S. E., 2004) and become smaller in the presence of the NTS1 antagonist SR48692 (Cussac et al., 1999; Everett and Senogles, S. E., 2004). The presence of NTS1 has been reported in human tumours of the ovary, pancreas, prostate and Ewing's sarcomas, as well as centrally in meningiomas and astrocytomas (May and Wightman, R. M., 1989; Mercuri et al., 1997; L'hirondel et al., 1998; Kuzhikandathil and Oxford, G. S., 1999). The transcription of the NTS1 gene is also apparently increased in human colonic adenomas (Bonci and Hopf,

2005). In dividing human neuroblastoma (CHP 212) and murine neuroblastoma (N1E-^{XL}115) cells, it has been reported that during prolonged NT agonist stimulation, NTS1 receptors are recycled to the cell surface, thus allowing constant cell sensitization and chronic activation of mitogen-activated protein kinases p42 and p44 (Sazani and Kole, R., 2003), compatible with a potential role in oncogenic regulation.

A possible implication of NTS3 in cancer has also been explored. Indeed, NTS3 and NTS1 are present in almost all cancer cells from prostate, pancreas and colon (Wojcikiewicz, 2004; Duvernay et al., 2005). However, no data has yet showed the presence of NTS3 in central tumours. Little is known about the signalling pathways activated by NTS3, but the receptor is present inside the cell in close proximity to the nucleus (Shenoy et al., 2001). This characteristic gives NTS3 a good profile for being a candidate in mediating NT-induced proliferative signals. Considering the strong evidence in favour of a role of NT in peripheral tumours, it would seem that additional efforts should be directed toward a better comprehension of the role of NT in cancers of the CNS.

7.4. Neurodegenerative disorders and stroke

There is currently little evidence for a role of endogenous NT in neurodegenerative disorders or stroke. A possible implication of NT in neurodegenerative disorders is nonetheless suggested by the finding that in the suprachiasmatic nucleus of Alzheimer's patients there is a significant decrease in NT containing neurons (1984). Due to the lack of conclusive evidence, it is nonetheless difficult to know whether NT can directly contribute to neurodegenerative diseases. However, NT enhances glutamate-induced excitotoxicity

through NTS1 activation as suggested by the blockade of this effect with SR48692 (Morris et al., 1998). In sharp contrast, others have suggested that NT reduces neuronal death and infarct volume in experimental ischemia models (Ungerstedt, 1971; Fallon and Moore, 1978). This protective effect of NT could be partly explained by the ability of this peptide to induce hypothermia, a condition that is well-known to be neuroprotective against ischemia-induced central infarcts (Di Chiara and North, R. A., 1992).

7.5. NT and inflammation

Findings both in and outside the nervous systems have long supported a role of NT in inflammation, acting as a pro-inflammatory cytokine. It was first described that peripheral NT elicits inflammatory symptoms such as vasodilatation, enhanced vascular permeability, mast cell degranulation, and enhancement of directional migration and phagocytosis of neutrophils (Fuxe et al., 1998). NT was later shown to enhance the production of IL-1 by activated alveolar macrophages (Feldman et al., 1997). In the gastrointestinal tract, a tissue rich in NTS1, NT has been involved in the pathophysiology of colonic inflammation (Boyson et al., 1986). NT is also known to stimulate IL-8 secretion and IL-8 gene expression in human colonocyte cells (Moore et al., 2005). Although NT is usually thought to be pro-inflammatory, an opposite effect has been recently described in chronic inflammatory damage induced by dextran sodium sulfate in mice. In this model, NTS1 activation has shown to stimulate intestinal wound healing through a COX-2 dependent pathway (von Zastrow and Kobilka, B. K., 1992).

The first evidence about the involvement of NT in immune responses in the CNS was provided by the finding that the endotoxin lipopolysaccharide is able to induce the expression of NT mRNA in CRH neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (Fritze and Anderson, T. R., 2000). Based on this work, it has been speculated that NT may be released in the pituitary portal blood to trigger pituitary responses associated with mobilization of the immune system. More recently, it has been shown that NT also induces expression of several cytokines/chemokines including IL-1 and MIP-2 in microglia cells, which are otherwise known to express only the NTS3 receptor (Zhang et al., 2001), thus supporting the involvement of NTS3 in CNS inflammation. Finally, it is interesting to note that descending inhibition and facilitation during peripheral inflammation are due in part to inflammation-induced changes in the rostral ventromedial medulla that involve NT and glutamate receptors (Gomes et al., 2001). In spite of the scarce evidence about a role for NT in CNS inflammation, speculations have risen about the possibility that a NT proinflammatory stimulus acting through microglia cells could contribute to brain inflammation in degenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's diseases.

8. Future challenges and conclusions.

Together, the results presented in this brief review demonstrate that although endogenous NT has not been conclusively demonstrated to be causally involved in any one CNS disorder, there is a trail of evidence arguing for its implication in many. Among those, drug dependence, pain and cancer appear as the most promising. Future work using genetically

modified animals, gene down-regulation strategies and new centrally active pharmacological ligands should continue to advance our understanding of the role of NT in health and disease.

References

1. Adams DH, Hanson GR, Keefe KA. Differential effects of cocaine and methamphetamine on neurotensin/neuromedin N and preprotachykinin messenger RNA expression in unique regions of the striatum. *Neuroscience* 2001;102:843-51.
2. Agnati LF, Fuxe K, Battistini N, et al. Further evidence for the existence of interactions between receptors for dopamine and neurotensin. Dopamine reduces the affinity and increases the number of. *Acta Physiol Scand* 1985;124:125-8.
3. al-Rodhan NR, Richelson E, Gilbert JA, et al. Structure-antinociceptive activity of neurotensin and some novel analogues in the periaqueductal gray region of the brainstem. *Brain Res* 1991;557:227-35.
4. Alexander MJ, Leeman SE. Widespread expression in adult rat forebrain of mRNA encoding high-affinity neurotensin receptor. *J Comp Neurol* 1998;402:475-500.
5. Allen JM, Cross AJ, Yeats JC, et al. Neuropeptides and dopamine in the marmoset. Effect of treatment with 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6 tetrahydropyridine (MPTP): an animal model for Parkinson's disease? *Brain* 1986;109 (Pt 1):143-57.

6. Almenoff J, Wilk S, Orlowski M. Membrane bound pituitary metalloendopeptidase: apparent identity to enkephalinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1981;102:206-14.
7. Alonso A, Faure MP, Beaudet A. Neurotensin promotes oscillatory bursting behavior and is internalized in basal forebrain cholinergic neurons. *J Neurosci* 1994;14:5778-92.
8. Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, et al. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13461-6.
9. Antonelli T, Ferraro L, Fuxe K, et al. Neurotensin enhances endogenous extracellular glutamate levels in primary cultures of rat cortical neurons: involvement of neurotensin receptor in NMDA induced excitotoxicity. *Cereb Cortex* 2004;14:466-73.
10. Antonelli T, Tomasini MC, Finetti S, et al. Neurotensin enhances glutamate excitotoxicity in mesencephalic neurons in primary culture. *J Neurosci Res* 2002;70:766-73.
11. Asakura K, Matsuo Y, Kanemasa T, et al. P/Q-type Ca²⁺ channel blocker omega-agatoxin IVA protects against brain injury after focal ischemia in rats. *Brain Res* 1997;776:140-5.

12. Austin J, Hoogendoorn B, Buckland P, et al. Comparative sequencing of the proneurotensin gene and association studies in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2000;5:208-12.
13. Babcock AM, Baker DA, Hallock NL, et al. Neurotensin-induced hypothermia prevents hippocampal neuronal damage and increased locomotor activity in ischemic gerbils. *Brain Res Bull* 1993;32:373-8.
14. Bauco P, Rompre PP. Effects of neurotensin receptor activation on brain stimulation reward in Fischer 344 and Lewis rats. *Eur J Pharmacol* 2001;432:57-61.
15. Bauer B, Ehinger B, Tornqvist K, et al. Neurotransmitter release by certain neuropeptides in the chicken retina. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1985;63:581-7.
16. Bayer VE, Towle AC, Pickel VM. Vesicular and cytoplasmic localization of neurotensin-like immunoreactivity (NTLI) in neurons postsynaptic to terminals containing NTLI and/or tyrosine hydroxylase in the rat central nucleus of the amygdala. *J Neurosci Res* 1991;30:398-413.
17. Beaudet A, Mazella J, Nouel D, et al. Internalization and intracellular mobilization of neurotensin in neuronal cells. *Biochem Pharmacol* 1994;47:43-52.
18. Behbehani MM. Physiological mechanisms of the analgesic effect of neurotensin. *Ann N Y Acad Sci* 1992;668:253-65.

19. Beitz AJ. The sites of origin brain stem neurotensin and serotonin projections to the rodent nucleus raphe magnus. *J Neurosci* 1982;2:829-42.
20. Betancur C, Lepee-Lorgeoux I, Cazillis M, et al. Neurotensin gene expression and behavioral responses following administration of psychostimulants and antipsychotic drugs in dopamine D(3) receptor deficient mice. *Neuropsychopharmacology* 2001;24:170-82.
21. Binder EB, Kinkead B, Owens MJ, et al. Enhanced neurotensin neurotransmission is involved in the clinically relevant behavioral effects of antipsychotic drugs: evidence from animal models of sensorimotor gating. *J Neurosci* 2001;21:601-8.
22. Binder EB, Kinkead B, Owens MJ, et al. Neurotensin and dopamine interactions. *Pharmacol Rev* 2001;53:453-86.
23. Bissette G, Nemeroff CB, Decker MW, et al. Alterations in regional brain concentrations of neurotensin and bombesin in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1985;17:324-8.
24. Blaha CD, Phillips AG. Pharmacological evidence for common mechanisms underlying the effects of neurotensin and neuroleptics on in vivo dopamine efflux in the rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 1992;49:867-77.

25. Bolam JP, Wainer BH, Smith AD. Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 1984;12:711-8.
26. Botsios DS, Vasiliadis KD. Factors enhancing intestinal adaptation after bowel compensation. *Dig Dis* 2003;21:228-36.
27. Botto JM, Chabry J, Sarret P, et al. Stable expression of the mouse levocabastine-sensitive neurotensin receptor in HEK 293 cell line: binding properties, photoaffinity labeling, and internalization mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243:585-90.
28. Botto JM, Sarret P, Vincent JP, et al. Identification and expression of a variant isoform of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor in the mouse central nervous system. *FEBS Lett* 1997;400:211-4.
29. Boudin H, Pelaprat D, Rostene W, et al. Cellular distribution of neurotensin receptors in rat brain: immunohistochemical study using an antipeptide antibody against the cloned high affinity receptor. *J Comp Neurol* 1996;373:76-89.
30. Boules M, Cusack B, Zhao L, et al. A novel neurotensin peptide analog given extracranially decreases food intake and weight in rodents. *Brain Res* 2000;865:35-44.

31. Boules M, Fredrickson P, Richelson E. Neurotensin agonists as an alternative to antipsychotics. *Expert Opin Investig Drugs* 2005;14:359-69.
32. Boules M, McMahon B, Warrington L, et al. Neurotensin analog selective for hypothermia over antinociception and exhibiting atypical neuroleptic-like properties. *Brain Res* 2001;919:1-11.
33. Boules M, Warrington L, Fauq A, et al. A novel neurotensin analog blocks cocaine- and D-amphetamine-induced hyperactivity. *Eur J Pharmacol* 2001;426:73-6.
34. Boules M, Warrington L, Fauq A, et al. Antiparkinson-like effects of a novel neurotensin analog in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Eur J Pharmacol* 2001;428:227-33.
35. Breslin NA, Suddath RL, Bissette G, et al. CSF concentrations of neurotensin in schizophrenia: an investigation of clinical and biochemical correlates. *Schizophr Res* 1994;12:35-41.
36. Brun P, Mastrotto C, Beggiao E, et al. Neuropeptide neurotensin stimulates intestinal wound healing following chronic intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G621-9.
37. Buhler AV, Choi J, Proudfit HK, et al. Neurotensin activation of the NTR1 on spinally-projecting serotonergic neurons in the rostral ventromedial medulla is antinociceptive. *Pain* 2005;114:285-94.

38. Cadet JL, Kujirai K, Przedborski S. Bilateral modulation of. *Brain Res* 1991;564:37-44.
39. Cador M, Kelley AE, Le Moal M, et al. Ventral tegmental area infusion of substance P, neurotensin and enkephalin: differential effects on feeding behavior. *Neuroscience* 1986;18:659-69.
40. Canonico PL, Speciale C, Sortino MA, et al. Involvement of arachidonate metabolism in neurotensin-induced prolactin release in vitro. *Am J Physiol* 1985;249:E257-63.
41. Cape EG, Manns ID, Alonso A, et al. Neurotensin-induced bursting of cholinergic basal forebrain neurons promotes gamma and theta cortical activity together with waking and paradoxical sleep. *J Neurosci* 2000;20:8452-61.
42. Carraway R, Leeman SE. The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 1973;248:6854-61.
43. Castagliuolo I, Wang CC, Valenick L, et al. Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation. *J Clin Invest* 1999;103:843-9.
44. Castel MN, Morino P, Frey P, et al. Immunohistochemical evidence for a neurotensin striatonigral pathway in the rat brain. *Neuroscience* 1993;55:833-47.

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

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

58. Cooper PE, Fernstrom MH, Rorstad OP, et al. The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. *Brain Res* 1981;218:219-32.
59. Corley KC, Phan TH, Daugherty WP, et al. Stress-induced activation of median raphe serotonergic neurons in rats is potentiated by the neurotensin antagonist, SR 48692. *Neurosci Lett* 2002;319:1-4.
60. Cui H, Cai F, Belsham DD. Anorexigenic hormones leptin, insulin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone directly induce neurotensin (NT) gene expression in novel NT-expressing cell models. *J Neurosci* 2005;25:9497-506.
61. Cusack B, Boules M, Tyler BM, et al. Effects of a novel neurotensin peptide analog given extracranially on CNS behaviors mediated by apomorphine and haloperidol. *Brain Res* 2000;856:48-54.
62. Dal Farra C, Sarret P, Navarro V, et al. Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines. *Int J Cancer* 2001;92:503-9.
63. Dauch P, Masuo Y, Vincent JP, et al. Endopeptidase 24-16 in murines: tissue distribution, cerebral regionalization, and ontogeny. *J Neurochem* 1992;59:1862-7.

64. Davis TP, Burgess HS, Crowell S, et al. Beta-endorphin and neurotensin stimulate in vitro clonal growth of human SCLC cells. *Eur J Pharmacol* 1989;161:283-5.
65. de Quidt ME, Emson PC. Neurotensin facilitates dopamine release in vitro from rat striatal slices. *Brain Res* 1983;274:376-80.
66. Diaz-Cabiale Z, Fuxe K, Narvaez JA, et al. Neurotensin-induced modulation of dopamine D2 receptors and their function in rat striatum: counteraction by a NTR1-like receptor antagonist. *Neuroreport* 2002;13:763-6.
67. Dicou E, Vincent JP, Mazella J. Neurotensin receptor-3/sortilin mediates neurotensin-induced cytokine/chemokine expression in a murine microglial cell line. *J Neurosci Res* 2004;78:92-9.
68. Dobner PR, Barber DL, Villa-Komaroff L, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:3516-20.
69. Dobner PR, Deutch AY, Fadel J. Neurotensin: dual roles in psychostimulant and antipsychotic drug responses. *Life Sci* 2003;73:801-11.
70. Dubuc I, Costentin J, Terranova JP, et al. The nonpeptide neurotensin antagonist, SR 48692, used as a tool to reveal putative neurotensin receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 1994;112:352-4.

