



Voies de signalisation associées au récepteur 5-HT6 et développement neuronal

Fanny Duhr

► To cite this version:

Fanny Duhr. Voies de signalisation associées au récepteur 5-HT6 et développement neuronal. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2015. Français. NNT: 2015MONTT042. tel-01546186

HAL Id: tel-01546186

<https://theses.hal.science/tel-01546186>

Submitted on 23 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**UNIVERSITE DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale n°168 :
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé
Et de l'unité de recherche CNRS UMR5203

Spécialité : **NEUROBIOLOGIE**

Présentée par **Fanny DUHR**

VOIES DE SIGNALISATION ASSOCIEES AU RECEPTEUR 5-HT₆ ET DEVELOPPEMENT NEURONAL

Soutenue le **5 Juin 2015** devant le jury composé de

Mr Joël BOCKAERT , Professeur, Université de Montpellier	Président
Mr Alexandre DAYER , Professeur, Université de Genève	Rapporteur
Mr Zsolt LENKEI , Chargé de Recherche, ESPCI ParisTech, Paris	Rapporteur
Mme Patricia GASPARD , Directeur de Recherche, Institut du Fer à Moulin, Paris	Examinatrice
Mr Philippe MARIN , Directeur de Recherche, Institut de Génétique Fonctionnelle, Montpellier	Directeur de thèse
Mme Séverine CHAUMONT-DUBEL , Maître de Conférence Universitaire, Université de Montpellier	Co-Directrice de thèse



Remerciements

J'aimerais remercier tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, au bon déroulement de mes années de thèse.

- * Mes directeurs, Philippe et Séverine, pour la confiance que vous m'avez accordée et pour la qualité de votre encadrement, merci de m'avoir encouragée jusqu'au bout ; merci Séverine pour ton enthousiasme au quotidien, ainsi que tes encouragements et les nombreuses discussions que nous avons eues, ça a toujours été un vrai plaisir et tu as toujours su me remotiver et trouver les bons mots quand ça a été nécessaire ;
- * Joël pour votre soutien en général et votre enthousiasme vis-à-vis de mon projet de thèse qui a donné lieu à de riches discussions ;
- * Aline, vous avez été mon premier contact dans la recherche et ça a été une chance pour moi ;
- * Michel, vous m'avez soutenue et accompagnée depuis le master et je vous en remercie ;
- * Le Fonds National de la Recherche luxembourgeois (FNR) pour avoir supporté et financé mon projet de thèse ainsi que les nombreux congrès auxquels j'ai eu la chance de participer ;
- * Les membres de la plateforme de protéomique avec qui j'ai partagé mon quotidien : Serge, Martial, Geoffrey, Eric, Madeleine, Edith, Oana, Clément, j'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme collègues de bureau. Vous avez été un soutien important;
- * Tous mes coéquipiers, la bonne ambiance dans l'équipe et notre bonne entente a été une sacrée chance, un grand merci à tous ceux avec qui j'ai partagé ces années, anciens ou nouveaux ; mention spéciale à ceux de plus longue date: Elisabeth, Pascal, Paul, Romain, Coralie, Carine, Sylvie, Flo, Patrizia, Franck, merci à tous pour votre bonne humeur et votre soutien, ça a été un vrai plaisir de partager ces années avec vous, j'en garderai un super souvenir malgré certaines périodes plus éprouvantes que d'autres. Annel, j'ai été contente de partager les coulisses de la thèse avec toi. De même, Cricri et Elise, de notre grande équipe de neuro, pour nos discussions de fin de soirée. Je vous souhaite, ainsi qu'aux derniers

arrivés dans l'équipe sérotonine, Samy, Camille, Mahdi de passer encore de supers moments;

- * Les membres de mon comité de thèse et de mon jury pour avoir été disponibles et avoir contribué aux discussions favorables à l'avancée de mon projet ;
- * Madame Urvoy pour avoir su calmer mes inquiétudes quand cela était nécessaire;
- * Tous les membres de l'IGF avec qui j'ai eu la chance d'interagir, j'ai pu profiter de l'atmosphère de travail, d'entraide et de partage qui règne à l'institut ; merci à Fabrice, Vincent, Nathalie, Benoît et Isabelle pour votre précieuse aide technique ;
- * Egalement les membres des services communs qui ont grandement facilité mon quotidien, Aurore, Driss, Céline, Eric, Quentin, Elodie, ainsi que les membres de la plateforme MRI de l'IGH ;
- * Enfin, *last but not least*, ceux qui m'ont soutenue de l'extérieur (et qui me soutiennent encore pour la suite !) Nico, mes parents, Dodi, Colette, Cece, mes amis, ainsi que mes coupines, merci pour votre présence et votre compréhension.

J'espère n'avoir oublié personne, en tout cas, merci à tous, et pour ceux que je ne reverrai pas, bonne continuation!

« A journey of a thousand miles begins with a single step »

Lao Tseu

Résumé

Titre : « Voies de signalisation associées au récepteur 5-HT₆ : rôle dans le développement neuronal »

Mots Clés : 5-HT₆R, signalisation, développement neuronal

La mise en place des circuits neuronaux est un processus complexe et précisément régulé. Une atteinte de ce processus est à l'origine de diverses pathologies neurodéveloppementales telles que la schizophrénie ou les troubles du spectre autistique, désordres psychiatriques partageant une altération des fonctions cognitives. Le récepteur 6 de la sérotonine (récepteur 5-HT₆), notamment connu pour son implication dans la migration neuronale, s'est révélé être une cible thérapeutique de choix dans le traitement des symptômes cognitifs associés à la schizophrénie mais aussi à des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Cependant la signalisation déclenchée par le récepteur 5-HT₆ n'explique pas entièrement son implication dans les processus neurodéveloppementaux. Mon travail de thèse a donc visé à comprendre les mécanismes de signalisation engagés par le récepteur 5-HT₆ au cours du développement neuronal. La réalisation d'un crible protéomique a permis de montrer que le récepteur 5-HT₆ interagit avec plusieurs protéines cruciales dans le développement neuronal comme la protéine Cdk5 et sa cible WAVE-1. J'ai ensuite pu démontrer qu'en plus de son rôle dans la migration, le récepteur 5-HT₆ contrôle de façon agoniste-indépendante l'élongation des neurites par un mécanisme impliquant la phosphorylation de son domaine C-terminal par la kinase Cdk5 et l'activation de la RhoGTPase Cdc42. La seconde partie de mon travail a visé à mettre en évidence le rôle du récepteur 5-HT₆ dans la formation des épines dendritiques et à comprendre l'implication de la protéine WAVE-1, cible de Cdk5, dans ce processus. Les résultats obtenus au cours de ma thèse apportent de nouveaux éléments quant au contrôle des processus neurodéveloppementaux par le récepteur 5-HT₆. Ce récepteur apparaît donc comme une cible thérapeutique de choix dans les atteintes neurodéveloppementales en contribuant au développement des circuits cognitifs en relation avec la physiopathologie des troubles du spectre autistique ou de la schizophrénie.