71. Dubuc I, Remande S, Costentin J. The partial agonist properties of levocabastine in neurotensin-induced analgesia. *Eur J Pharmacol* 1999;381:9-12.
72. Ehlers RA, Zhang Y, Hellmich MR, et al. Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:704-8.
73. Elde R, Schalling M, Ceccatelli S, et al. Localization of neuropeptide receptor mRNA in rat brain: initial observations using probes for neurotensin and substance P receptors. *Neurosci Lett* 1990;120:134-8.
74. Elek J, Pinzon W, Park KH, et al. Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer. *Anticancer Res* 2000;20:53-8.
75. Engber TM, Susel Z, Kuo S, et al. Levodopa replacement therapy alters enzyme activities in striatum and neuropeptide content in striatal output regions of 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 1991;552:113-8.
76. Ervin GN, Birkemo LS, Nemeroff CB, et al. Neurotensin blocks certain amphetamine-induced behaviours. *Nature* 1981;291:73-6.
77. Erwin VG, Markel PD, Johnson TE, et al. Common quantitative trait loci for alcohol-related behaviors and central nervous system neurotensin measures: hypnotic and hypothermic effects. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:911-8.

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

85. Feifel D, Melendez G, Shilling PD. A systemically administered neurotensin agonist blocks disruption of prepulse inhibition produced by a serotonin-2A agonist. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:651-3.
86. Feifel D, Melendez G, Shilling PD. Reversal of sensorimotor gating deficits in Brattleboro rats by acute administration of clozapine and a neurotensin agonist, but not haloperidol: a potential predictive model for novel antipsychotic effects. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:731-8.
87. Feifel D, Minor KL, Dulawa S, et al. The effects of intra-accumbens neurotensin on sensorimotor gating. *Brain Res* 1997;760:80-4.
88. Feifel D, Reza TL. Effects of neurotensin administered into the ventral tegmental area on prepulse inhibition of startle. *Behav Brain Res* 1999;106:189-93.
89. Feifel D, Reza TL, Robeck SL. Pro-dopamine effects of neurotensin on sensorimotor gating deficits. *Peptides* 1997;18:1457-60.
90. Feifel D, Reza TL, Wustrow DJ, et al. Novel antipsychotic-like effects on prepulse inhibition of startle produced by a neurotensin agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:710-3.
91. Fernandez A, de Ceballos ML, Jenner P, et al. Neurotensin, substance P, delta and mu opioid receptors are decreased in basal ganglia of Parkinson's disease patients. *Neuroscience* 1994;61:73-9.

92. Fernandez A, de Ceballos ML, Rose S, et al. Alterations in peptide levels in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. *Brain* 1996;119 (Pt 3):823-30.
93. Fernandez A, Jenner P, Marsden CD, et al. Characterization of neurotensin-like immunoreactivity in human basal ganglia: increased neurotensin levels in substantia nigra in Parkinson's disease. *Peptides* 1995;16:339-46.
94. Ferraro L, Antonelli T, O'Connor WT, et al. The striatal neurotensin receptor modulates striatal and pallidal glutamate and GABA release: functional evidence for a pallidal glutamate-GABA interaction via the pallidal-subthalamic nucleus loop. *J Neurosci* 1998;18:6977-89.
95. Ferraro L, O'Connor WT, Antonelli T, et al. Differential effects of intrastriatal neurotensin(1-13) and neurotensin(8-13) on striatal dopamine and pallidal GABA release. A dual-probe microdialysis study in the awake rat. *Eur J Neurosci* 1997;9:1838-46.
96. Ferraro L, Tanganelli S, O'Connor WT, et al. Neurotensin increases endogenous glutamate release in the neostriatum of the awake rat. *Synapse* 1995;20:362-4.
97. Ferraro L, Tomasini MC, Fernandez M, et al. Nigral neurotensin receptor regulation of nigral glutamate and nigroventral thalamic GABA transmission: a dual-probe microdialysis study in intact conscious rat brain. *Neuroscience* 2001;102:113-20.

98. Forno LS, Alvord EC Jr. The pathology of Parkinsonism. Part I. Some new observations and correlations. *Contemp Neurol Ser* 1971;8:119-30.
99. Fuxe K, Von Euler G, Agnati LF, et al. Intramembrane interactions between neurotensin receptors and dopamine D2 receptors as a major mechanism for the neuroleptic-like action of neurotensin. *Ann N Y Acad Sci* 1992;668:186-204.
100. Gailly P. Ca²⁺ entry in CHO cells, after Ca²⁺ stores depletion, is mediated by arachidonic acid. *Cell Calcium* 1998;24:293-304.
101. Garver DL, Bissette G, Yao JK, et al. Relation of CSF neurotensin concentrations to symptoms and drug response of psychotic patients. *Am J Psychiatry* 1991;148:484-8.
102. Gendron L, Perron A, Payet MD, et al. Low-affinity neurotensin receptor (NTS2) signaling: internalization-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Mol Pharmacol* 2004;66:1421-30.
103. Gibb WR, Esiri MM, Lees AJ. Clinical and pathological features of diffuse cortical Lewy body disease (Lewy body dementia). *Brain* 1987;110 (Pt 5):1131-53.
104. Glimcher PW, Giovino AA, Hoebel BG. Neurotensin self-injection in the ventral tegmental area. *Brain Res* 1987;403:147-50.

105. Glimcher PW, Margolin DH, Giovino AA, et al. Neurotensin: a new 'reward peptide'. *Brain Res* 1984;291:119-24.
106. Goedert M, Lightman SL, Mantyh PW, et al. Neurotensin-like immunoreactivity and neurotensin receptors in the rat hypothalamus and in the neurointermediate lobe of the pituitary gland. *Brain Res* 1985;358:59-69.
107. Goldman R, Bar-Shavit Z, Romeo D. Neurotensin modulates human neutrophil locomotion and phagocytic capability. *FEBS Lett* 1983;159:63-7.
108. Goncharuk VD, van Heerikhuize J, Dai JP, et al. Neuropeptide changes in the suprachiasmatic nucleus in primary hypertension indicate functional impairment of the biological clock. *J Comp Neurol* 2001;431:320-30.
109. Gonzales C, Chesselet MF. Amygdalonigral pathway: an anterograde study in the rat with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). *J Comp Neurol* 1990;297:182-200.
110. Goulet M, Morissette M, Grondin R, et al. Neurotensin receptors and dopamine transporters: effects of MPTP lesioning and chronic dopaminergic treatments in monkeys. *Synapse* 1999;32:153-64.
111. Gui X, Carraway RE, Dobner PR. Endogenous neurotensin facilitates visceral nociception and is required for stress-induced antinociception in mice and rats. *Neuroscience* 2004;126:1023-32.

112. Gully D, Canton M, Boigegrain R, et al. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective nonpeptide antagonist of the neurotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:65-9.
113. Gully D, Labeeuw B, Boigegrain R, et al. Biochemical and pharmacological activities of SR 142948A, a new potent neurotensin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:802-12.
114. Gygi SP, Gibb JW, Hanson GR. Differential effects of antipsychotic and psychotomimetic drugs on neurotensin systems of discrete extrapyramidal and limbic regions. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:192-7.
115. Hadden MK, Orwig KS, Kokko KP, et al. Design, synthesis, and evaluation of the antipsychotic potential of orally bioavailable neurotensin (8-13) analogues containing non-natural arginine and lysine residues. *Neuropharmacology* 2005;49:1149-59.
116. Hanson GR, Smiley P, Johnson M, et al. Response by the neurotensin systems of the basal ganglia to cocaine treatment. *Eur J Pharmacol* 1989;160:23-30.
117. Hara Y, Shiosaka S, Senba E, et al. Ontogeny of the neurotensin-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis. I. Forebrain and diencephalon. *J Comp Neurol* 1982;208:177-95.

118. Hawkins MF, Barkemeyer CA, Tulley RT. Synergistic effects of dopamine agonists and centrally administered neurotensin on feeding. *Pharmacol Biochem Behav* 1986;24:1195-201.
119. Hermans-Borgmeyer I, Hermey G, Nykjaer A, et al. Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;65:216-9.
120. Hermans E, Maloteaux JM. Mechanisms of regulation of neurotensin receptors. *Pharmacol Ther* 1998;79:89-104.
121. Hermans E, Vanisberg MA, Geurts M, et al. Down-regulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons. *Neurochem Int* 1997;31:291-9.
122. Hertel P, Mathe JM, Nomikos GG, et al. Effects of D-amphetamine and phencyclidine on behavior and extracellular concentrations of neurotensin and dopamine in the ventral striatum and the medial prefrontal cortex of the rat. *Behav Brain Res* 1995;72:103-14.
123. Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci* 2004;27:735-43.
124. Herve D, Tassin JP, Studler JM, et al. Dopaminergic control of 125I-labeled neurotensin binding site density in corticolimbic structures of the rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:6203-7.

125. Hetier E, Boireau A, Dubedat P, et al. Neurotensin effects on evoked release of dopamine in slices from striatum, nucleus accumbens and prefrontal cortex in rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1988;337:13-7.
126. Hollerman JR, Abercrombie ED, Grace AA. Electrophysiological, biochemical, and behavioral studies of acute haloperidol-induced depolarization block of nigral dopamine neurons. *Neuroscience* 1992;47:589-601.
127. Holst B, Holliday ND, Bach A, et al. Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem* 2004;279:53806-17.
128. Hosli E, Stauffer S, Hosli L. Autoradiographic and electrophysiological evidence for the existence of neurotensin receptors on cultured astrocytes. *Neuroscience* 1995;66:627-33.
129. Hosli L, Hosli E, Heuss L, et al. Electrophysiological evidence for receptors for vasoactive intestinal peptide and angiotensin II on astrocytes of cultured rat central nervous system. *Neurosci Lett* 1989;102:217-22.
130. Hylden JL, Wilcox GL. Antinociceptive action of intrathecal neurotensin in mice. *Peptides* 1983;4:517-20.
131. Inagaki S, Kubota Y, Shinoda K, et al. Neurotensin-containing pathway from the endopiriform nucleus and the adjacent prepiriform cortex to the dorsomedial thalamic nucleus in the rat. *Brain Res* 1983;260:143-6.

132. Inagaki S, Shinoda K, Kubota Y, et al. Evidence for the existence of a neurotensin-containing pathway from the endopiriform nucleus and the adjacent prepiriform cortex to the anterior olfactory nucleus and nucleus of diagonal band (Broca) of the rat. *Neuroscience* 1983;8:487-93.
133. Iversen LL, Iversen SD, Bloom F, et al. Calcium-dependent release of somatostatin and neurotensin from rat brain in vitro. *Nature* 1978;273:161-3.
134. Iwase K, Evers BM, Hellmich MR, et al. Indirect inhibitory effect of a neurotensin receptor antagonist on human colon cancer (LoVo) growth. *Surg Oncol* 1996;5:245-51.
135. Iwata T, Hashimoto H, Hiwada K, et al. Changes of plasma renin activity by intracerebroventricular administration of biological active peptides in conscious rats. *Clin Exp Hypertens A* 1984;6:1055-66.
136. Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, et al. Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chem* 2001;276:22788-96.
137. Jennes L, Stumpf WE, Kalivas PW. Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 1982;210:211-24.
138. Jolas T, Aghajanian GK. Neurotensin excitation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. *Eur J Neurosci* 1996;8:153-61.

139. Jolas T, Aghajanian GK. Neurotensin and the serotonergic system. *Prog Neurobiol* 1997;52:455-68.
140. Jolicoeur FB, Rivest R, St-Pierre S, et al. Antiparkinson-like effects of neurotensin in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 1991;538:187-92.
141. Jones BE. Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex. *Prog Brain Res* 2004;145:157-69.
142. Juaneda C, Lafon-Dubourg P, Ciofi P, et al. Immune challenge-stimulated hypophysiotropic corticotropin-releasing hormone messenger RNA expression is associated with an induction of neurotensin messenger RNAs without alteration of vasopressin messenger RNAs. *Neuroscience* 1999;93:393-400.
143. Kalivas PW. Blockade of neurotensin-induced motor activity by inhibition of protein kinase. *Psychopharmacology (Berl)* 1994;114:175-80.
144. Kalivas PW, Burgess SK, Nemeroff CB, et al. Behavioral and neurochemical effects of neurotensin microinjection into the ventral tegmental area of the rat. *Neuroscience* 1983;8:495-505.
145. Kalivas PW, Duffy P. Effect of acute and daily neurotensin and enkephalin treatments on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 1990;10:2940-9.

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

153. Kislauskis E, Bullock B, McNeil S, et al. The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *J Biol Chem* 1988;263:4963-8.
154. Kiss A, Palkovits M, Antoni FA, et al. Neurotensin in the rat median eminence: the possible sources of neurotensin-like fibers and varicosities in the external layer. *Brain Res* 1987;416:129-35.
155. Kitabgi P, De Nadai F, Cuber JC, et al. Calcium-dependent release of neuromedin N and neurotensin from mouse hypothalamus. *Neuropeptides* 1990;15:111-4.
156. Kitabgi P, Masuo Y, Nicot A, et al. Marked variations of the relative distributions of neurotensin and neuromedin N in micropunched rat brain areas suggest differential processing of their common precursor. *Neurosci Lett* 1991;124:9-12.
157. Kitabgi P, Rostene W, Dussailant M, et al. Two populations of neurotensin binding sites in murine brain: discrimination by the antihistamine levocabastine reveals markedly different radioautographic distribution. *Eur J Pharmacol* 1987;140:285-93.
158. Kiyama H, Shiosaka S, Sakamoto N, et al. A neurotensin-immunoreactive pathway from the subiculum to the mammillary body in the rat. *Brain Res* 1986;375:357-9.

159. Kubo T, Kihara M. Modulation of the aortic baroreceptor reflex by neuropeptide Y, neurotensin and vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1990;342:182-8.
160. Labbe-Jullie C, Dubuc I, Brouard A, et al. In vivo and in vitro structure-activity studies with peptide and pseudopeptide neurotensin analogs suggest the existence of distinct central neurotensin receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;268:328-36.
161. Laitinen K, Crawley JN, Mefford IN, et al. Neurotensin and cholecystinin microinjected into the ventral tegmental area modulate microdialysate concentrations of dopamine and metabolites in the posterior nucleus accumbens. *Brain Res* 1990;523:342-6.
162. Lapchak PA, Araujo DM, Quirion R, et al. Neurotensin regulation of endogenous acetylcholine release from rat cerebral cortex: effect of quinolinic acid lesions of the basal forebrain. *J Neurochem* 1990;55:1397-403.
163. Lapchak PA, Araujo DM, Quirion R, et al. Neurotensin regulation of endogenous acetylcholine release from rat striatal slices is independent of dopaminergic tone. *J Neurochem* 1991;56:651-7.
164. Legault M, Congar P, Michel FJ, et al. Presynaptic action of neurotensin on cultured ventral tegmental area dopaminergic neurones. *Neuroscience* 2002;111:177-87.

165. Lemaire I. Neurotensin enhances IL-1 production by activated alveolar macrophages. *J Immunol* 1988;140:2983-8.
166. Leonetti M, Brun P, Clerget M, et al. Specific involvement of neurotensin type 1 receptor in the neurotensin-mediated in vivo dopamine efflux using knock-out mice. *J Neurochem* 2004;89:1-6.
167. Lepee-Lorgeoux I, Betancur C, Rostene W, et al. Differential ontogenetic patterns of levocabastine-sensitive neurotensin NT2 receptors and of NT1 receptors in the rat brain revealed by in situ hybridization. *Brain Res Dev Brain Res* 1999;113:115-31.
168. Letter AA, Merchant K, Gibb JW, et al. Effect of methamphetamine on neurotensin concentrations in rat brain regions. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;241:443-7.
169. Li AH, Yeh TH, Tan PP, et al. Neurotensin excitation of serotonergic neurons in the rat nucleus raphe magnus: ionic and molecular mechanisms. *Neuropharmacology* 2001;40:1073-83.
170. Li XM, Ferraro L, Tanganelli S, et al. Neurotensin peptides antagonistically regulate postsynaptic dopamine D2 receptors in rat nucleus accumbens: a receptor binding and microdialysis study. *J Neural Transm Gen Sect* 1995;102:125-37.

171. Lindstrom LH, Widerlov E, Bisette G, et al. Reduced CSF neurotensin concentration in drug-free schizophrenic patients. *Schizophr Res* 1988;1:55-9.
172. Liu F, Yang P, Baez M, et al. Neurotensin negatively modulates Akt activity in neurotensin receptor-1-transfected AV12 cells. *J Cell Biochem* 2004;92:603-11.
173. Liu Y, Hillefors-Berglund M, von Euler G. Modulation of dopamine D3 receptor binding by N-ethylmaleimide and neurotensin. *Brain Res* 1994;643:343-8.
174. Maeda K, Frohman LA. Neurotensin release by rat hypothalamic fragments in vitro. *Brain Res* 1981;210:261-9.
175. Manberg PJ, Nemeroff CB, Bisette G, et al. Neuropeptides in CSF and post-mortem brain tissue of normal controls, schizophrenics and Huntington's choreics. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1985;9:97-108.
176. Maoret JJ, Anini Y, Rouyer-Fessard C, et al. Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice. *Int J Cancer* 1999;80:448-54.
177. Martin S, Navarro V, Vincent JP, et al. Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line. *Gastroenterology* 2002;123:1135-43.

178. Martin S, Vincent JP, Mazella J. Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J Neurosci* 2003;23:1198-205.
179. Matthews RT. Neurotensin depolarizes cholinergic and a subset of non-cholinergic septal/diagonal band neurons by stimulating neurotensin-1 receptors. *Neuroscience* 1999;94:775-83.
180. Mazella J. Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking? *Cell Signal* 2001;13:1-6.
181. Mazella J, Botto JM, Guillemare E, et al. Structure, functional expression, and cerebral localization of the levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J Neurosci* 1996;16:5613-20.
182. Mazella J, Zsurger N, Navarro V, et al. The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 1998;273:26273-6.
183. Meltzer HY, Arvanitis L, Bauer D, et al. Placebo-controlled evaluation of four novel compounds for the treatment of schizophrenia and schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 2004;161:975-84.
184. Memo M, Castelletti L, Valerio A, et al. Identification of neurotensin receptors associated with calcium channels and prolactin release in rat pituitary. *J Neurochem* 1986;47:1682-8.

185. Merchant KM, Dobner PR, Dorsa DM. Differential effects of haloperidol and clozapine on neurotensin gene transcription in rat neostriatum. *J Neurosci* 1992;12:652-63.
186. Merchant KM, Miller MA, Ashleigh EA, et al. Haloperidol rapidly increases the number of neurotensin mRNA-expressing neurons in neostriatum of the rat brain. *Brain Res* 1991;540:311-4.
187. Merchenthaler I, Lennard DE. The hypophysiotropic neurotensin-immunoreactive neuronal system of the rat brain. *Endocrinology* 1991;129:2875-80.
188. Mercuri NB, Stratta F, Calabresi P, et al. Neurotensin induces an inward current in rat mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci Lett* 1993;153:192-6.
189. Mesnage V, Houeto JL, Bonnet AM, et al. Neurokinin B, neurotensin, and cannabinoid receptor antagonists and Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol* 2004;27:108-10.
190. Mijster MJ, Docter GJ, Voorn P. Risperidone does not elevate neurotensin mRNA in rat nucleus accumbens and caudate-putamen. *Neuroreport* 1995;6:2209-12.
191. Moga MM, Saper CB, Gray TS. Bed nucleus of the stria terminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 1989;283:315-32.

192. Morin AJ, Beaudet A. Origin of the neurotensinergic innervation of the rat basal forebrain studied by retrograde transport of cholera toxin. *J Comp Neurol* 1998;391:30-41.
193. Morinville A, Martin S, Lavallee M, et al. Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2153-68.
194. Morris NJ, Ross SA, Lane WS, et al. Sortilin is the major 110-kDa protein in GLUT4 vesicles from adipocytes. *J Biol Chem* 1998;273:3582-7.
195. Morrow EL, Erwin VG. Calcium influence on neurotensin and beta-endorphin enhancement of ethanol sensitivity in selectively bred mouse lines. *Alcohol Drug Res* 1987;7:225-32.
196. Motoi Y, Aizawa T, Haga S, et al. Neuronal localization of a novel mosaic apolipoprotein E receptor, LR11, in rat and human brain. *Brain Res* 1999;833:209-15.
197. Munck Petersen C, Nielsen MS, Jacobsen C, et al. Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J* 1999;18:595-604.
198. Nalivaiko E, Michaud JC, Soubrie P, et al. Electrophysiological evidence for putative subtypes of neurotensin receptors in guinea-pig mesencephalic dopaminergic neurons. *Neuroscience* 1998;86:799-811.

199. Navarro V, Martin S, Sarret P, et al. Pharmacological properties of the mouse neurotensin receptor 3. Maintenance of cell surface receptor during internalization of neurotensin. *FEBS Lett* 2001;495:100-5.
200. Nemeroff CB. Neurotensin: perchance an endogenous neuroleptic? *Biol Psychiatry* 1980;15:283-302.
201. Nemeroff CB, Bissette G, Widerlov E, et al. Neurotensin-like immunoreactivity in cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia, depression, anorexia nervosa-bulimia, and premenstrual syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1989;1:16-20.
202. Nemeroff CB, Youngblood WW, Manberg PJ, et al. Regional brain concentrations of neuropeptides in Huntington's chorea and schizophrenia. *Science* 1983;221:972-5.
203. Newman EA. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 2003;26:536-42.
204. Nguyen HM, Cahill CM, McPherson PS, et al. Receptor-mediated internalization of (3H)-neurotensin in synaptosomal preparations from rat neostriatum. *Neuropharmacology* 2002;42:1089-98.

205. Nicot A, Rostene W, Berod A. Neurotensin receptor expression in the rat forebrain and midbrain: a combined analysis by in situ hybridization and receptor autoradiography. *J Comp Neurol* 1994;341:407-19.
206. Nicot A, Rostene W, Berod A. Hypercorticism induces neurotensin mRNA in rat periventricular hypothalamus. *Neuroreport* 1995;6:2158-60.
207. Nicot A, Rowe WB, De Kloet ER, et al. Endogenous neurotensin regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and peptidergic neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 1997;9:263-9.
208. Nielsen MS, Jacobsen C, Olivecrona G, et al. Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 1999;274:8832-6.
209. Niimi M, Takahara J, Sato M, et al. Neurotensin and growth hormone-releasing factor-containing neurons projecting to the median eminence of the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 1991;133:183-6.
210. Nouel D, Faure MP, St Pierre JA, et al. Differential binding profile and internalization process of neurotensin via neuronal and glial receptors. *J Neurosci* 1997;17:1795-803.

211. Nouel D, Sarret P, Vincent JP, et al. Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors. *Neuroscience* 1999;94:1189-97.
212. O'Connor WT, Tanganelli S, Ungerstedt U, et al. The effects of neurotensin on GABA and acetylcholine release in the dorsal striatum of the rat: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 1992;573:209-16.
213. Okuma Y, Fukuda Y, Osumi Y. Neurotensin potentiates the potassium-induced release of endogenous dopamine from rat striatal slices. *Eur J Pharmacol* 1983;93:27-33.
214. Onuoha GN, Alpar EK, Chukwulobelu R, et al. Distributions of VIP, substance P, neurokinin A and neurotensin in rat heart: an immunocytochemical study. *Neuropeptides* 1999;33:19-25.
215. Orłowski M, Michaud C, Chu TG. A soluble metalloendopeptidase from rat brain. Purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. *Eur J Biochem* 1983;135:81-8.
216. Osbahr AJ 3rd, Nemeroff CB, Luttinger D, et al. Neurotensin-induced antinociception in mice: antagonism by thyrotropin-releasing hormone. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;217:645-51.
217. Palacios JM, Kuhar MJ. Neurotensin receptors are located on dopamine-containing neurones in rat midbrain. *Nature* 1981;294:587-9.

218. Panayi F, Colussi-Mas J, Lambas-Senas L, et al. Endogenous neurotensin in the ventral tegmental area contributes to amphetamine behavioral sensitization. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:871-9.
219. Panayi F, Dorso E, Lambas-Senas L, et al. Chronic blockade of neurotensin receptors strongly reduces sensitized, but not acute, behavioral response to D-amphetamine. *Neuropsychopharmacology* 2002;26:64-74.
220. Pazos A, Lopez M, Florez J. Different mechanisms are involved in the respiratory depression and analgesia induced by neurotensin in rats. *Eur J Pharmacol* 1984;98:119-23.
221. Petersen CM, Nielsen MS, Nykjaer A, et al. Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem* 1997;272:3599-605.
222. Petrie KA, Bubser M, Casey CD, et al. The neurotensin agonist PD149163 increases Fos expression in the prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:1878-88.
223. Petrie KA, Schmidt D, Bubser M, et al. Neurotensin activates GABAergic interneurons in the prefrontal cortex. *J Neurosci* 2005;25:1629-36.

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

231. Remaury A, Vita N, Gendreau S, et al. Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Res* 2002;953:63-72.
232. Reubi JC, Waser B, Friess H, et al. Neurotensin receptors: a new marker for human ductal pancreatic adenocarcinoma. *Gut* 1998;42:546-50.
233. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, et al. Neurotensin receptors in human neoplasms: high incidence in Ewing's sarcomas. *Int J Cancer* 1999;82:213-8.
234. Richard F, Barroso S, Martinez J, et al. Agonism, inverse agonism, and neutral antagonism at the constitutively active human neurotensin receptor 2. *Mol Pharmacol* 2001;60:1392-8.
235. Richelson E, Boules M, Fredrickson P. Neurotensin agonists: possible drugs for treatment of psychostimulant abuse. *Life Sci* 2003;73:679-90.
236. Richey S, Burette A, Max J, et al. Effect of chronic intraperitoneal injections of leptin on hypothalamic neurotensin content and food intake. *Brain Res* 2000;862:276-9.
237. Rioux F, Quirion R, St-Pierre S, et al. The hypotensive effect of centrally administered neurotensin in rats. *Eur J Pharmacol* 1981;69:241-7.

238. Rivest R, St-Pierre S, Jolicoeur FB. Structure-activity studies of neurotensin on muscular rigidity and tremors induced by 6-hydroxydopamine lesions in the posterolateral hypothalamus of the rat. *Neuropharmacology* 1991;30:47-52.
239. Roberts GW, Crow TJ, Polak JM. Neurotensin: first report of a cortical pathway. *Peptides* 1981;2 Suppl 1:37-43.
240. Rompre P, Perron S. Evidence for a role of endogenous neurotensin in the initiation of amphetamine sensitization. *Neuropharmacology* 2000;39:1880-92.
241. Rompre PP. Psychostimulant-like effect of central microinjection of neurotensin on brain stimulation reward. *Peptides* 1995;16:1417-20.
242. Rompre PP. Repeated activation of neurotensin receptors sensitizes to the stimulant effect of amphetamine. *Eur J Pharmacol* 1997;328:131-4.
243. Rompre PP, Bauco P, Gratton A. Facilitation of brain stimulation reward by mesencephalic injections of neurotensin-(1-13). *Eur J Pharmacol* 1992;211:295-303.
244. Rompre PP, Boye SM. Opposite effects of mesencephalic microinjections of cholecystokinin octapeptide and neurotensin-(1-13) on brain stimulation reward. *Eur J Pharmacol* 1993;232:299-303.

245. Rompre PP, Gratton A. Mesencephalic microinjections of neurotensin-(1-13) and its C-terminal fragment, neurotensin-(8-13), potentiate brain stimulation reward. *Brain Res* 1993;616:154-62.
246. Rostene WH, Alexander MJ. Neurotensin and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 1997;18:115-73.
247. Rovere C, Barbero P, Kitabgi P. Evidence that PC2 is the endogenous pro-neurotensin convertase in rMTC 6-23 cells and that PC1- and PC2-transfected PC12 cells differentially process pro-neurotensin. *J Biol Chem* 1996;271:11368-75.
248. Rowe W, Viau V, Meaney MJ, et al. Stimulation of CRH-mediated ACTH secretion by central administration of neurotensin: evidence for the participation of the paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 1995;7:109-17.
249. Rowe WB, Nicot A, Sharma S, et al. Central administration of the neurotensin receptor antagonist, SR48692, modulates diurnal and stress-related hypothalamic-pituitary-adrenal activity. *Neuroendocrinology* 1997;66:75-85.
250. Sadoul JL, Checler F, Kitabgi P, et al. Loss of high affinity neurotensin receptors in substantia nigra from parkinsonian subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;125:395-404.

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

258. Sarret P, Krzywkowski P, Segal L, et al. Distribution of NTS3 receptor/sortilin mRNA and protein in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 2003;461:483-505.
259. Sarret P, Perron A, Stroh T, et al. Immunohistochemical distribution of NTS2 neurotensin receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 2003;461:520-38.
260. Schaeffer P, Laplace MC, Bernat A, et al. SR142948A is a potent antagonist of the cardiovascular effects of neurotensin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:545-50.
261. Schimpff RM, Avard C, Fenelon G, et al. Increased plasma neurotensin concentrations in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;70:784-6.
262. Schimpff RM, Gourmelen M, Scarceriaux V, et al. Plasma neurotensin levels in humans: relation to hormone levels in diseases involving the hypothalamo-pituitary-thyroid axis. *Eur J Endocrinol* 1995;133:534-8.
263. Schotte A, Leysen JE, Laduron PM. Evidence for a displaceable non-specific. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986;333:400-5.
264. Seroogy KB, Mehta A, Fallon JH. Neurotensin and cholecystokinin coexistence within neurons of the ventral mesencephalon: projections to forebrain. *Exp Brain Res* 1987;68:277-89.