Abstract

Title : « 5-HT₆ receptor signaling in neurodevelopment »

Key Words: 5-HT₆R, neuronal development

Brain circuitry patterning is a complex, highly regulated process. Alteration of this process is affected gives rise to various neurodevelopmental disorders such as schizophrenia or Autism Spectrum Disorders (ASD), which are both characterized by a wide spectrum of deficits. Serotonin 6 receptor (5-HT₆ receptor), which is known for its implication in neuronal migration process, has been identified as a key therapeutic target for the treatment of cognitive deficits observed in schizophrenia, but also in neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's disease. However, the signalling mechanisms knowned to be activated by the 5-HT₆ receptor do not explain its involvement in neurodevelopmental processes. My thesis project therefore aimed at characterizing the signalling pathways engaged by 5-HT₆ receptor during neural development. A proteomic approach allowed me to show that the 5-HT₆ receptor was interacting with several proteins playing crucial roles in neurodevelopmental processes such as Cdk5 or WAVE-1. I then demonstrated that, besides its role in neuronal migration, the 5-HT₆ receptor was also involved in neurite growth through constitutive phosphorylation of 5-HT₆ receptor at Ser³⁵⁰ by associated Cdk5, a process leading to an increase in Cdc42 activity. The second part of my work aimed at understanding the role of 5-HT₆ receptor in dendritic spines morphogenesis, and the involvement of WAVE-1 and Cdk5 in this process. These results provide new insights into the control of neurodevelopmental processes by 5-HT₆ receptor. Thus, 5-HT₆ receptor appears to be a key therapeutic target for neurodevelopmental disorders by contributing to the development of cognitive circuitry related to the pathophysiology of ASD or schizophrenia.

Table des Matières

REMERCIEMENTS	6
RESUME	10
ABSTRACT	11
TABLE DES MATIERES	12
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	16
PRINCIPALES ABREVIATIONS	18
INTRODUCTION.....	20
I. LE DEVELOPPEMENT NEURONAL.....	22
A. NEUROGENESE EMBRYONNAIRE ET ADULTE.....	22
1. <i>Neurogenèse embryonnaire</i>	24
2. <i>Neurogenèse adulte</i>	38
B. PATHOLOGIES DU DEVELOPPEMENT ET DIFFERENCIATION NEURONALE	41
1. <i>Pathologies neurodéveloppementales et mutations associées</i>	41
2. <i>Différenciation neuronale et pathologies psychiatriques neurodéveloppementales</i>	42
II. LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE.....	44
A. ANATOMIE ET MISE EN PLACE DES CIRCUITS SEROTONINERGIQUES CENTRAUX	46
1. <i>Circuits sérotoninergiques centraux</i>	46
2. <i>Mise en place des circuits sérotoninergiques centraux</i>	46
B. RÉCEPTEURS SÉROTONINERGIQUES.....	47
1. <i>Structure générale d'un RCPG et transduction du signal</i>	47
2. <i>Classification des récepteurs sérotoninergiques</i>	48
C. FONCTIONS	50
1. <i>Fonctions périphériques</i>	50
2. <i>Fonctions centrales</i>	51
3. <i>Fonctions développementales</i>	53
III. LE RECEPTEUR 5-HT₆.....	57
A. GENE ET PROTEINE	57
B. LOCALISATION	58
C. COUPLAGE ET SIGNALISATION	61
D. FONCTIONS.....	65
1. <i>Contrôle de la prise alimentaire</i>	65
2. <i>Modulation de la neurotransmission</i>	65
3. <i>Cognition</i>	70
4. <i>Développement neuronal</i>	71
E. LE RECEPTEUR 5-HT ₆ , UNE CIBLE THERAPEUTIQUE	72
1. <i>Obésité</i>	72
2. <i>Schizophrénie</i>	73
3. <i>Maladie d'Alzheimer</i>	73
4. <i>Anxiété et dépression</i>	74

IV. LA PROTEINE CDK5	76
A. STRUCTURE ET FONCTIONS	76
1. <i>Structure et régulation</i>	76
2. <i>Fonctions neuronales normales et pathologiques</i>	81
B. RÔLE DANS LE DÉVELOPPEMENT NEURONAL.....	84
V. LA PROTEINE WAVE-1	87
A. STRUCTURE ET RÉGULATION DES WASP.....	87
1. <i>La Famille WASP</i>	87
2. <i>Structure et Régulation des protéines WAVE</i>	90
B. FONCTIONS NEURODÉVELOPPEMENTALES DE WAVE-1	94
RESULTATS.....	96
I. IMPLICATION DE LA VOIE 5-HT₆/CDK5 DANS LA POUSSE NEURITIQUE.....	98
A. CONTEXTE ET OBJECTIFS	98
B. ARTICLE.....	100
C. RÉSUMÉ ET PERSPECTIVES.....	138
1. <i>5-HT₆/Cdk5, une nouvelle voie de signalisation impliquée dans le développement neuronal</i>	138
2. <i>Régulation de la voie 5-HT₆/Cdk5</i>	139
3. <i>Mécanisme d'activation de Cdc42</i>	140
4. <i>La voie 5-HT₆/Cdk5 dans d'autres processus neurodéveloppementaux</i>	141
II. IMPLICATION DU RÉCEPTEUR 5-HT₆ DANS LA MORPHOGENÈSE DES ÉPINES DENDRITIQUES	144
A. CONTEXTE	144
B. MATÉRIEL & MÉTHODES.....	146
1. <i>Rôle du récepteur 5-HT₆ dans la morphogénèse des épines dendritiques</i>	146
2. <i>Etude de la phosphorylation de WAVE-1</i>	147
C. RESULTATS.....	149
1. <i>WAVE-1 interagit avec le récepteur 5-HT₆</i>	149
2. <i>Le récepteur 5-HT₆ module la morphogénèse des épines dendritiques</i>	151
3. <i>Modulation de la phosphorylation de WAVE-1 par le récepteur 5-HT₆</i>	154
D. DISCUSSION	156
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	160
I. LE RÉCEPTEUR 5-HT₆ AU COURS DU DÉVELOPPEMENT NEURONAL.....	162
A. AUTRES PARTENAIRES DU RÉCEPTEUR 5-HT ₆ POTENTIELLEMENT IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT NEURONAL	162
1. <i>5-HT₆/G_s</i>	162
2. <i>5-HT₆/Fyn</i>	162
3. <i>5-HT₆/mTOR</i>	163
4. <i>5-HT₆/NF1</i>	164
5. <i>5-HT₆/MAP1b</i>	164
6. <i>5-HT₆/GPRIN1</i>	165
7. <i>5-HT₆/Paralemmin</i>	165
8. <i>Perspectives</i>	166