265. Sharma RP, Janicak PG, Bissette G, et al. CSF neurotensin concentrations and antipsychotic treatment in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 1997;154:1019-21.
266. Shi WX, Bunney BS. Actions of neurotensin: a review of the electrophysiological studies. *Ann N Y Acad Sci* 1992;668:129-45.
267. Shido O, Nagasaka T. Effects of intraventricular neurotensin on blood pressure and heat balance in rats. *Jpn J Physiol* 1985;35:311-20.
268. Shilling PD, Richelson E, Feifel D. The effects of systemic NT69L, a neurotensin agonist, on baseline and drug-disrupted prepulse inhibition. *Behav Brain Res* 2003;143:7-14.
269. Shulkes A, Lewis SJ, Jarrott B. Strain differences in central nervous system neurotensin content between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1987;415:404-8.
270. Shute CC, Lewis PR. The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain* 1967;90:497-520.
271. Skidgel RA, Engelbrecht S, Johnson AR, et al. Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides* 1984;5:769-76.

272. Smith DJ, Hawranko AA, Monroe PJ, et al. Dose-dependent pain-facilitatory and -inhibitory actions of neurotensin are revealed by SR 48692, a nonpeptide neurotensin antagonist: influence on the antinociceptive effect of morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:899-908.
273. Sotty F, Brun P, Leonetti M, et al. Comparative effects of neurotensin, neurotensin(8-13) and. *Neuroscience* 2000;98:485-92.
274. Souaze F, Viardot-Foucault V, Rouillet N, et al. Neurotensin receptor 1 gene activation by the Tcf/ β -catenin pathway is an early event in human colonic adenomas. *Carcinogenesis* 2005;
275. St-Gelais F, Legault M, Bourque MJ, et al. Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* 2004;24:2566-74.
276. Steinberg R, Brun P, Souilhac J, et al. Neurochemical and behavioural effects of neurotensin vs. *Neuropeptides* 1995;28:43-50.
277. Steiner DF, Smeekens SP, Ohagi S, et al. The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J Biol Chem* 1992;267:23435-8.
278. Stopa EG, Volicer L, Kuo-Leblanc V, et al. Pathologic evaluation of the human suprachiasmatic nucleus in severe dementia. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:29-39.

279. Sumners C, Phillips MI, Richards EM. Central pressor action of neurotensin in conscious rats. *Hypertension* 1982;4:888-93.
280. Szigethy E, Beaudet A. Correspondence between high affinity ¹²⁵I-neurotensin binding sites and dopaminergic neurons in the rat substantia nigra and ventral tegmental area: a combined radioautographic and immunohistochemical light microscopic study. *J Comp Neurol* 1989;279:128-37.
281. Tanaka K, Masu M, Nakanishi S. Structure and functional expression of the cloned rat neurotensin receptor. *Neuron* 1990;4:847-54.
282. Tanganelli S, Li XM, Ferraro L, et al. Neurotensin and cholecystikinin octapeptide control synergistically dopamine release and dopamine D2 receptor affinity in rat neostriatum. *Eur J Pharmacol* 1993;230:159-66.
283. Tanganelli S, O'Connor WT, Ferraro L, et al. Facilitation of GABA release by neurotensin is associated with a reduction of dopamine release in rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 1994;60:649-57.
284. Tanji H, Araki T, Fujihara K, et al. Alteration of neurotensin receptors in MPTP-treated mice. *Peptides* 1999;20:803-7.
285. Tauris J, Ellgaard L, Jacobsen C, et al. The carboxy-terminal domain of the receptor-associated protein binds to the Vps10p domain of sortilin. *FEBS Lett* 1998;429:27-30.

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

292. Tyler-McMahon BM, Stewart JA, Farinas F, et al. Highly potent neurotensin analog that causes hypothermia and antinociception. *Eur J Pharmacol* 2000;390:107-11.
293. Uhl GR, Goodman RR, Snyder SH. Neurotensin-containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat: immunohistochemical mapping. *Brain Res* 1979;167:77-91.
294. Uhl GR, Kuhar MJ, Snyder SH. Neurotensin: immunohistochemical localization in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:4059-63.
295. Uhl GR, Snyder SH. Regional and subcellular distributions of brain neurotensin. *Life Sci* 1976;19:1827-32.
296. Uhl GR, Snyder SH. Neurotensin: a neuronal pathway projecting from amygdala through stria terminalis. *Brain Res* 1979;161:522-6.
297. Uhl GR, Whitehouse PJ, Price DL, et al. Parkinson's disease: depletion of substantia nigra neurotensin receptors. *Brain Res* 1984;308:186-90.
298. Urban MO, Coutinho SV, Gebhart GF. Biphasic modulation of visceral nociception by neurotensin in rat rostral ventromedial medulla. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290:207-13.

299. Urban MO, Gebhart GF. Characterization of biphasic modulation of spinal nociceptive transmission by neurotensin in the rat rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 1997;78:1550-62.
300. Urban MO, Smith DJ. Role of neurotensin in the nucleus raphe magnus in opioid-induced antinociception from the periaqueductal gray. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265:580-6.
301. Van Kemmel FM, Dubuc I, Bourdel E, et al. A C-terminal cyclic 8-13 neurotensin fragment analog appears less exposed to neprilysin when it crosses the blood-brain barrier than the cerebrospinal fluid-brain barrier in mice. *Neurosci Lett* 1996;217:58-60.
302. Vanakoski J, Mazzanti C, Naukkarinen H, et al. An abundant proneurotensin polymorphism, 479A>G, and a test of its association with alcohol dependence in a Finnish population. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:762-5.
303. Vandebulcke F, Nouel D, Vincent JP, et al. Ligand-induced internalization of neurotensin in transfected COS-7 cells: differential intracellular trafficking of ligand and receptor. *J Cell Sci* 2000;113 (Pt 17):2963-75.
304. Vanegas H. To the descending pain-control system in rats, inflammation-induced primary and secondary hyperalgesia are two different things. *Neurosci Lett* 2004;361:225-8.

305. Vankova M, Arluison M, Leviel V, et al. Afferent connections of the rat substantia nigra pars lateralis with special reference to peptide-containing neurons of the amygdalo-nigral pathway. *J Chem Neuroanat* 1992;5:39-50.
306. Villeneuve P, Feliciangeli S, Croissandeau G, et al. Altered processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in PC2 knock down mice: a biochemical and immunohistochemical study. *J Neurochem* 2002;82:783-93.
307. Villeneuve P, Lafortune L, Seidah NG, et al. Immunohistochemical evidence for the involvement of protein convertases 5A and 2 in the processing of pro-neurotensin in rat brain. *J Comp Neurol* 2000;424:461-75.
308. Villeneuve P, Seidah NG, Beaudet A. Immunohistochemical evidence for the implication of PC1 in the processing of proneurotensin in rat brain. *Neuroreport* 2000;11:3443-7.
309. Vincent B, Vincent JP, Checler F. Neurotensin and neuromedin N undergo distinct catabolic processes in murine astrocytes and primary cultured neurons. *Eur J Biochem* 1994;221:297-306.
310. Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P. Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:302-9.

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

317. Wagstaff JD, Bush LG, Gibb JW, et al. Endogenous neurotensin antagonizes methamphetamine-enhanced dopaminergic activity. *Brain Res* 1994;665:237-44.
318. Walker N, Lepee-Lorgeoux I, Fournier J, et al. Tissue distribution and cellular localization of the levocabastine-sensitive neurotensin receptor mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;57:193-200.
319. Wang L, Friess H, Zhu Z, et al. Neurotensin receptor-1 mRNA analysis in normal pancreas and pancreatic disease. *Clin Cancer Res* 2000;6:566-71.
320. Wang QP, Guan JL, Nakai Y. Synaptic relations of neurotensinergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Peptides* 1995;16:1421-7.
321. Wang XM, Evers BM. Characterization of early developmental pattern of expression of neurotensin/neuromedin N gene in foregut and midgut. *Dig Dis Sci* 1999;44:33-40.
322. Watanobe H, Takebe K. In vivo release of neurotensin from the median eminence of ovariectomized estrogen-primed rats as estimated by push-pull perfusion: correlation with luteinizing hormone and prolactin surges. *Neuroendocrinology* 1993;57:760-4.

323. Waters CM, Hunt SP, Jenner P, et al. Localization of neurotensin receptors in the forebrain of the common marmoset and the effects of treatment with the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Brain Res* 1987;412:244-53.
324. Watts AG, Sanchez-Watts G. Region-specific regulation of neuropeptide mRNAs in rat limbic forebrain neurones by aldosterone and corticosterone. *J Physiol* 1995;484 (Pt 3):721-36.
325. Wenk GL, Markowska AL, Olton DS. Basal forebrain lesions and memory: alterations in neurotensin, not acetylcholine, may cause amnesia. *Behav Neurosci* 1989;103:765-9.
326. Werkman TR, Kruse CG, Nievelstein H, et al. Neurotensin attenuates the quinpirole-induced inhibition of the firing rate of dopamine neurons in the rat substantia nigra pars compacta and the ventral tegmental area. *Neuroscience* 2000;95:417-23.
327. Widerlov E, Lindstrom LH, Besev G, et al. Subnormal CSF levels of neurotensin in a subgroup of schizophrenic patients: normalization after neuroleptic treatment. *Am J Psychiatry* 1982;139:1122-6.
328. Wilding JP, Gilbey SG, Bailey CJ, et al. Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology* 1993;132:1939-44.

329. Williams FG, Mullet MA, Beitz AJ. Basal release of Met-enkephalin and neurotensin in the ventrolateral periaqueductal gray matter of the rat: a microdialysis study of antinociceptive circuits. *Brain Res* 1995;690:207-16.
330. Williams FG, Murtaugh MP, Beitz AJ. The effect of acute haloperidol treatment on brain proneurotensin mRNA: in situ hybridization analyses using a novel fluorescence detection procedure. *Brain Res Mol Brain Res* 1990;7:347-58.
331. Yamada M, Yamada M, Lombet A, et al. Distinct functional characteristics of levocabastine sensitive rat neurotensin NT2 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *Life Sci* 1998;62:PL 375-80.
332. Yamada M, Yamada M, Richelson E. Heterogeneity of melanized neurons expressing neurotensin receptor messenger RNA in the substantia nigra and the nucleus paranigralis of control and Parkinson's disease brain. *Neuroscience* 1995;64:405-17.
333. Zahm DS, Grosu S, Williams EA, et al. Neurons of origin of the neurotensinergic plexus enmeshing the ventral tegmental area in rat: retrograde labeling and in situ hybridization combined. *Neuroscience* 2001;104:841-51.
334. Zahm DS, Gruber C, Veh RH, et al. Inputs to the central extended amygdala recipient region of the nigral complex in the rat. [Abstract] Abstract Viewer/Itinerary Planner, Society for Neuroscience, On-line 2005;301.11

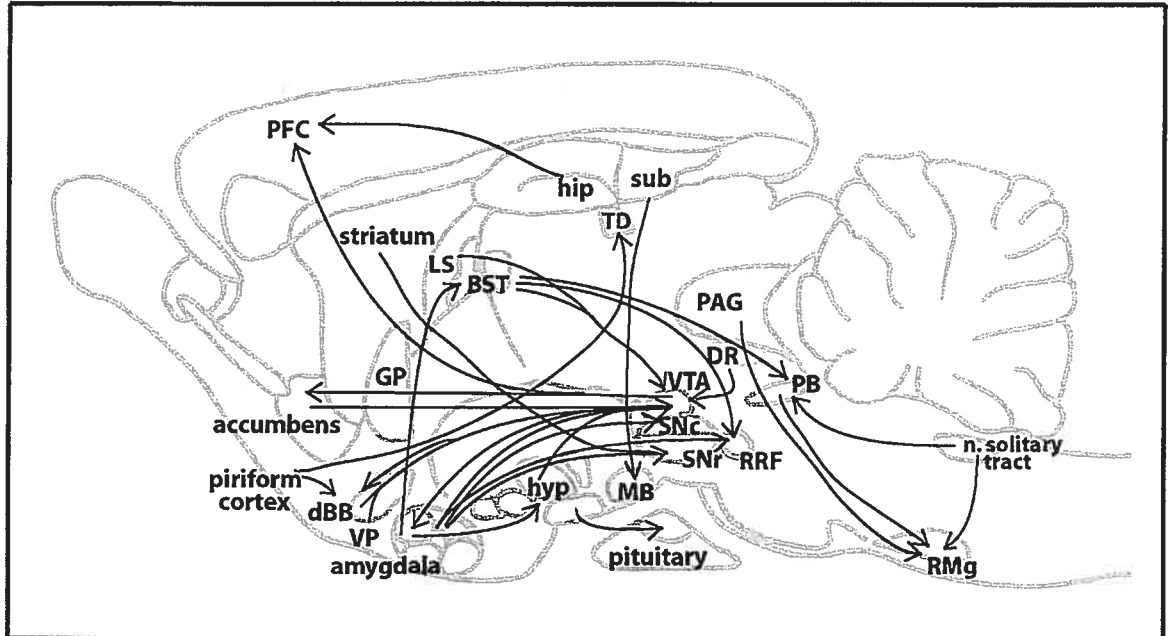
335. Zahm DS, Williams ES, Krause JE, et al. Distinct and interactive effects of d-amphetamine and haloperidol on levels of neurotensin and its mRNA in subterritories in the dorsal and ventral striatum of the rat. *J Comp Neurol* 1998;400:487-503.
336. Zhao D, Keates AC, Kuhnt-Moore S, et al. Signal transduction pathways mediating neurotensin-stimulated interleukin-8 expression in human colonocytes. *J Biol Chem* 2001;276:44464-71.
337. Zupanc GK. Peptidergic transmission: from morphological correlates to functional implications. *Micron* 1996;27:35-91.

Figure legend

Figure 1. Sagittal representation of neurotensinergic pathways in the rodent brain.

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

Figure 1



**ANNEXE 2 : Calcium-dependent, D2 receptor-independent
induction of c-fos by haloperidol in dopamine neurons.**

Problématique

Bien que le mécanisme d'action des antipsychotiques demeure encore relativement peu connu, ces agents agissent comme des antagonistes des récepteurs D2 et produisent une variété d'effets cellulaires dont l'induction de l'expression de *c-fos*. Les gènes d'expression précoce comme *c-fos* sont des indicateurs des changements de l'activité neuronale et peuvent produire des changements à long terme dans les neurones. Nous avons donc tenté de caractériser le mécanisme par lequel l'antipsychotique halopéridol induit l'expression de *c-fos* dans les neurones dopaminergiques. À l'aide d'un modèle des neurones de l'aire tegmentaire ventrale de rat en culture primaire, nous avons montré que de faibles concentrations d'halopéridol induit une expression de Fos dans les neurones dopaminergiques.