B. REGULATION DE LA SIGNALISATION ASSOCIEE AU RECEPTEUR 5-HT ₆ AU COURS DU DEVELOPPEMENT NEURONAL	168
1. <i>Régulation temporelle</i>	168
2. <i>Régulation spatiale</i>	170
II. POTENTIEL THERAPEUTIQUE DU RECEPTEUR 5-HT₆ DANS LES PATHOLOGIES PSYCHIATRIQUES NEURODEVELOPPEMENTALES	175
A. INDICES CLINIQUES D'UN LIEN ENTRE LE RECEPTEUR 5-HT ₆ ET LES PATHOLOGIES NEURODEVELOPPEMENTALES	175
B. IMPLICATION DU RECEPTEUR 5-HT ₆ DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DES TROUBLES PSYCHIATRIQUES NEURODEVELOPPEMENTAUX.....	176
1. <i>Schizophrénie</i>	177
2. <i>Troubles du spectre autistique</i>	178
C. LE RECEPTEUR 5-HT ₆ COMME CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LES PATHOLOGIES PSYCHIATRIQUES NEURODEVELOPPEMENTALES	180
III. CONCLUSION GENERALE	182
BIBLIOGRAPHIE	184

Table des Illustrations

FIGURE 1 : DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	23
FIGURE 2 : TRAJECTOIRES MIGRATOIRES DANS LE CORTEX EN DEVELOPPEMENT	26
FIGURE 3 : STADES DEVELOPPEMENTAUX DES NEURONES D'HIPPOCAMPE EN CULTURE	31
FIGURE 4 : MODELES DE FORMATION D'UNE EPINE DENDRITIQUE	35
FIGURE 5: CLASSIFICATION DES EPINES DENDRITQUES	36
FIGURE 6 : LA SYNAPSE SEROTONINERGIQUE	45
FIGURE 7: TRANSDUCTION DU SIGNAL COUPLE AUX RECEPTEURS DE LA SEROTONINE	49
FIGURE 8 : IMMUNOLOCALISATION DU RECEPTEUR 5-HT ₆ DANS LE CERVEAU DE RAT	60
FIGURE 9 : VOIES DE SIGNALISATION ASSOCIEES AU RECEPTEUR 5-HT ₆	64
FIGURE 10: CONTROLE DE LA NEUROTRANSMISSION PAR LE 5-HT ₆ R EXPRIME SUR LES NEURONES GABAERGIQUES	69
FIGURE 11 : STRUCTURE DE CDK5	79
FIGURE 12 : REGULATION DE L'ACTIVITE ET DE LA LOCALISATION DE CDK5	80
FIGURE 13: LIEN ENTRE SIGNAL EXTRACELLULAIRE, WASPS ET CYTOSQUELETTE	89
FIGURE 14 : STRUCTURE ET REGULATION DE WAVE-1	93
FIGURE 16 : HYPOTHESE SUR LA MODULATION DE LA PHOSPHORYLATION DE WAVE-1 PAR LE RECEPTEUR 5-HT ₆	145
FIGURE 1 RESULTATS : LE RECEPTEUR 5-HT ₆ INTERAGIT AVEC WAVE-1	150
FIGURE 2 RESULTATS : LE RECEPTEUR 5-HT ₆ MODULE LA MORPHOGENESE DES EPINES DENDRITQUES	153
FIGURE 3 RESULTATS : CDK5 PHOSPHORYLE WAVE-1 (SER ³⁹⁷) DANS LES NG108-15 ET LES NEURONES D'HIPPOCAMPES	155
FIGURE 17 : LE RECEPTEUR 5-HT ₆ ET SES EFFECTEURS DANS LE DEVELOPPEMENT NEURONAL	167
FIGURE 18 : IMPACT SUR LE DEVELOPPEMENT CEREBRAL D'UNE PERTURBATION SURVENANT A DIFFERENTES ETAPES	177

Principales Abréviations

5-HT	5-hydroxytryptamine
Ach	Acétylcholine
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid
AMPC	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
Arp2/3	Actin Related Protein 2/3 complex
ATP	Adénosine Triphosphate
BDNF	Brain-Derived Growth Factor
Cdk5	Cyclin dependent kinase 5
CREB	c-AMP Response Element Binding protein
C-terminal :	Région Carboxy-terminale
DA	Dopamine
Dcx	Doublecortin
DIV	Day <i>In Vitro</i>
EG	Eminence Ganglionnaire
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
GABA	Acide γ -AminoButyrique
GAP	GTPase-Activating Protein
GDF	GDI Dissociation Factor
GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GIP	GPCR Interacting Protein
GPRIN1	G Protein-Regulated Inducer of Neurite growth 1
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
GTP	Guanosine Triphosphate
KO	Knock Out
Lis1	Lissencephaly 1

LTP	Long Term Potentiation (potentialisation à long terme)
MAO	Monoamine Oxydase
MAP1b	Microtubule Associated Protein 1b
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NGF	Nerve Growth Factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NPF	Nucleation Promoting Factor
NT3/4	Neurotrophin 3/4
N-terminal	Région amino-terminale
OA	Oligonucléotide Antisens
PALM	Paralemmin
PCP	Phencyclidine -1-(1-Phenylcyclohexyl)Pipérine
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
PKA	Protéine Kinase A
PSD-95	Post-Synaptic Density-95
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
Récepteur 5-HT₆	Récepteur de la sérotonine de type 6
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
Ser	Sérine
SERT	Serotonin Transporteur
Tph	Tryptophane Hydroxylase
TSA	Troubles du Spectre Autistique
VMAT	Transporteur Vésiculaire des Monoamines
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE	WASP family Verprolin-homologous protein
WRC	WAVE Regulatory Complex

INTRODUCTION

I. LE DEVELOPPEMENT NEURONAL

A. Neurogenèse embryonnaire et adulte

Le développement du système nerveux débute au cours de la troisième semaine embryonnaire chez l'homme et au septième jour embryonnaire chez la souris, avec un épaissement de l'ectoderme qui correspond à la formation de la plaque neurale. On observe, par la suite, la formation du tube neural avec fusion des crêtes neurales (*figure 1*). L'espace à l'intérieur du tube neural s'élargit ensuite de manière importante au niveau du télencéphale (partie la plus antérieure du tube neural) pour former les deux ventricules latéraux. Le feuillet couvrant l'espace ventriculaire le long du tube neural constitue le neuroépithélium germinatif à partir duquel prolifèrent les précurseurs neuronaux.

Bien qu'il ait longtemps été admis que les neurones, cellules post-mitotiques, ne soient plus formés à l'âge adulte, ce concept est fortement remis en cause aujourd'hui par la découverte de différentes niches, où prolifèrent des précurseurs neuronaux, dans le cerveau adulte.

Ce chapitre retracera donc les processus mis en jeu dans la mise en place des circuits neuronaux à l'état embryonnaire ainsi que les mécanismes impliqués dans la neurogenèse adulte. Le développement neuronal est un processus extrêmement complexe faisant intervenir de très nombreux acteurs. Le complexe formé par le récepteur 5-HT₆ et la kinase Cdk5 faisant l'objet de ma thèse, j'ai donc choisi, dans ce chapitre, de mettre en avant le rôle des cibles de Cdk5 dans le développement neuronal.