Étonnamment, le sulpiride, un antagoniste sélectif du récepteur D2, n'a pas mimé cet effet. Par ailleurs, un inhibiteur de la protéine kinase A (PKA) n'a pu prévenir l'induction de Fos. Ces résultats suggèrent que les récepteurs D2 et la cascade de l'AMPC ne sont pas impliqués. Par contre, l'induction de l'expression de *fos* a été bloquée par la tetrodotoxine, le BAPTA et le KN-93, ce qui démontre que cette induction dépendant de l'activité des neurones, requiert du calcium et exige l'activation d'une calmoduline kinase (CaMK). En résumé, ces résultats suggèrent que l'halopéridol induit l'expression de *fos* dans les neurones dopaminergiques par une action indépendante de l'activation du récepteur D2 mais qui requiert une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire, menant à l'activation d'une CaMKinase.

Contribution des co-auteurs

En tant que premier auteur, j'ai réalisé l'ensemble des expériences présentées dans cet article. En plus de l'acquisition des données, j'ai pris en charge l'analyse des résultats de même que la rédaction de l'article. Toutefois, le Dr Trudeau m'a aidé dans la conception du design expérimental en plus de participer activement à l'interprétation des résultats et à la rédaction de l'article.

Quant au Dr Lévesque, il m'a accueilli dans son laboratoire et m'a supervisé pour les expériences de RT-PCR et d'hybridation *in situ* (illustrées par la figure 2). Il a également participé à la rédaction et à la révision de l'article.

CALCIUM-DEPENDENT, D2 RECEPTOR-INDEPENDENT
INDUCTION OF C-FOS BY HALOPERIDOL IN DOPAMINE
NEURONS.

Jomphe C¹, Lévesque D² and Trudeau L-E¹

Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology. 2003 May;367(5):480-9.

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Groupe de Recherche sur le
Système Nerveux Central, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Unité de Recherche en Neurosciences, Centre de Recherche du Centre Hospitalier
Universitaire de Québec (CHUQ), Faculty of Medicine, Université Laval, Québec, Québec,
Canada

ABSTRACT

Antipsychotic drugs such as haloperidol act as dopamine D2 receptor antagonists to produce a number of cellular effects including the induction of immediate-early genes such as c-fos. It has been hypothesized that blockade of D2 receptors by antipsychotics is responsible for the induction of c-fos, but the mechanism has not been determined. Using cultured ventral tegmental area (VTA) dopaminergic neurons as a model, we report that nanomolar concentrations of haloperidol cause a time-dependent increase in Fos expression in dopaminergic neurons.

Surprisingly, this induction was not mimicked by sulpiride, a selective D2 receptor antagonist, and was not blocked by Rp-cAMPS, an antagonist of protein kinase A (PKA), thus suggesting that D2 receptors and the cAMP cascade are not required. The induction of Fos expression was blocked by tetrodotoxin, BAPTA and KN-93, thus showing that it is activity- and calcium-dependent and requires the activation of a calmodulin-dependent kinase (CaMK). Together, these results suggest that haloperidol induces Fos expression in dopaminergic neurons through a D2 receptor-independent increase in intracellular calcium, leading to CaMKinase activation.

KEYWORDS: Fos, calcium, culture, dopaminergic neurons, haloperidol, immunofluorescence.

1. INTRODUCTION

Although the mechanism of action of antipsychotics remains poorly understood, most have the ability to induce the expression of immediate early genes such as c-fos (Robertson and Fibiger, 1992; Robertson, Matsumura et al., 1994). C-fos encodes a nuclear phosphoprotein (Fos) that usually acts as a heterodimeric transcription factor. The transient expression of c-fos can be considered as a potential marker of neuronal activation (Dragunow and Robertson, 1987; Sagar, Sharp et al., 1988) and the induction of Fos may participate in the initiation of plastic changes in the nervous system associated with physiological events such as activity-dependent synaptic plasticity and with pathological conditions such as seizures (Dragunow and Robertson, 1987; Sagar, Sharp, and Curran, 1988). Acute administration of the classical antipsychotic haloperidol or the atypical antipsychotic clozapine has been reported to differentially increase the expression of c-fos in a number of nuclei including the nucleus accumbens, the amygdala and the dorsolateral striatum (Deutch, Lee et al., 1992; Robertson and Fibiger, 1992; Robertson, Matsumura, and Fibiger, 1994).

Although the different classes of classical and atypical antipsychotic drugs differ in their pharmacological properties, all have in common their ability to act as antagonists or inverse agonists on the dopamine D2 receptor (Hall and Strange, 1997; Vanhauwe, Ercken et al., 2000) (for review see (Strange, 2001)). Therefore, it has been suggested that the induction of Fos by these drugs occurs as a consequence of the activation of signaling pathways previously inhibited by ongoing D2 receptor activation (Dragunow, Robertson et

al., 1990;Robertson and Fibiger, 1992). D2 receptors are G protein-coupled receptors and have been demonstrated to couple to a number of signaling pathway including adenylyl cyclase (Onali, Olanas et al., 1985) and potassium channels (Greif, Lin et al., 1995;Kitai and Surmeier, 1993;Williams, MacVicar et al., 1989). Under conditions where a basal level of D2 receptor occupation occurs, blockade of D2 receptors with antipsychotics such as haloperidol is thus expected to relieve the inhibition of adenylyl cyclase, leading to activation of PKA and to phosphorylation of the cAMP response element binding protein (CREB). Phospho-CREB can then interact with the cAMP response element (CRE) site in the promoter region of a number of genes including the c-fos gene (Montminy and Bilezikjian, 1987;Sheng, McFadden et al., 1990). In support of this hypothesis, haloperidol-mediated induction of c-fos in the striatum has been shown to be prevented by intrastriatal injection of specific antisense oligonucleotides directed against CREB mRNA (Konradi and Heckers, 1995) and to be blocked in PKA knockout mice (Adams, Brandon et al., 1997).

Blockade of D2 receptors could also induce Fos expression through cAMP-independent mechanisms. In many preparations, it has been shown that D2 receptors increase outward potassium currents, leading to cell hyperpolarisation (reviewed in (Missale, Nash et al., 1998)). Blockade of dopamine action at D2 receptors by haloperidol is therefore expected to enhance the firing rate of dopaminergic neurons (Bunney, Walters et al., 1973), possibly leading to enhanced c-fos transcription. In fact, it has been previously demonstrated that membrane depolarization activates c-fos transcription in PC12 cells (Bartel, Sheng et al., 1989;Morgan and Curran, 1986). Transcriptional activation of c-fos by depolarization in these cells is Ca^{2+} -dependent and is blocked by Ca^{2+} chelation, by

specific inhibitors of L-type Ca^{2+} channels and by calmodulin antagonists (Morgan and Curran, 1986). This pathway also seems to converge on the CRE element in the c-fos gene promoter region as a result of CREB phosphorylation by CaMK (Sheng, McFadden, and Greenberg, 1990).

Considering the above stated hypotheses, the proposed role of the D2 receptor in haloperidol-induced c-fos expression, and the fact that dopaminergic neurons of the substantia nigra (SN) and ventral tegmental area express considerable levels of D2 receptors (Bouthenet, Souil et al., 1991; Meador-Woodruff, Mansour et al., 1989; Weiner, Levey et al., 1991), it may be considered somewhat surprising that the induction of Fos by antipsychotics in dopaminergic cell body regions has not yet been closely studied (but see (Wirtshafter and Asin, 1995) for Fos induction by haloperidol in non-identified cells in the VTA). To investigate the mechanism of c-fos induction by haloperidol in dopaminergic neurons, we have used a preparation of VTA neurons in primary culture. We find that haloperidol is indeed able to induce Fos expression in a subset of dopaminergic neurons, but that the D2 receptor and the cAMP cascade are not involved.

2. METHODS

2.1 Cell culture

Primary cultures of rat VTA neurons were prepared according to recently described protocols (Michel and Trudeau, 2000) (Bourque and Trudeau, 2000; Congar, Bergevin et al., 2002) derived from Cardozo (Cardozo, 1993) and Sulzer et al. (Sulzer, Joyce et al., 1998). Dissociated VTA neurons were plated on midbrain astrocytes grown in monolayers on pre-coated glass coverslips.

To prepare midbrain astrocytic cultures, Sprague Dawley rats (P0-P2) were cryoanesthetized. Cells from the mesencephalon were enzymatically dissociated using papain (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA) and were grown in culture flasks for 5 to 10 days in Basal Medium Eagle with Earl's Salts (Gibco, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with penicillin/streptomycin, GlutaMAX-1 (Gibco), Mito+ serum extender (VWR Canlab, Montreal, Canada) and 10% Fetal Calf serum (Gibco). After the first 48 hours, astrocyte cultures were vigorously washed with cold medium to remove most neurons, leaving only tightly adherent astrocytes. After reaching confluence, astrocytes were trypsinized, washed, collected and plated at 100 000 living cells per milliliter on collagen/poly-L-lysine-coated coverslips. Three to four days after plating, 5-Fluoro-2-Deoxyuridine (FUDR) was added to halt glial proliferation.

To prepare neurons, a 1 to 2 mm thick slice was cut at the level of the midbrain flexure. The VTA was isolated using a custom tissue micro-punch. As for preparation of astrocytes, the tissue was digested with papain, before being gently triturated. The

dissociated cells were then collected by centrifugation and diluted at a density to optimize neuronal viability (240 000 living cells per milliliter) and plated onto a pre-established midbrain astrocyte monolayer. Further astrocytic division was inhibited by a second addition of FUDR 24 hours after neurons were plated. Kynurenic acid (0.5 mM) (Sigma Chemicals Co., St-Louis, MO, USA) was added to the culture medium 7 days after neurons were plated in order to prevent excitotoxicity. Cultures were incubated at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere and maintained in Neurobasal-A/B27 medium (Gibco) supplemented with penicillin/streptomycin, GlutaMAX-1 (Gibco) and 5% Fetal Calf serum (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA). The cultures contained between 15 and 40% dopaminergic neurons and were used between 12 and 16 days after plating. All animal handling protocols were approved by the Université de Montréal animal ethics committee and complied to the European Community guidelines.

2.2 Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered solution (PBS) (pH 7.4) for 30 min. After permeabilization with 0.05 % Triton X-100 and blocking with bovine serum albumin and normal goat serum, cells were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against tyrosine hydroxylase (Sigma) and Fos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The rabbit polyclonal Fos antibody that was used is known not to be cross-reactive with Fos B, Fra-1 or Fra-2. The cells were then rinsed several times and incubated at room temperature for 60 min with Alexa-488 and Alexa-546 conjugated secondary antibodies (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA). Coverslips

were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and observed by epifluorescence microscopy on a Nikon Eclipse TE-200 inverted microscope. Images of immunofluorescent labeling were acquired using a Hamamatsu Orca-II digital cooled CCD camera and an Inovision workstation using Isee software (Inovision Corporation, Raleigh, NC, USA.).

In order to evaluate the relative proportion of dopaminergic cells expressing Fos, cells which were doubly labeled for tyrosine hydroxylase and Fos were observed by epifluorescence microscopy and counted. The number of doubly positive cells, that is dopaminergic cells expressing Fos, was evaluated for every coverslip and expressed as a percentage of the total number of dopaminergic cells on the coverslip. In each experiment, the proportion of dopaminergic cells expressing Fos was expressed as a percentage of the value measured in the control condition, performed in parallel. Such a normalization was required to control for the variability in the proportion of dopaminergic neurons expressing Fos under control conditions in different cultures (range: 1.8 to 21.5%; mean: $8.6 \pm 6.1\%$, $n=40$). In each experiment, coverslips from the same culture were used for each different treatment. All experiments include results from at least two different cultures.

2.3 In situ hybridization

Cultured neurons were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min. Immunolabeling of dopaminergic neurons was performed prior to hybridization, using a primary antibody against tyrosine hydroxylase (Sigma) followed by a biotin-SP-conjugated anti-mouse

CIX
antibody and horseradish peroxidase conjugated-streptavidin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). The labeling was revealed with a 0.05% solution of 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) containing 0.02% H₂O₂. Then, a specific ³⁵S-UTP radiolabeled cRNA probe was used. The rat D₂ receptor probe consisted of a fragment of 1032 bp (1311-2343) as previously described (Dearry, Gingrich et al., 1990). The probe recognized both the short and the long isoforms of the receptor. The fragment was subcloned into a pBluscript SK+ vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and linearized with *EcoRI*. Single-stranded complementary RNA (cRNA) probes were synthesized and labeled using a Riboprobe system (Promega, Madison, WI, USA) with [³⁵S]UTP (Dupont NEN, Boston, MA, USA) using the T₃ RNA polymerase. Cells were permeabilized in 2 X SSC containing 0.1% Triton-X-100 for 10 min at room temperature. *In situ* hybridization was performed overnight at 55°C in a standard hybridization buffer containing 50% formamide as previously described (Beaudry, Langlois et al., 2000). The slides were then washed, dehydrated, air-dried and dipped in LM-1 photographic emulsion (Amersham/Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Quebec, Canada) melted at 43°C, air-dried for 3 hours and stored in the dark for 6 weeks at 4°C. The emulsion was developed in D-19 developer (Kodak) for 5 min, rinse in deionized water and fixed for 10 min in rapid fixer solution (Kodak). Slides were rinsed under tap water for 30 min, dehydrated and mounted using Permount media (Fisher). Positive cells were identified under bright field illumination. Images were captured with a Nikon Coolpix 990 digital camera.

2.4 RT-PCR

To identify the subtype of dopamine D2 family class of receptors present in our VTA primary culture model, we performed a RT-PCR analysis. Total RNAs were extracted from VTA primary cultured cells and total rat brain (used as positive control for the PCR amplification) according to the Chomczynsky & Sacchi method (Chomczynski and Sacchi, 1987). One microgram of total RNAs was used for reverse transcription (RT) using 50 U of Expand reverse transcriptase (Roche, Laval, Québec, Canada) following the conditions suggested by the manufacturer for 1h30 at 42°C with a poly (dT)15 primer. Two microlitres of the RT reaction was used for the amplification of both D2 and D3 receptors and five microlitres was used for the amplification of the D4 receptor. PCR conditions included a 5 min at 94°C incubation step to active the Taq platinum (1U, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) followed by 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 60°C, 1 min at 72°C with a final elongation period of 7 min at 72°C. The PCR mixture obtained from VTA primary cultures was re-amplified under the same conditions to avoid false negative results. The following set of primers were used for the PCR reactions: for the D2 receptor : sense: 5'-gcagtcgagctttcagagcc-3'; antisense: 5'-tctgctggctcatcgtcttagg-3', which generate two fragments of 316 bp and 403 bp corresponding to the short (D2S) and the long (D2L) isoforms of the D2 receptor, respectively , for the D3 receptor : sense: 5'-agcatctgctccatctccaacc-3'; antisense: 5'-aggagttccgagtcctttccacg-3' for a fragment of 459 bp and for the D4 receptor : sense: 5'-ctcatcggcacatggtgttgca-3'; antisense: 5'-atcagcgtggacaggtttgtg-3' for a fragment of 256 bp.