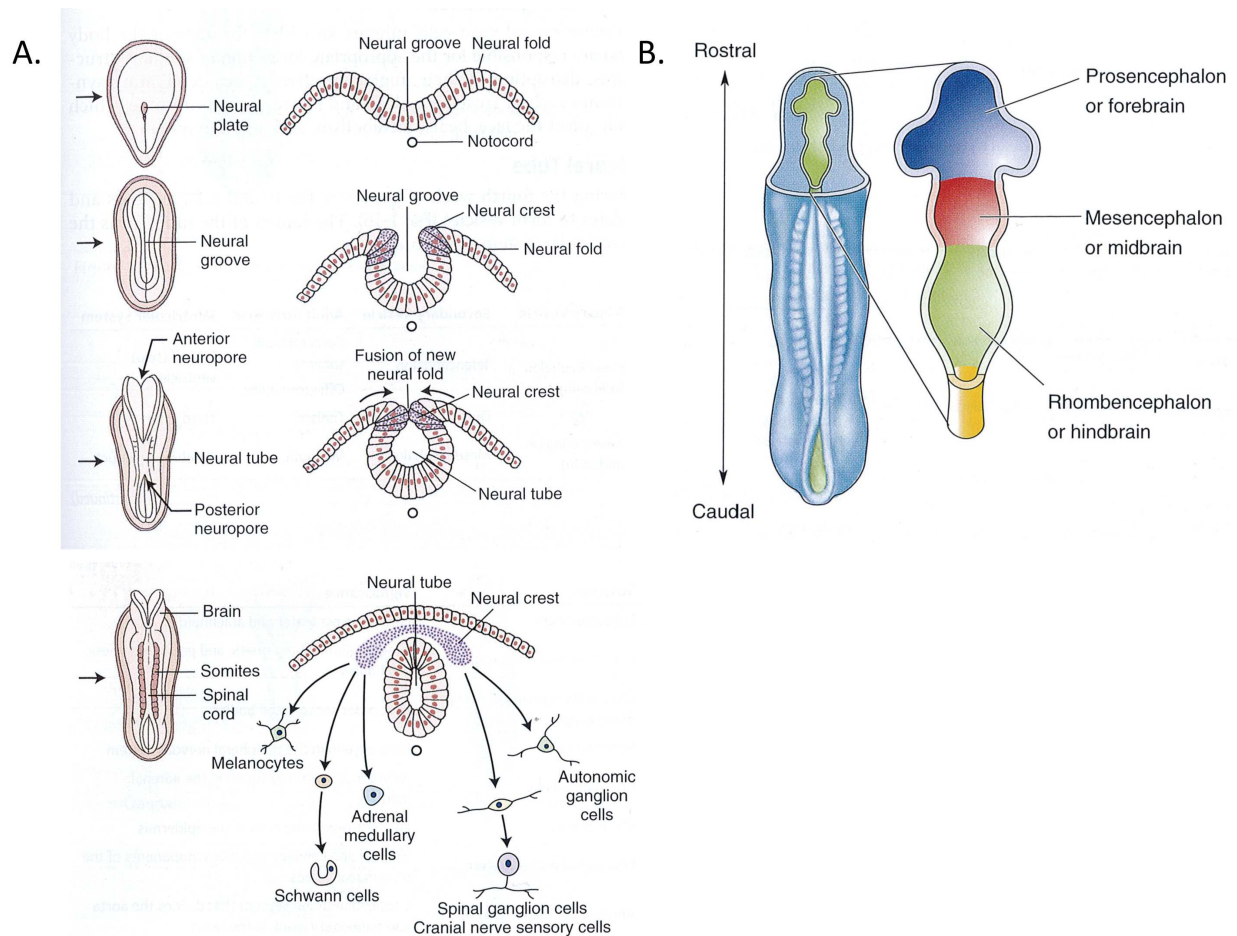


FIGURE 1 : DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

(A) Schéma de la formation du tube neural à partir de la plaque neurale. On observe une invagination de la plaque neurale formant le sillon neural (neural groove). Ce sillon se referme progressivement grâce au rapprochement des crêtes neurales, pour former le tube neural. **(B)** Schéma des vésicules cérébrales primaires. Le prosencéphale se subdivisera par la suite en télencéphale, au niveau duquel se formeront les ventricules latéraux et les hémisphères cérébraux, et en diencéphale qui formera le thalamus, l'hypothalamus et la neurohypophyse. Le mésencéphale constituera une région du tronc cérébral. Le rhombencéphale se subdivisera en métencéphale (à l'origine du cervelet et du pont) et en myélencéphale (à l'origine du bulbe rachidien). (Gould, 2014)

1. Neurogenèse embryonnaire

Au cours de son développement, le système nerveux embryonnaire utilise les mêmes outils que le cerveau mature. Les jeunes neurones sont soumis à un programme intrinsèque de développement mais seront également sensibles à leur environnement comme par exemple les protéines présentes dans la matrice extra-cellulaire, les protéines d'adhésion, ou encore certaines molécules diffusibles (facteurs de croissance, neurotransmetteurs) (Tau and Peterson, 2010). Ainsi les grands systèmes de neurotransmetteurs, tels que les systèmes glutamatergique, GABAergique, sérotoninergique ou dopaminergique, de même que les facteurs de croissance de la famille des neurotrophines (NGF : *Nerve Growth Factor*, BDNF : *Brain Derived Neurotrophic Factor*, NT3 : *Neurotrophin 3*, NT4 : *Neurotrophin 4*) sont des acteurs fondamentaux de la mise en place du système nerveux via les voies de signalisation qu'ils mettent en jeu (Park and Poo, 2013).

La mise en place du système nerveux central se décrit selon trois étapes principales. Lors de la phase pré-migratoire, les précurseurs neuraux se divisent au cours de plusieurs cycles mitotiques au niveau du neuroépithélium germinatif. Les neurones nouvellement formés migrent ensuite vers leur destination respective, c'est la phase migratoire. Puis, au cours de la phase post-migratoire, on observe la maturation du neurone, avec notamment l'élaboration de l'arborisation dendritique et la synaptogenèse. Au cours du développement, certains neurones seront éliminés par apoptose (Tau and Peterson, 2010).

a) La migration neuronale

Différents mouvements de migration coexistent en fonction de la provenance des neurones et de leur destination. Dans le cas de la migration radiale, les neurones migrent perpendiculairement à la surface ventriculaire. A l'inverse, le mouvement de migration tangentielle s'effectue de manière parallèle ou oblique par rapport à la surface ventriculaire (Marín et al., 2010). La migration radiale est nécessaire à la mise en place de structures présentant une organisation laminaire, telles que l'hippocampe ou le cervelet. Les neurones migrant de façon tangentielle forment notamment le striatum ou le bulbe olfactif, ou pourront s'insérer dans les structures laminaires (cortex, hippocampe,

cervelet) participant à la complexification de ces réseaux neuronaux (Marín et al., 2010). Tous les neurones passent par une étape migratoire, mais les trajets empruntés au cours de la migration corticale ont été particulièrement étudiés et illustrent bien la coordination des deux types de migration connus.

Les neurones pyramidaux excitateurs (NP) et les interneurons inhibiteurs (IN) du cortex ne proviennent pas de la même zone germinative et empruntent donc des trajectoires migratoires différentes (Marín et al., 2010). Ces trajectoires sont illustrées dans la *figure 2*.

Les NP sont issus de la zone ventriculaire du pallium dorsal embryonnaire (partie supérieure ou dorsale du télencéphale) et adoptent donc un mouvement de migration radiale pour atteindre leur position finale. Plusieurs groupes de neurones migrent ainsi à tour de rôle selon un schéma « inside-out » selon lequel les neurones les plus précoces constitueront les couches les plus internes du cortex adulte (Dayer et al., 2015). Chez la souris, les premiers NP (NP_p) migrent entre le jour embryonnaire E11.5 et E13.5 pour constituer les couches corticales les plus profondes (V et VI). Les groupes de NP formés plus tardivement (NP_t, entre E14.5 et E16.5) migrent et colonisent les couches corticales plus superficielles (IV à II). Ces neurones se déplacent dans un premier temps vers la zone sous-ventriculaire et la zone intermédiaire (toutes deux au-dessus de la zone ventriculaire). Dans ce déplacement les NP_t possèdent une morphologie multipolaire et émettent plusieurs prolongements à leur surface. Ces neurones vont ensuite acquérir une morphologie bipolaire, caractérisée par un prolongement de tête dans le sens de la migration et un prolongement de traîne dans le sens opposé. Les NP_t s'attachent ensuite à un prolongement, émis par les cellules de la glie radiaire, de la zone ventriculaire (où se situe leur corps cellulaire) à la surface piaie. Cette interaction va permettre de guider le neurone sur sa trajectoire. A la fin de son trajet, le neurone se détache de la cellule gliale radiaire et rejoint sa position finale par un mouvement de translocation somale (Dayer et al., 2015).

Les IN du cortex émergent du sous-pallium (plancher du télencéphale, ou éminence ganglionnaire), et empruntent un schéma migratoire tangentiel pour entrer dans le cortex en formation au niveau des zones sous-ventriculaire, intermédiaire et marginale (couche

la plus externe du cortex en développement). Enfin, pour atteindre leur position finale, les IN migrent de façon radiale et se positionnent dans les différentes couches corticales (Kriegstein and Noctor, 2004).

Même si ces modes migratoires semblent différents ils partagent des mécanismes moléculaires assez similaires. De plus, un même neurone peut alterner entre migration radiale ou tangentielle à différents stades du développement (Marín et al., 2006).

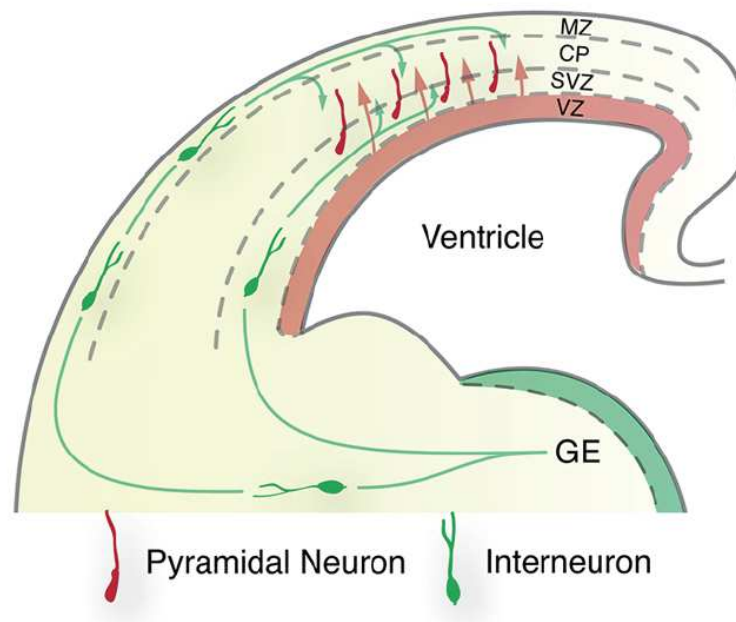


FIGURE 2 : TRAJECTOIRES MIGRATOIRES DANS LE CORTEX EN DEVELOPPEMENT

Les neurones pyramidaux du cortex (en rouge) proviennent de la zone ventriculaire (VZ) du pallium dorsal puis migrent de façon radiale vers la plaque corticale (CP). Les interneurons corticaux (en vert), migrent à partir de l'éminence ganglionnaire (GE). Ces neurones migrent de façon tangentielle jusqu'au cortex pour s'insérer dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone marginale (MZ) du cortex en développement. Ils se positionnent ensuite par migration radiale au niveau des couches corticales. (Dayer et al., 2015)

Au cours de leur déplacement, les neurones en migration adoptent un mouvement en trois temps. Que ce soit dans le cas de la migration radiale ou tangentielle, les neurones émettent d'abord un prolongement « guide » de tête orienté par la composition de leur environnement. La base de ce prolongement va ensuite s'élargir pour y permettre la translocation du noyau. Ce processus est appelé nucléokinèse. Enfin le soma reprend sa forme initiale en rétractant le prolongement de traine, à l'arrière du noyau (Tsai and Gleeson, 2005).

La nucléokinèse

La translocation du noyau dans le prolongement de tête, ou nucléokinèse, est une étape cruciale dans le cheminement des neurones. On observe dans un premier temps la formation d'une boursoflure à la base du prolongement de tête, dans laquelle vont commencer par migrer le centrosome, centre organisateur des microtubules, ainsi que d'autres organites comme les mitochondries, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique rugueux. Dans un second temps le noyau, relié au centrosome par un réseau de microtubules, migre à son tour dans ce renflement (Marín et al., 2010). La fonction des protéines permettant le couplage entre le noyau et les microtubules est donc très importante pour cette étape.

Chez l'humain, un défaut de migration neuronale engendre une malformation cérébrale appelée lissencéphalie, caractérisée par un cortex non stratifié qui ne présente pas de circonvolutions. Deux gènes sont à l'origine de ce phénotype: *LIS1* et *DCX*. Une mutation dans le gène *LIS1* est associée à une lissencéphalie autosomale dominante (Lo Nigro et al., 1997), alors qu'une mutation dans le gène *DCX* est associée à une forme de lissencéphalie liée à l'X chez l'homme et au syndrome du « double-cortex » chez la femme. Ce dernier se caractérise par une hétérotopie neuronale sous-corticale, due à un arrêt du processus de migration, donnant l'impression d'un dédoublement du cortex (Gleeson et al., 1998). Diverses études ont montré que les produits de ces gènes jouaient un rôle important dans le processus de migration neuronale et plus particulièrement dans la nucléokinèse. La protéine Lis1 (*human type 1 Lissencephaly*) est enrichie dans les neurones. Elle s'associe aux microtubules et permet de stabiliser ces derniers. Chez la souris, l'inactivation du gène *LIS1* induit une diminution importante de la vitesse de migration des neurones corticaux (Gambello et al., 2003). Lis1 interagit avec deux autres protéines, la protéine