2.5 Drugs

All chemicals were obtained from Sigma Chemicals Co. (St-Louis, MO, USA) except for forskolin (Calbiochem, San Diego, CA, USA), TTX (Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel), BAPTA-AM (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) and LR-172 (ethyl]-N-methyl-2-(1-pyrrolidinyl)ethylamine) (Tocris Cookson, Ballwin, MO, USA). Haloperidol, Forskolin, BAPTA-AM and KN-93 were dissolved as stock solutions in dimethyl sulfoxide (DMSO). The final concentration of DMSO was equal to or lower than 0.001%. Stock solutions of TTX, dibutyryl-cAMP, Rp-cAMPS and LR172 were prepared in water. Sulpiride was prepared in ethanol. All drugs were diluted directly in the culture medium to their final concentration except for BAPTA-AM which was loaded into cells after dilution in physiological saline.

2.6 Statistics

Statistical analysis were performed on raw data. For simple two group comparisons, the data were analyzed using the Student t-test. Multi-group data were otherwise compared using either a one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), as appropriate, followed by the Fisher LSD post-hoc test, when required.

3. RESULTS

3.1 Haloperidol induces Fos expression in VTA dopaminergic neurons.

Experiments were performed on rat VTA neurons in culture. Fos expression was detected by immunocytochemistry. In order to confirm the dopaminergic phenotype of neurons, double-labeling was performed using an antibody directed against tyrosine hydroxylase (TH). The cultures contained between 15 and 40% dopaminergic neurons. Treatment of VTA cells for 60 min with the classical antipsychotic haloperidol produced an increase in the proportion of dopaminergic neurons displaying nuclear Fos immunoreactivity (Fig. 1A). The effect of acute haloperidol on Fos expression by dopaminergic neurons was characterized by pharmacological studies. A dose-response relationship was established (Fig. 1B) using concentrations of haloperidol ranging from 0.1 nM to 1 μ M. The quantification of neurons doubly positive for TH and Fos was performed by epifluorescence microscopy (see Materials and Methods for details). In untreated, control cells, $8.6 \pm 6.1\%$ of dopaminergic neurons expressed Fos. Haloperidol caused a significant increase in Fos expression (one-way ANOVA, $F(5) = 2.58$, $P = 0.047$). The dose-response relationship displayed an inverted U shape (Fig. 1B). The maximal response was elicited by 1 nM haloperidol which caused more than a 3-fold increase in the proportion of doubly positive neurons ($340 \pm 32\%$, $n=6$, Fisher LSD $P = 0.008$). Although all subsequent experiments were performed on dopaminergic neurons, we found that at 1 nM, haloperidol also caused a 3-fold increase in the proportion of non-dopaminergic

neurons immunoreactive for Fos ($389 \pm 67\%$, $n=6$ coverslips, Student t-test $P < 0.001$, data not shown). In these cultures a majority of the non-dopaminergic neurons are GABAergic (not shown). Astrocytes, also present in the cultures were unaffected (not shown).

A kinetic study of the effect of haloperidol on Fos expression by dopaminergic neurons was performed. Cultured VTA neurons were incubated with 1 nM haloperidol for 15 to 90 min (Fig. 1C). Fos expression was evaluated as described previously. A 60 min long treatment was necessary to stimulate maximally Fos expression ($342 \pm 18\%$, $n = 4$, one-way ANOVA $F(3) = 19,422$, Fisher LSD $P < 0.01$). On the basis of these results, all subsequent experiments were conducted using an incubation time of 60 min with 1 nM haloperidol.

3.2 Lack of involvement of D2 receptors.

Cultured dopaminergic neurons in our model demonstrate presynaptic inhibition in response to D2 receptor agonists (Congar, Bergevin, and Trudeau, 2002; Sulzer, Joyce, Lin, Geldwert, Haber, Hattori, and Rayport, 1998) and express abundant levels of D2 receptor mRNA, as confirmed by *in situ* hybridization (Fig. 2A) and by RT-PCR analysis (Fig. 2B). In contrast, D3 and D4 mRNA could not be detected (Fig. 2B). To assess whether the induction of Fos expression by haloperidol in dopaminergic neurons was dependent on D2 receptor binding, we evaluated whether its effect could be mimicked by (+/-)-sulpiride, another D2 receptor antagonist. We treated VTA neurons with sulpiride at a concentration which should saturate D2-type receptors (1 μM). Sulpiride produced no significant change

in the percentage of dopaminergic neurons expressing Fos (SULP = $90 \pm 12\%$ of control, $n = 6$, Two-Factor ANOVA, main effect, $F(1) = 0.616$, $P = 0.442$) (Fig. 2C). As an additional test of the implication of D2 receptors in the effect of haloperidol, we applied haloperidol (1 nM) in the presence of sulpiride (1 μ M). This manipulation, which should prevent haloperidol from binding to D2 receptors, did not prevent induction of Fos expression by haloperidol (HAL = $243 \pm 42\%$, HAL+SULP = $275 \pm 23\%$ Two-Factor ANOVA, interaction, $F(1) = 0.727$, $P = 0.404$). These results suggest that binding of haloperidol to the dopamine D2 receptor is not necessary and sufficient to stimulate c-fos transcription in dopaminergic neurons.

3.3 Lack of involvement of sigma receptors.

Besides its high affinity to D2 receptors, haloperidol is also recognized as a high affinity ligand of sigma receptors (Seth, Fei et al., 1998), a family of receptors whose endogenous ligand and physiological role is unclear but that are located in areas rich in dopaminergic innervation (Ceci, Smith et al., 1988; Graybiel, Besson et al., 1989). Using LR172, a selective sigma receptor ligand (de Costa, Dominguez et al., 1992), we assessed the implication of sigma receptors in the induction of c-fos caused by haloperidol in dopaminergic neurons. LR172 is usually considered an agonist at sigma receptors (Vilner and Bowen, 2000; Vilner, de Costa et al., 1995), although it has been suggested that it can also act as an antagonist on some responses (McCracken, Bowen et al., 1999). Cells were exposed for 60 min to a concentration of LR172 high enough to saturate most sigma receptors (100 nM). By itself LR172 produced no significant change in the proportion of

dopaminergic neurons expressing Fos (LR172 = $263 \pm 70\%$ of control, $n = 6$, Two-Factor ANOVA, main effect, $F(1) = 1.414$, $P = 0.250$) (not shown). Furthermore, co-application of LR172 with haloperidol (1 nM) did not prevent the effect of haloperidol on Fos expression (HAL = $467 \pm 80\%$, HAL+LR172 = $489 \pm 111\%$, Two-Factor ANOVA, interaction, $F(1) = 2.032$, $P = 0.171$). These results suggest that the binding of haloperidol to sigma receptors is not required to stimulate c-fos transcription in dopaminergic neurons.

3.4 Implication of a PKA independent mechanism.

Several second-messenger pathways have been implicated in c-fos transcriptional activation. One of the better characterized is the PKA pathway, which can activate c-fos transcription through phosphorylation of CREB and the activation of a calcium/cyclic-adenosine monophosphate response element (CaRE/CRE) in the c-fos promoter region (Konradi, Cole et al., 1994; Montminy and Bilezikjian, 1987). We found that activation of the PKA signaling pathway with the adenylyl cyclase activator Forskolin mimicked the effect of haloperidol on Fos expression (Fig. 3A). Forskolin (10 μM) produced a fourfold increase in the percentage of dopaminergic neurons showing Fos labeling (Forsk = $422 \pm 51\%$, One-way ANOVA, $P < 0,001$). Direct activation of PKA with the cAMP analog $\text{Bt}_2\text{-cAMP}$ (100 μM) produced a similar effect ($\text{Bt}_2\text{-cAMP} = 248 \pm 25\%$, t-test, $P < 0,01$) (not shown). To determine whether the activation of PKA was necessary for haloperidol to induce c-fos transcription in cultured dopaminergic neurons, cells were exposed to the PKA inhibitor Rp-cAMPS (RP). Rp-cAMPS was applied in the culture medium at a final concentration of 100 μM for 120 min, alone or in the presence of haloperidol for the last 60

min. In the presence of Rp-cAMPS, haloperidol was still able to stimulate Fos expression in dopaminergic neurons (Fig. 3B). This effect was not significantly different from that produced by haloperidol alone (HAL + RP = $217 \pm 25\%$, HAL = $244 \pm 23\%$, Two-Factor ANOVA, interaction, $F(1) = 1.266$, $P = 0.274$). However, incubation of cells with Rp-cAMPS was effective in preventing Forskolin-induced Fos expression (RP+ FORSK = $78 \pm 27\%$, FORSK = $422 \pm 51\%$, One-way ANOVA, $P < 0.001$) (Fig. 3A), these results show that activation of PKA is not necessary for the effect of haloperidol on Fos expression.

3.5 Haloperidol induces Fos expression by an activity-dependent mechanism.

To determine whether Fos induction by haloperidol was activity-dependent, we exposed cultured dopaminergic neurons to the sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX). Cells were treated with haloperidol alone for 60 min or with $0.5 \mu\text{M}$ TTX for 70 min in the absence or in the presence of haloperidol for the last 60 min. TTX treatment completely prevented the induction of Fos expression caused by haloperidol (HAL = $221 \pm 13\%$, HAL+ TTX = $80 \pm 5\%$, $n = 5$, Two-Factor ANOVA, interaction, $F(1) = 37.380$, $P \leq 0.001$) (Fig. 3C). The effect of haloperidol on Fos expression by dopaminergic neurons is thus dependent on cell firing.

3.6 Fos induction by haloperidol requires calcium.

Studies performed on PC12 cells have suggested that Ca^{2+} is a major second messenger regulating immediate early gene expression in excitable cells (Inagaki et al., 1983b). We used the membrane-permeable Ca^{2+} chelator BAPTA-AM to determine whether a rise in intracellular Ca^{2+} is required for haloperidol to enhance Fos expression in dopaminergic neurons. Cultured neurons were exposed to BAPTA-AM (10 μM) for 90 min alone or in the presence of haloperidol (1nM) for the last 60 min. Changes in the percentage of double-labeled neurons were evaluated as described previously. Incubation of cells with BAPTA-AM alone caused a small but significant reduction in the percentage of double-labeled neurons in comparison to the untreated condition (BAPTA = $80 \pm 33\%$, $n = 6$, Two-Factor ANOVA, $F(1) = 17.189$, $P = 0.001$) (Fig. 4A). Furthermore, chelation of intracellular Ca^{2+} by BAPTA-AM prevented Fos induction by haloperidol in dopaminergic neurons (HAL = $206 \pm 84\%$, HAL+BAPTA = $104 \pm 42\%$, $n = 6$, Two-Factor ANOVA, interaction, $F(1) = 5.565$, $P = 0.029$). These results suggest that an increase in intracellular Ca^{2+} is necessary for haloperidol to enhance Fos expression in cultured dopaminergic neurons.

3.7 KN-93 blocks the induction of c-fos caused by haloperidol in dopaminergic neurons.

Two major pathways have been identified as regulating immediate early gene expression through CREB phosphorylation: PKA and Ca^{2+} /CaMK signaling pathways. Considering the block of c-fos induction by BAPTA, a reasonable hypothesis was that the

induction of c-fos expression by dopaminergic neurons requires Ca^{2+} and CaMK activation. Therefore, using KN-93, a CaMK-II and IV inhibitor, we assessed the role of the CaMK signaling pathway in the induction of c-fos by haloperidol in dopaminergic neurons. Cultured cells were exposed to 10 μM KN-93 alone or in the presence of haloperidol. By itself, KN-93 significantly reduced the percentage of dopaminergic neurons expressing Fos (KN-93 = $32 \pm 10\%$ Two-Factor ANOVA $F(1) = 26.713$, $P < 0.001$) (Fig. 4B). Moreover, KN-93 treatment prior to haloperidol application completely prevented the induction of Fos expression caused by haloperidol (HAL = $266 \pm 30\%$, HAL+ KN-93 = $44 \pm 13\%$, $n = 6$, Two-Factor ANOVA, interaction, $F(1) = 13.097$, $P = 0.002$). These results suggest that the Ca^{2+} /CaMK signaling pathway is involved in the activating effect of haloperidol on c-fos expression in cultured dopaminergic neurons.

4. DISCUSSION

Several studies have demonstrated that the antipsychotic agent haloperidol causes an increase in the expression of the transcription factor Fos in the central nervous system (Dragunow et al., 1990;Robertson and Fibiger, 1992). However, the mechanism by which haloperidol induces Fos expression remains to be clearly elucidated. The present work provides novel information on the mechanism of c-fos induction by haloperidol in neurons. We have made two major observations. First, we have shown for the first time that at least in culture, haloperidol can induce Fos expression in dopaminergic neurons through a D2-independent mechanism. Second, we have shown that haloperidol induces Fos expression in neurons through an activity-dependent, Ca^{2+} - and CaMK-dependent mechanism.

4.1 Expression of Fos in dopaminergic neurons.

Our finding that haloperidol can induce Fos expression in dopaminergic neurons is a novel finding that extends previous work showing abundant Fos expression in response to haloperidol in the dorsal striatum, the nucleus accumbens and the amygdala (Dragunow et al., 1990;Robertson and Fibiger, 1992;Robertson, Matsumura, and Fibiger, 1994). The reason why previous studies have not focused much attention or reported a response in the VTA is unclear. However, it is likely that modest changes in the proportion of Fos-positive dopaminergic neurons may have escaped detection *in vivo*, especially considering the heterogeneity of the cell population in the VTA and the fact that previous studies have not performed systematic double-labeling for tyrosine hydroxylase, as was done in the current

study. Alternately, the receptor(s) involved in initiating the signaling cascade leading to Fos expression in response to haloperidol may be expressed at higher levels in culture than *in vivo*.

4.2 Identity of the receptor mediating the c-fos response in dopaminergic neurons.

Antipsychotic drugs share the ability to bind with high affinity to the dopamine D2 receptor and to induce c-fos expression. Considering these facts, the simplest hypothesis is that in all brain areas, c-fos induction in response to haloperidol results directly from the blockade of D2 receptors. In support of this possibility, it has been shown that in the striatum the induction of c-fos by haloperidol is reduced by selective D2 receptor agonists (Miller, 1990) and mimicked by the selective D2 receptor antagonists raclopride and sulpiride (Ozaki, Katsumoto et al., 1997; Robertson and Fibiger, 1992).

In the present report, blockade of the D2 receptor by haloperidol cannot explain the induction of Fos expression in rat VTA dopaminergic neurons in culture. Indeed, the selective D2 receptor antagonist sulpiride did not mimic the effect of haloperidol. In addition, exposure of neurons to haloperidol in the presence of a concentration of sulpiride which should saturate D2 receptors, failed to block the induction of Fos. These results cannot be explained by the lack of D2 receptors expression in our model. Indeed, our *in situ* hybridization results confirmed that much like *in vivo* (Bouthenet et al., 1991), cultured VTA dopaminergic neurons under our experimental conditions express D2 receptor mRNA (Fig. 2A). Our recent demonstration that D2 receptor agonists produce presynaptic

inhibition in cultured dopaminergic neurons provides additional evidence for the expression of functional D2 receptors in our model (Congar, Bergevin, and Trudeau, 2002). It should be noted that in our RT-PCR experiments, the long isoform of the D2 receptor was the most abundant. Although in one RT-PCR experiment low levels of the short isoform could also be detected (results not shown), only the long isoform was detected in another (Fig. 2B).