Ndel1 (ou Nudel) ainsi qu'avec une dynéine cytoplasmique (Smith et al., 2000; Niethammer et al., 2000). Associé aux microtubules, le complexe moteur dynéine est impliqué dans le transport rétrograde. Le complexe Lis1/Ndel1 régule l'activité du complexe de la dynéine. De plus, une perte de fonction de Lis1, de Ndel1 ou de la dynéine engendre un découplage entre le noyau et le centrosome (Shu et al., 2004). Ceci suggère que le complexe Lis1/Ndel1/dynéine joue un rôle important dans la dynamique du réseau de microtubules reliant le noyau au centrosome (Tsai and Gleeson, 2005; Marín et al., 2010). Li-Huei Tsai et Joseph G. Gleeson ont proposé un modèle dans lequel le complexe Lis1/Ndel1/Dynéine, localisé au niveau de la membrane nucléaire, permet au réseau de microtubules périnucléaires de « capturer » le noyau et de le déplacer jusqu'au centrosome via le rôle moteur rétrograde de la dynéine (Tsai and Gleeson, 2005). D'autre part, la doublecortin (Dcx, produit du gène *DCX*), interagit également avec la dynéine et est capable de réverser les déficits de migration observés dans les neurones déficients en Lis1. Ceci suggère donc que Lis1 et Dcx agiraient de concert pour promouvoir le couplage noyau-centrosome au cours de la nucléokinèse (Tanaka et al., 2004a). La découverte de ces mutations dans différents types de lissencéphalies a donc permis de disséquer les mécanismes moléculaires associés à la nucléokinèse, processus nécessaire à la migration neuronale. Ce processus devra donc être finement régulé au cours du développement afin d'assurer le positionnement correct des jeunes neurones.

Facteurs de guidage

Le mouvement des neurones est fortement influencé par des facteurs de guidage, permissifs ou répulsifs, présents dans leur microenvironnement. La combinaison de tels facteurs permet de créer des « routes cérébrales » permettant le déplacement des neurones.

L'expression de la reelin est un exemple de l'importance de ces facteurs chimiotactiques dans le développement cérébral. Le gène codant la reelin est muté chez la souris *reeler* dont le phénotype est caractérisé par une importante désorganisation des structures laminaires corticales, avec des neurones pour la plupart mal orientés. De nombreuses autres régions comme le cervelet, l'hippocampe ou la substance noire, présentent également une altération de leur développement chez ces souris *reeler* (Katsuyama and Terashima, 2009). Au niveau du cortex cérébral, cette protéine est sécrétée par les

cellules de Cajal-Retzius localisées dans la zone marginale du cortex en développement. Elle se fixe sur les récepteurs ApoER2 et VLDLR exprimés par les neurones en migration, provoquant la phosphorylation par les kinases Src et Fyn, de Dab1, protéine adaptatrice qui interagit avec le domaine intracellulaire de ces deux récepteurs. Cette phosphorylation permet d'activer la voie PI3K-Akt-GSK3 β inhibant la phosphorylation de Tau et stabilisant les microtubules au niveau du prolongement de tête des neurones en migration (Katsuyama and Terashima, 2009 ; Beffert et al., 2004). Le gradient d'expression de la reelin permet ainsi d'orienter ces neurones et de guider leur migration.

Le système Semaphorine/Neuropilin est aussi important pour guider les neurones sur leur trajectoire. Les interneurones du cortex et du striatum proviennent de l'éminence ganglionnaire. Les neurones du striatum expriment les sémaphorines 3A et 3F, facteurs répulsifs. L'effet répulsif des sémaphorines de classe 3 est médié par les récepteurs Neuropilin 1/2 exprimés par les neurones migrant vers le cortex. Ce système permet ainsi de séparer les deux populations d'interneurones, favorisant le déplacement des interneurones corticaux vers leur destination finale (Marín et al., 2001).

La migration des neurones dans le cerveau en développement sera donc dépendante des protéines permettant leur mouvement mais également des facteurs environnementaux guidant leur trajectoire. Au cours de la migration des interneurones corticaux, les facteurs de transcription Dlx1/2 répriment la pousse neuritique en inhibant l'expression de protéines du cytosquelette comme MAP2 (*Microtubule Associated Protein 2*) ou PAK3 (*p21 Activated Kinase 3*) (Cobos et al., 2007). Ceci confirme donc la nécessité de l'enchaînement pas à pas de différents programmes de développement dont la chronologie est primordiale. Une fois positionnés, les neurones vont développer leurs prolongements et établir des contacts entre eux.

b) Développement de l'arbre dendritique

Le développement de l'arbre dendritique est également un processus en plusieurs étapes. Alors que l'axone permet de conduire le message nerveux jusqu'à sa cible, les dendrites, plus courtes et plus épaisses, constituent la surface de réception et d'intégration de ces messages. Ainsi le développement de l'axone et des dendrites

permet d'établir la circuiterie cérébrale. L'intervention de facteurs intrinsèques et extrinsèques permettra de mettre en place l'arborisation dendritique notamment en modulant le cytosquelette neuronal comme je l'aborderai dans ce chapitre.

Les cultures primaires de neurones d'hippocampe constituent un modèle couramment utilisé pour étudier le développement neuronal et en particulier le développement des neurites. Dans ce modèle *in vitro*, largement décrit par Gary Banker, on peut distinguer plusieurs stades de développement de l'arborisation dendritique. Dans un premier temps, le neurone sphérique adhère à la surface de culture en quelques heures et émet des lamellipodes à sa surface, c'est le stade 1. Durant le stade 2, de petits neurites mineurs émergent, puis, dans la phase 3, l'un de ces prolongements forme un cône de croissance et s'allonge plus rapidement que les autres pour constituer l'axone. Au cours du stade 4 les dendrites se forment à partir des neurites mineurs observés en stade 2. Enfin, le stade 5 correspond à la synaptogenèse, abordée dans le chapitre suivant (Dotti et al., 1988). Ces différents stades sont illustrés dans la *Figure 3*.

D'après ce modèle on peut donc décrire le développement de l'arbre dendritique en trois étapes principales, une étape d'initiation, avec l'émergence des neurites à la surface cellulaire, une étape d'élongation des dendrites et enfin une phase de complexification du réseau dendritique avec la formation de branchements.