Although haloperidol can bind to D3 and D4 dopamine receptors with relatively high affinity, our finding that the mRNA for these receptors cannot be detected by RT-PCR in our cultures strongly argues against their implication. In addition, even though haloperidol displays some significant affinity for D1 dopamine receptors, it is unlikely that these receptors participate in the effect of haloperidol on dopaminergic neurons since there are no D1-like binding sites on VTA dopaminergic neurons (Boyson, McGonigle et al., 1986) and no significant levels of D1 mRNA can be detected in this structure (Mengod, Vilaro et al., 1991). Thus, dopaminergic neurons in our model of cultured VTA neurons probably do not express dopamine D1 receptors. It is thus reasonable to hypothesize that another class of receptor must be involved. The finding of a D2-independent induction of c-fos by haloperidol has been reported previously in PC-12 cells. Although haloperidol potently induces c-fos expression in these neuron-like cells, this effect is not mimicked by the selective D2 receptor antagonist sulpiride (Esteve, Haby et al., 1995).

In the present report, we found that haloperidol maximally induced Fos expression at 1 nM. Increasing the concentration of haloperidol did not further increase the response. In fact the proportion of dopaminergic neurons expressing Fos was even lower at higher

concentrations. As haloperidol can bind to a number of receptors with affinity in the high nanomolar range (Hartman and Civelli, 1996), a possible explanation is that at higher concentrations the effect on dopaminergic neurons is heterogenous as a consequence of the blockade of different receptors. Nonetheless, our observation of robust effects of haloperidol at low nanomolar concentrations is compatible with the involvement of a receptor to which haloperidol binds with high affinity. We have not performed a broad screening of all receptors possibly involved. However, considering the high affinity of haloperidol for sigma receptors (K_D of 3 nM at σ -1 receptor (Seth et al., 1998), and the observation that selective sigma receptors ligands induce Fos expression in rat brain (Dahmen, Fischer et al., 1996; Sharp, 1997), we investigated the possible implication of this class of receptors. Our finding that the selective sigma receptor ligand LR-172 failed to enhance Fos expression and to block the effect of haloperidol argues against the involvement of sigma receptors.

In addition to binding to the D2 family receptors and sigma receptors, haloperidol has the ability to bind to 5-HT_{2A} (Egan, Herrick-Davis et al., 1998; Leveque, Macias et al., 2000) and α 1-adrenergic receptors (Hartman and Civelli, 1996; Rosen, Ginty et al., 1995) with an affinity in the nanomolar range. These receptors may be possible targets and may explain the induction of c-fos by haloperidol in our model. However, in the dorsolateral striatum and the nucleus accumbens, ritanserin and prazosin, selective antagonists of these receptors, do not prevent the induction of Fos immunoreactive nuclei by haloperidol (Fink-Jensen, Ludvigsen et al., 1995). Further experiments will be required to test this possibility in VTA neurons and to identify more precisely the receptor(s) specifically involved.

4.3 Lack of implication of the PKA pathway.

The signaling cascade mediating the induction of c-fos by haloperidol *in vivo* is not completely characterized. Several signaling pathways could mediate c-fos transcriptional activation (Bartel et al., 1989; Sheng, McFadden, and Greenberg, 1990). The most completely described pathway involves PKA-mediated phosphorylation of CREB (Gonzalez and Montminy, 1989), followed by binding of phospho-CREB to the CRE element in the c-fos gene promoter region (Montminy and Bilezikjian, 1987; Sheng, McFadden, and Greenberg, 1990). Compatible with the involvement of this pathway, haloperidol-induced Fos expression *in vivo* has been shown to be absent in PKA knockout mice (Adams, Brandon, Chartoff, Idzerda, Dorsa, and McKnight, 1997). However, in a recent report, Adams and Keefe (2001) (Adams and Keefe, 2001) have cast some doubt on this hypothesis by showing that c-fos activation by the D2 receptor antagonist eticlopride in the striatum is not blocked by a PKA antagonist. In the present report, our results also argue against a critical role of PKA. Although we were able to confirm that under our experimental conditions activation of the PKA pathway was effective at producing c-fos transcriptional activation, we found that the PKA inhibitor Rp-cAMPS was unable to block c-fos activation by haloperidol.

4.4 Implication of an activity- and calcium-dependent mechanism.

We found that preventing action potential generation using the sodium channel blocker TTX completely blocked the induction of c-fos caused by haloperidol. Based on these

results, we can conclude that haloperidol acts through an activity-dependent mechanism on dopaminergic neurons. However, an indirect effect implicating non dopaminergic neurons can not be excluded. These results are compatible with work on PC12 cells showing that extracellular stimuli leading to membrane depolarization induce several immediate early genes including c-fos (Bartel et al., 1989;Morgan and Curran, 1986).

An enhancement in the firing rate of dopaminergic neurons could cause the opening of voltage-sensitive Ca^{2+} channels and an increase in intracellular Ca^{2+} . Considering several studies describing the essential role of Ca^{2+} in c-fos transcriptional activation (Ghosh, Ginty et al., 1994;Morgan and Curran, 1986;Sheng, McFadden, and Greenberg, 1990), we examined the role of Ca^{2+} in haloperidol-induced Fos expression. We found that Ca^{2+} chelation by BAPTA blocked the ability of haloperidol to induce Fos expression. These results are in agreement with the work of Esteve et al. (1995) (Esteve et al., 1995) who showed that incubation of PC12 cells in Ca^{2+} -free media prevents haloperidol-induced Fos expression.

In our studies, only a subset of dopaminergic neurons expressed Fos after haloperidol exposure. Although a number of interpretations are possible, it may be that the population of dopaminergic neurons in our cultures is heterogeneous and that only a subset of these neurons express the receptor(s) targeted by haloperidol at a sufficiently high level.

4.5 Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase.

Expression of the c-fos gene is under the control of two regulatory element named SRE and CaRE/CRE. The SRE element has been described as necessary for c-fos induction by serum, growth factors and PKC-activators (Treisman, 1985). Binding of phospho-CREB to the CaRE/CRE element leads to c-fos transcription. Both PKA, activated by cAMP (Gonzalez and Montminy, 1989), and CaMK, activated by the Ca²⁺-dependent activation of calmodulin (Sheng, Thompson et al., 1991; Wu, Deisseroth et al., 2001), have the ability to phosphorylate CREB. In support of the implication of the later pathway, we report here that the CaMK inhibitor KN-93 blocks Fos induction by haloperidol in dopaminergic neurons. Although we have not directly measured phospho-CREB in the present set of experiments, taken together our results support the hypothesis that haloperidol induces Fos expression in dopaminergic neurons by increasing intracellular Ca²⁺, leading to CaMK activation and CREB phosphorylation. Considering that c-fos induction by haloperidol was completely blocked by a CaMK inhibitor, a major role for other pathways that could regulate c-fos such as those involving PKC or MAP kinases cannot be excluded, but is unlikely.

In summary, the present study represents the first report describing the effect of haloperidol on Fos expression specifically in dopaminergic neurons. In our model of cultured VTA neurons, we have identified a mechanism of c-fos induction by the typical antipsychotic haloperidol that is independent of D2 receptor binding. This induction of c-fos occurs through an activity-dependent increase in intracellular Ca²⁺ leading to an activation of CaMK. Although the physiological relevance of our observations remain to be specified, the fact that our main effect is obtained at low nanomolar concentrations of

haloperidol suggests that it has the potential to contribute to the therapeutic action or side-effects of this drug. Considering the obvious limitations of primary culture models in terms of level of receptor expression and lack of normal neuronal circuitry, it would be important to attempt to replicate our results in a more intact preparation. Systematic and quantitative double-labelling experiments would be required.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Dr. Robert Élie for his advice on statistical analyses and for his support. We also thank Isabel Jutras and Marie-Josée Bourque for their help in preparing neuronal cultures and Geneviève Beaudry for help with the *in situ* hybridization experiments. This work was supported in part by the EJLB Foundation and by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to L.-E.T. L.-E. Trudeau is a “Michael Smith scholar” of the Canadian Institutes of Health Research. D. Lévesque is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

- Adams, A.C., Keefe, K.A. (2001). Examination of the involvement of protein kinase A in D2 dopamine receptor antagonist-induced immediate early gene expression. *J Neurochem* 77: 326-35.
- Adams, M.R., Brandon, E.P., Chartoff, E.H., Idzerda, R.L., Dorsa, D.M., McKnight, G.S. (1997). Loss of haloperidol induced gene expression and catalepsy in protein kinase A-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12157-61.
- Bartel, D.P., Sheng, M., Lau, L.F., Greenberg, M.E. (1989). Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. *Genes Dev* 3 : 304-313.
- Beaudry, G., Langlois, M.C., Weppe, I., Rouillard, C., Levesque, D. (2000). Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor nerve growth factor-inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *J Neurochem* 75 : 1694-702.
- Bourque, M.J., Trudeau, L.E. (2000). GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. *Eur J Neurosci* 12: 3172-80.
- Bouthenet, M.L., Souil, E., Martres, M.P., Sokoloff, P., Giros, B., Schwartz, J.C. (1991). Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* 564: 203-219.
- Boyson, S.J., McGonigle, P., Molinoff, P.B., (1986). Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *J Neurosci* 6, 3177-88.

- Bunney, B.S., Walters, J.R., Roth, R.H., Aghajanian, G.K. (1973). Dopaminergic neurons: effect of antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity. *J Pharmacol Exp Ther* 185: 560-71.
- Cardozo, D.L. (1993). Midbrain dopaminergic neurons from postnatal rat in long-term primary culture. *Neuroscience* 56: 409-421.
- Ceci, A., Smith, M., French, E.D. (1988). Activation of the A10 mesolimbic system by the sigma-receptor agonist (+)SKF 10,047 can be blocked by rimcazole, a novel putative antipsychotic. *Eur J Pharmacol* 154 : 53-7.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-9.
- Congar, P., Bergevin, A., Trudeau, L.E. (2002). D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K⁺ channels. *J Neurophysiol* 87: 1046-56.
- Dahmen, N., Fischer, V., Hodl, P., Rujescu, D., Reuss, S., Bartoszyk, G.D., Hiemke, C. (1996). Induction of c-fos gene expression by the selective sigma receptor ligand EMD 57445 in rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 6: 237-243.
- de Costa, B.R., Dominguez, C., He, X.S., Williams, W., Radesca, L., Bowen, W. (1992). Synthesis and biological evaluation of conformationally restricted 2-(1- pyrrolidiny)-N-[2-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]-N-methylethylenediamines as sigma receptor ligands. 1. Pyrrolidine, piperidine, homopiperidine, and tetrahydroisoquinoline classes. *J Med Chem* 35: 4334-43.
- Dearry, A., Gingrich, J.A., Falardeau, P., Freneau, R.T. Jr, Bates, M.D., Caron, M.G. (1990). Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347: 72-6.

Deutch, A. Y., Lee, M. G., and Iadarola, M. J. (1992). Regionally specific effects of antipsychotic drugs on striatal fos expression: the nucleus accumbens shell as a locus of antipsychotic action. *Mol. Cell. Neurosci.* 3: 332-341. 92.

Dragunow, M., Robertson, G.S., Faull, R.L., Robertson, H.A., Jansen, K. (1990). D2 dopamine receptor antagonists induce fos and related proteins in rat striatal neurons. *Neuroscience* 37: 287-294.

Dragunow, M., Robertson, H.A., (1987). Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature* 329: 441-2.

Egan, C., Herrick-Davis, K., Teitler, M. (1998). Creation of a constitutively activated state of the 5-HT_{2A} receptor by site-directed mutagenesis: revelation of inverse agonist activity of antagonists. *Ann N Y Acad Sci* 861: 136-139.

Esteve, L., Haby, C., Rodeau, J.L., Humblot, N., Aunis, D., Zwiller, J. (1995). Induction of c-fos, jun B and egr-1 expression by haloperidol in PC12 cells: involvement of calcium. *Neuropharmacology* 34: 439-448.

Fink-Jensen, A., Ludvigsen, T.S., Korsgaard, N. (1995). The effect of clozapine on Fos protein immunoreactivity in the rat forebrain is not mimicked by the addition of alpha 1-adrenergic or 5HT₂ receptor blockade to haloperidol. *Neurosci Lett* 194: 77-80.

Ghosh, A., Ginty, D.D., Bading, H., Greenberg, M.E. (1994). Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. *J Neurobiol* 25: 294-303.

Gonzalez, G.A., Montminy, M.R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59: 675-80.

Graybiel, A.M., Besson, M.J., Weber, E., (1989). Neuroleptic-sensitive binding sites in the nigrostriatal system: evidence for differential distribution of sigma sites in the substantia nigra, pars compacta of the cat. *J Neurosci* 9: 326-38.

- Greenberg, M.E., Ziff, E.B., Greene, L.A., (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* 234, 80-3.
- Greif, G.J., Lin, Y.J., Liu, J.C., Freedman, J.E. (1995). Dopamine-modulated potassium channels on rat striatal neurons: specific activation and cellular expression. *J Neurosci* 15: 4533-4544.
- Hall, D.A., Strange, P.G. (1997). Evidence that antipsychotic drugs are inverse agonists at D2 dopamine receptors. *Br J Pharmacol* 121 : 731-736.
- Hartman, D.S., Civelli, O. (1996). Molecular attributes of dopamine receptors: new potential for antipsychotic drug development. *Ann Med* 28: 211-219.
- Kitai, S.T., Surmeier, D.J. (1993). Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons. *Adv Neurol* 60: 40-52.
- Konradi, C., Cole, R.L., Heckers, S., Hyman, S.E. (1994). Amphetamine regulates gene expression in rat striatum via transcription factor CREB. *J Neurosci* 14: 5623-34.
- Konradi, C., Heckers, S. (1995). Haloperidol-induced Fos expression in striatum is dependent upon transcription factor cyclic AMP response element binding protein. *Neuroscience* 65: 1051-1061.
- Leveque, J.C., Macias, W., Rajadhyaksha, A., Carlson, R.R., Barczak, A., Kang, S., Li, X.M., Coyle, J.T., Haganir, R.L., Heckers, S., Konradi, C. (2000). Intracellular modulation of NMDA receptor function by antipsychotic drugs. *J Neurosci* 20: 4011-4020.
- McCracken, K.A., Bowen, W.D., de Costa, B.R., Matsumoto, R.R. (1999). Two novel sigma receptor ligands, BD1047 and LR172, attenuate cocaine- induced toxicity and locomotor activity. *Eur J Pharmacol* 370 : 225-32.

- Meador-Woodruff, J.H., Mansour, A., Bunzow, J.R., Van Tol, H.H., Watson, S.J.J., Civelli, O. (1989). Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7625-7628.
- Mengod, G., Vilaro, M.T., Niznik, H.B., Sunahara, R.K., Seeman, P., O'Dowd, B.F., Palacios, J.M., (1991). Visualization of a dopamine D1 receptor mRNA in human and rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 10, 185-91.
- Michel, F.J., Trudeau, L.E. (2000). Clozapine inhibits synaptic transmission at GABAergic synapses established by ventral tegmental area neurones in culture. *Neuropharmacology* 39: 1536-43.
- Miller, J.C. (1990). Induction of c-fos mRNA expression in rat striatum by neuroleptic drugs. *J Neurochem* 54: 1453-1455.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78: 189-225.
- Montminy, M.R., Bilezikjian, L.M. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328 : 175-8.
- Morgan, J.I., Curran, T. (1986). Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* 322: 552-555.
- Onali, P., Olanas, M.C., Gessa, G.L. (1985). Characterization of dopamine receptors mediating inhibition of adenylate cyclase activity in rat striatum. *Mol Pharmacol* 28: 138-145.
- Ozaki, T., Katsumoto, E., Yokotani, N., Yamagami, S. (1997). The comparative effects of haloperidol, (-)-sulpiride, and SCH23390 on c-fos and c-jun mRNA expressions, and AP-1 DNA binding activity. *Eur Neuropsychopharmacol* 7 : 181-7.