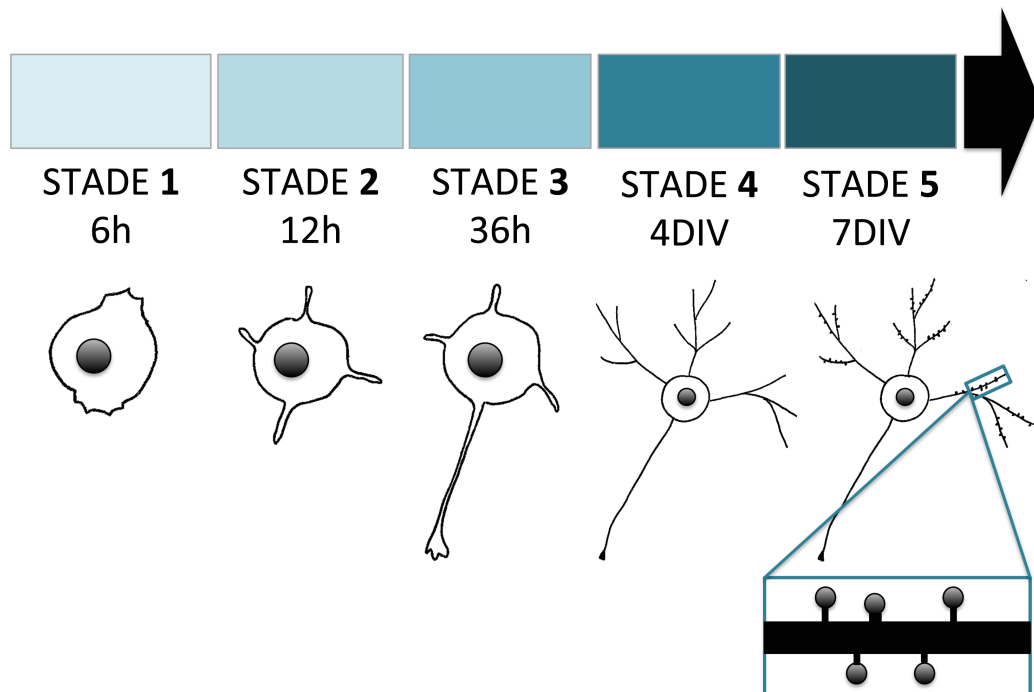


FIGURE 3 : STADES DEVELOPPEMENTAUX DES NEURONES D'HIPPOCAMPE EN CULTURE

*Dans le contexte de la culture primaire de neurones d'hippocampe, le développement de ces derniers suit cinq stades consécutifs. Au cours du stade 1, 6h après la mise en culture, on observe l'apparition de lamellipodes venant déformer la surface cellulaire. Au stade 2, 12h après la mise en culture, de petits prolongements dits « mineurs » se forment. Durant le stade 3, 36h après la mise en culture, l'un de ces prolongements va progressivement se différencier en axone et devenir plus long que les autres. Les autres prolongements formant les dendrites ne s'allongeront qu'au cours du stade 4 (4 jours après la mise en culture ou *Days in vitro*, DIV). Enfin, au cours du stade 5, à 7 DIV, on assiste à la maturation de l'arborisation dendritique avec notamment l'apparition des épines dendritiques.*

Etablissement de la polarité neuronale

Les protéines Par sont fortement impliquées dans la polarisation cellulaire. L'expression des protéines mPar3 et mPar6 participe à la polarisation des neurones hippocampiques de souris en culture. En effet, au cours du stade 3 correspondant au développement de l'axone, les protéines mPar3 et mPar6 se localisent spécifiquement à l'extrémité axonale mais pas au niveau des autres neurites, spécifiant ainsi l'identité axonale (Shi et al., 2003). Ces deux protéines interagissent, par ailleurs, avec les Rho GTPases Cdc42 et Rac1, fortement impliquées dans la dynamique du cytosquelette d'actine et nécessaires à dynamique du cône de croissance axonal. Les protéines Par

étant déterminantes dans la polarisation des cellules épithéliales au cours du développement, on pourrait imaginer que la polarité neuronale soit prédéterminée dès le stade de précurseur au niveau du neuroépithélium germinatif. L'établissement de la polarité neuronale est également fortement corrélé au sens de migration adopté. Dans le cas des neurones corticaux migrant de façon radiale, par exemple, le prolongement de tête deviendra la dendrite apicale, alors que le prolongement de traîne donnera naissance à l'axone (Barnes et al., 2008). Ces résultats suggèrent donc que les phases précoces du développement du neurone (prolifération dans l'épithélium germinatif, migration) seraient importantes pour la mise en place de la polarité neuronale.

Initiation, élongation et complexification des dendrites

La formation des dendrites, tout comme pour l'axone, est fortement dépendante de l'activité du cytosquelette. En effet, que ce soit dans la formation des prolongements migratoires ou dans l'établissement de l'arborisation neuronale, l'actine et les microtubules permettent, respectivement, de générer la force nécessaire à la déformation de la membrane et de stabiliser ces structures nouvellement formées (da Silva and Dotti, 2002). Les Rho GTPases sont bien connues pour orchestrer les mouvements du cytosquelette et notamment pour participer à la morphogenèse neuronale. Les Rho GTPases sont qualifiées d'« interrupteurs moléculaires » oscillant entre une forme active, liée au GTP et une forme inactive, liée au GDP. La liaison du GTP est catalysée par les Rho GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*). A l'inverse, les protéines Rho GAP (*GTPases Activating Proteins*) favorisent l'hydrolyse du GTP par les GTPases, ramenant ainsi ces dernières à leur conformation inactive. Une fois activées, ces protéines interagissent physiquement avec leurs effecteurs modulant ainsi le cytosquelette. Au sein de cette famille, les protéines RhoA, Rac et Cdc42 ont été le plus largement étudiées et leur effet sur le cytosquelette largement décrit (Govek et al., 2005). Alors que RhoA est davantage associée à la formation des fibres de stress (structures composées d'actine et de myosine et impliquées dans la contractilité cellulaire et la rétraction des prolongements), les protéines Cdc42 et Rac1 sont respectivement impliquées dans la formation de filopodes et lamellipodes, moteurs de la formation et de l'élongation de protrusions membranaires. L'activité des Rho GTPases est généralement induite par l'activation de récepteurs membranaires (Récepteurs Tyrosine Kinase, Récepteurs Couplés aux Protéines G). En effet, l'activation des récepteurs tyrosine kinase

des facteurs neurotrophiques (Trk) est associée à la modulation des activités Cdc42/Rac1 et RhoA dans différentes lignées neuronales mais aussi dans les neurones en culture primaire. Dans le cas des neurones hippocampiques en culture, le BDNF stimule la pousse neuritique via l'activation de Cdc42 (Cheung et al., 2007). De même, l'activation de Rac1 et Cdc42 par le NGF induit la pousse neuritique dans les cellules PC12 (Aoki et al., 2004). La stimulation de la croissance neuritique par Rac1 et Cdc42 semble, toutefois, dépendante de leur régulation dans l'espace et le temps (Aoki et al., 2004). Dans la mesure où ces Rho GTPases peuvent être activées par différents récepteurs membranaires, on peut imaginer que la localisation de ces différents récepteurs pourra impacter l'activité des Rho GTPases dans l'espace, mais aussi dans le temps.

Le mécanisme de ramification des neurites pourrait survenir soit au niveau d'un neurite, par l'émergence d'une nouvelle protrusion, ou bien au niveau du cône de croissance lui-même qui pourra se diviser en deux pour donner deux branches différentes. Ce processus, toujours porté par des mouvements du cytosquelette, est fortement soumis à la composition du microenvironnement cellulaire et notamment de l'activité neuronale environnante (Van Aelst and Cline, 2004). En effet, la stimulation d'une dendrite par un bouton axonal favorise la maturation de celle-ci. Les Rho GTPases sont des protéines clés dans l'intégration de ces signaux extracellulaires par le neurone en développement (Van Aelst and Cline, 2004). Il a par exemple été démontré chez le têtard de Xénope (*Xenopus Laevis*) qu'un stimulus visuel favorisait le développement de l'arborisation dendritique au niveau des neurones visuels centraux (Sin et al., 2002). Cet effet, qui nécessite l'activation des récepteurs glutamatergiques NMDA, est perdu en présence des mutants dominant négatifs de Rac1 et Cdc42 alors que l'inhibition de RhoA n'a pas de conséquence, contrairement à sa forme constitutivement active. Ceci établit donc un lien entre la transmission glutamatergique, la formation de l'arborisation dendritique dépendant des Rho GTPases et le rôle antagoniste de Rac1/Cdc42 d'une part et RhoA d'autre part. Le développement de l'arbre dendritique neuronal peut également être induit par la dynamique calcique neuronale dépendant de l'activité. En effet, l'entrée de calcium dans la cellule à la suite d'une dépolarisation, via les canaux calciques voltage-dépendants, provoque la pousse neuritique de neurones corticaux de rat (Redmond et al., 2002). L'activation de la CamKIV (*Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase type IV*) stimule la transcription CREB-dépendante et induit la pousse neuritique, potentiellement en

permettant la synthèse de BDNF.