- Robertson, G.S., Fibiger, H.C. (1992). Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. *Neuroscience* 46 : 315-328.
- Robertson, G.S., Matsumura, H., Fibiger, H.C. (1994). Induction patterns of Fos-like immunoreactivity in the forebrain as predictors of atypical antipsychotic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 1058-66.
- Rosen, L.B., Ginty, D.D., Greenberg, M.E. (1995). Calcium regulation of gene expression. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 30: 225-253.
- Sagar, S.M., Sharp, F.R., Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240: 1328-31.
- Seth, P., Fei, Y.J., Li, H.W., Huang, W., Leibach, F.H., Ganapathy, V. (1998). Cloning and functional characterization of a sigma receptor from rat brain. *J Neurochem* 70: 922-931.
- Sharp, J.W. (1997). Phencyclidine (PCP) acts at sigma sites to induce c-fos gene expression. *Brain Res* 758: 51-58.
- Sheng, M., McFadden, G., Greenberg, M.E. (1990). Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4: 571-582.
- Sheng, M., Thompson, M.A., Greenberg, M.E. (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252: 1427-30.
- Strange, P.G. (2001). Antipsychotic drugs: importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. *Pharmacol Rev* 53: 119-33.
- Sulzer, D., Joyce, M.P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S.N., Hattori, T., Rayport, S. (1998). Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* 18: 4588-602.

- Treisman, R. (1985). Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell* 42: 889-902.
- Vanhauwe, J.F., Ercken, M., van de Wiel, D., Jurzak, M., Leysen, J.E. (2000). Effects of recent and reference antipsychotic agents at human dopamine D2 and D3 receptor signaling in Chinese hamster ovary cells. *Psychopharmacology (Berl)* 150: 383-90.
- Vilner, B.J., Bowen, W.D. (2000). Modulation of cellular calcium by sigma-2 receptors: release from intracellular stores in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 900-11.
- Vilner, B.J., de Costa, B.R., Bowen, W.D. (1995). Cytotoxic effects of sigma ligands: sigma receptor-mediated alterations in cellular morphology and viability. *J Neurosci* 15: 117-34.
- Weiner, D.M., Levey, A.I., Sunahara, R.K., Niznik, H.B., O'Dowd, B.F., Seeman, P., Brann, M.R. (1991). D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1859-1863.
- Williams, P.J., MacVicar, B.A., Pittman, Q.J. (1989). A dopaminergic inhibitory postsynaptic potential mediated by an increased potassium conductance. *Neuroscience* 31: 673-681.
- Wirtshafter, D., Asin, K.E. (1995). Dopamine antagonists induce fos-like-immunoreactivity in the substantia nigra and entopeduncular nucleus of the rat. *Brain Res* 670: 205-14.
- Wu, G.Y., Deisseroth, K., Tsien, R.W. (2001). Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen- activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2808-13.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Haloperidol induces Fos expression in dopaminergic neurons in culture.

(A) Immunofluorescence image of neurons double-labelled for tyrosine hydroxylase (red) and Fos (green). The nuclear region expresses the two markers and appears yellow. (B) (C) Histograms illustrating the dose-response relationship and time course of haloperidol's effect on Fos. Haloperidol concentrations are expressed in nM. The percentage of dopaminergic neurons expressing Fos (Fos+ dopamine neurons) was normalized to the untreated control condition of each experiment (n= 6). Data are expressed as mean \pm SEM.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Figure 2 D2 receptor blockade by haloperidol is not necessary to induce c-fos

expression in dopaminergic neurons. (A) In situ hybridization illustrating the specific labelling of cultured dopaminergic neurons by radiolabelled D2 receptor mRNA probes (silver grains). Dopaminergic neurons were identified using tyrosine hydroxylase immunostaining (brown diaminobenzidine deposit). (B) Expression D2-like receptor family in the rat VTA primary culture determined by RT-PCR analysis. Specific sets of primers were used to amplify each D2-like receptor subtypes. Corresponding length of fragments generated are D2S: 316-bp, D2L: 403-bp, D3: 459-bp and D4: 256-bp. Total brain mRNA was used as a positive control. A 100-bp ladder is shown on the left and right. The position

of the 200-bp and 500-bp fragments is identified next to the left lane. (C)

Histogram illustrating the lack of effect of the D2 receptor antagonist sulpiride (1 μ M) on haloperidol-induced Fos expression in dopaminergic neurons (n=6). Data are expressed as mean \pm SEM. ** p \leq 0.01.

Figure 3 Haloperidol induces Fos expression by an activity-dependent mechanism that is independent of PKA activation. (A) Histogram illustrating that elevations of intracellular cAMP levels using the adenylyl cyclase activator forskolin (FORSK) (n= 4) increases the proportion of dopaminergic neurons expressing Fos. This increase is prevented by the membrane-permeant PKA inhibitor Rp-cAMPS (RP). (B) Histogram illustrating that Rp-cAMPS (RP) fails to prevent haloperidol-induced Fos expression in dopaminergic neurons (n=6). (C) Histogram illustrating that a pre-treatment with the sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX) prevents haloperidol-induced Fos expression (n=5). Data are expressed as mean \pm SEM ** p \leq 0.01.

Figure 4 **Effect of calcium chelation or calmodulin-dependent kinase**

inhibition on Fos expression induced by haloperidol. (A) Histogram showing that chelation of intracellular calcium using the membrane-permeant intracellular calcium chelator BAPTA-AM (BAPTA) prevents haloperidol-induced Fos expression in dopaminergic neurons (HAL+BAPTA) (n=6). (B) Histogram showing that the calmodulin-dependent kinase inhibitor KN-93 prevents haloperidol-induced Fos expression (HAL+KN-93) (n=6). Data are expressed as mean \pm SEM. ** p \leq 0.01.

Figure 1

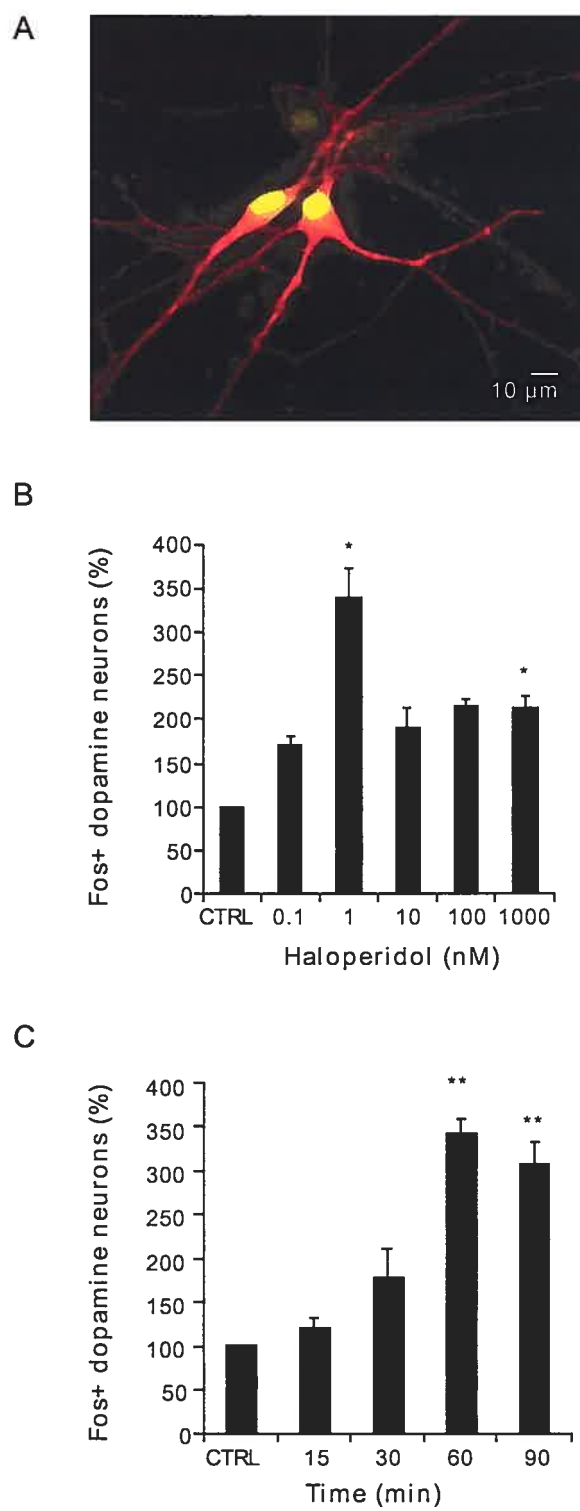


Figure 2

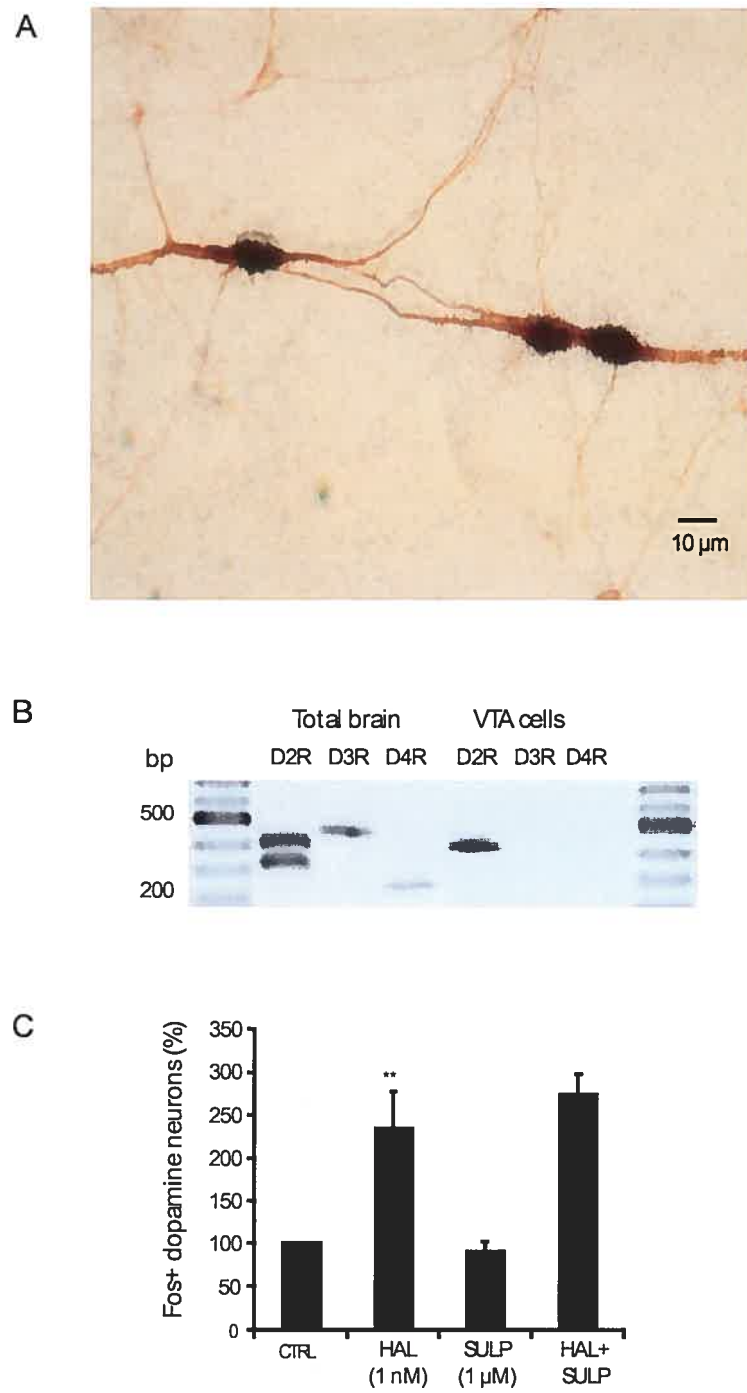


Figure 3

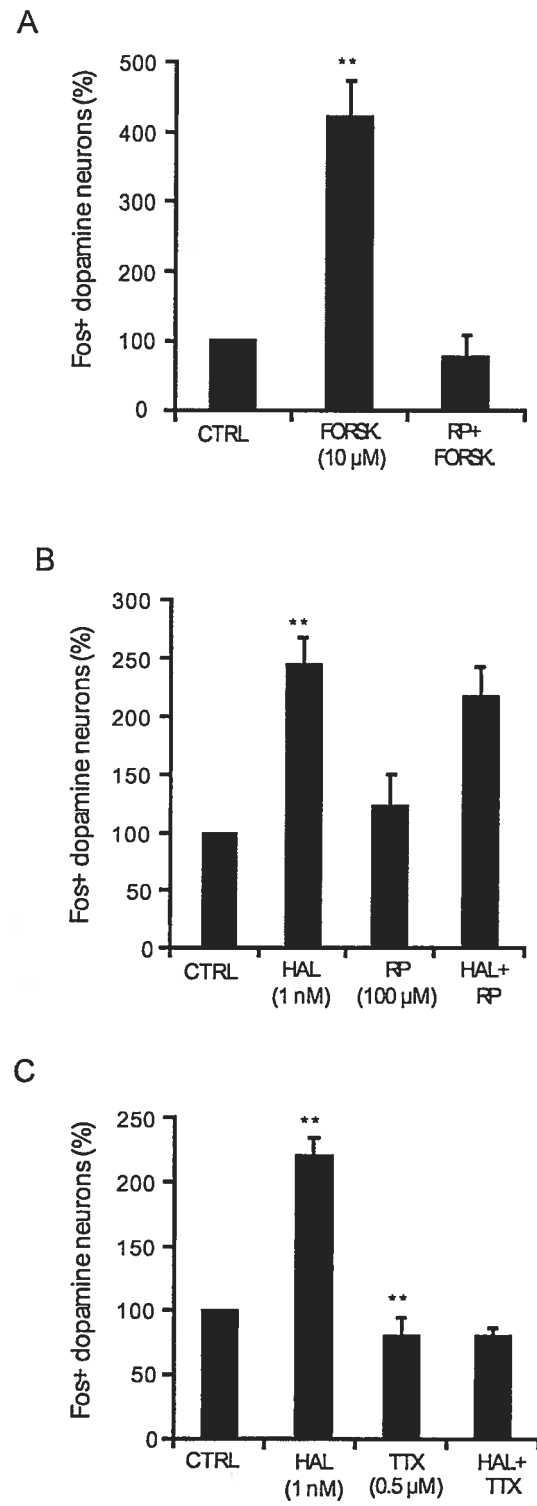


Figure 4