Ainsi, que ce soit par une action directe sur le cytosquelette ou indirectement par une activité transcriptionnelle, la maturation de l'arborisation dendritique est donc fortement influencée par l'activité du neurone et suggère la co-existence de systèmes de régulation à court et moyen terme. L'activité neuronale est, par ailleurs, essentielle à la stabilisation des structures synaptiques à proprement parlé : les épines dendritiques.

c) Morphogenèse des épines dendritiques

Les épines dendritiques sont le principal support des synapses excitatrices. Ces structures, particulièrement riches en filaments d'actine, permettent d'établir le contact entre deux neurones et supportent ainsi la communication entre ces derniers. Formées au niveau des dendrites, elles représentent la partie post-synaptique recevant l'information transmise par le bouton synaptique axonal, ou pré-synapse. On distingue généralement trois phases dans le développement des épines dendritiques. Dans un premier temps les épines sont formées à partir d'une déformation de la membrane dendritique, puis on observe leur maturation et enfin leur élimination, en fonction de leur activité et de leur stabilité. Structurellement elles sont constituées d'une tête, de taille et de forme variable et d'un cou les reliant à la dendrite, de longueur et de diamètre variable.

Formation des épines dendritiques

Différents modèles de formation des épines ont été proposés. Ceux-ci sont présentés dans la *figure 4*. Selon un premier modèle, c'est la rencontre entre une épine en voie de maturation et une extrémité axonale qui permettra la formation de la synapse. Dans un second modèle, l'extrémité axonale contacte directement une dendrite, induisant ainsi la formation subséquente d'une épine dendritique. Enfin, dans un troisième modèle, l'épine dendritique passe par un stade de filopode très mobile qui, au contact d'un bouton axonal, se stabilise pour former la post-synapse (Yuste and Bonhoeffer, 2004). Au cours de son développement, l'épine dendritique passera donc par différents stades morphologiques. A. Peters et I.R. Kaiserman-Abramof ont classifié les épines dendritiques en trois catégories, encore utilisées aujourd'hui, en fonction de la longueur et de l'épaisseur de leur cou, ainsi que de la largeur de leur tête (Peters and

Kaiserman-Abramof, 1970). On identifie ainsi des épines « stubby » (courtes et avec une tête aussi large que leur cou), « mushroom » (courtes avec une tête de taille importante et un cou plus fin) et « thin » (assez longues avec une petite tête et un cou fin) (figure 4).

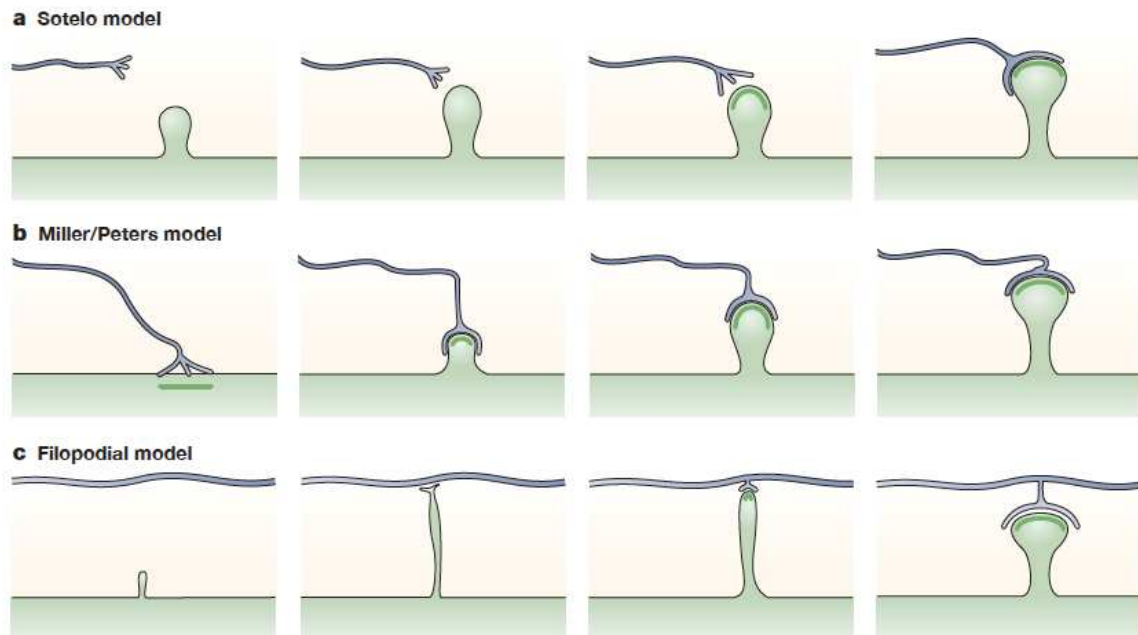


FIGURE 4 : MODELES DE FORMATION D'UNE EPINE DENDRITIQUE

En (a) le modèle de Sotelo selon lequel l'épine dendritique émerge indépendamment de son interaction avec l'axone ; dans le modèle de Miller/Peters (b) c'est la terminaison axonale qui stimule la formation de l'épine dendritique ; enfin en (c) dans le modèle filopodial, le filopode capture l'axone avant de devenir une épine dendritique. (Yuste and Bonhoeffer, 2004)

Comme cela a été observé dans l'hippocampe de rat, la forme de ces épines serait en lien étroit avec leur efficacité dans la transmission du signal. En effet, alors que la transmission synaptique est plus efficace à l'âge adulte qu'au stade post-natal, une évolution de la forme des épines est observée au cours du développement (Harris et al., 1992). Ces résultats suggèrent que la physiologie synaptique est associée à la morphologie des épines dendritiques. Ainsi, les différences structurelles liées à l'âge, au niveau des épines, semblent donc sous-tendre les différences dans l'efficacité de la transmission synaptique. Certaines formes « précoces » d'épines dendritiques seront donc considérées plutôt immatures, en lien avec leur moindre efficacité dans l'intégration

du signal (figure 5). Ainsi, dans l'hippocampe, les filopodes ainsi que les épines « stubby » seront plus importantes au cours des stades de développement, alors que les épines « thin » et « mushroom » constituent les types les plus représentés à l'âge adulte, avec notamment une augmentation de la proportion de « mushroom » (Harris et al., 1992).

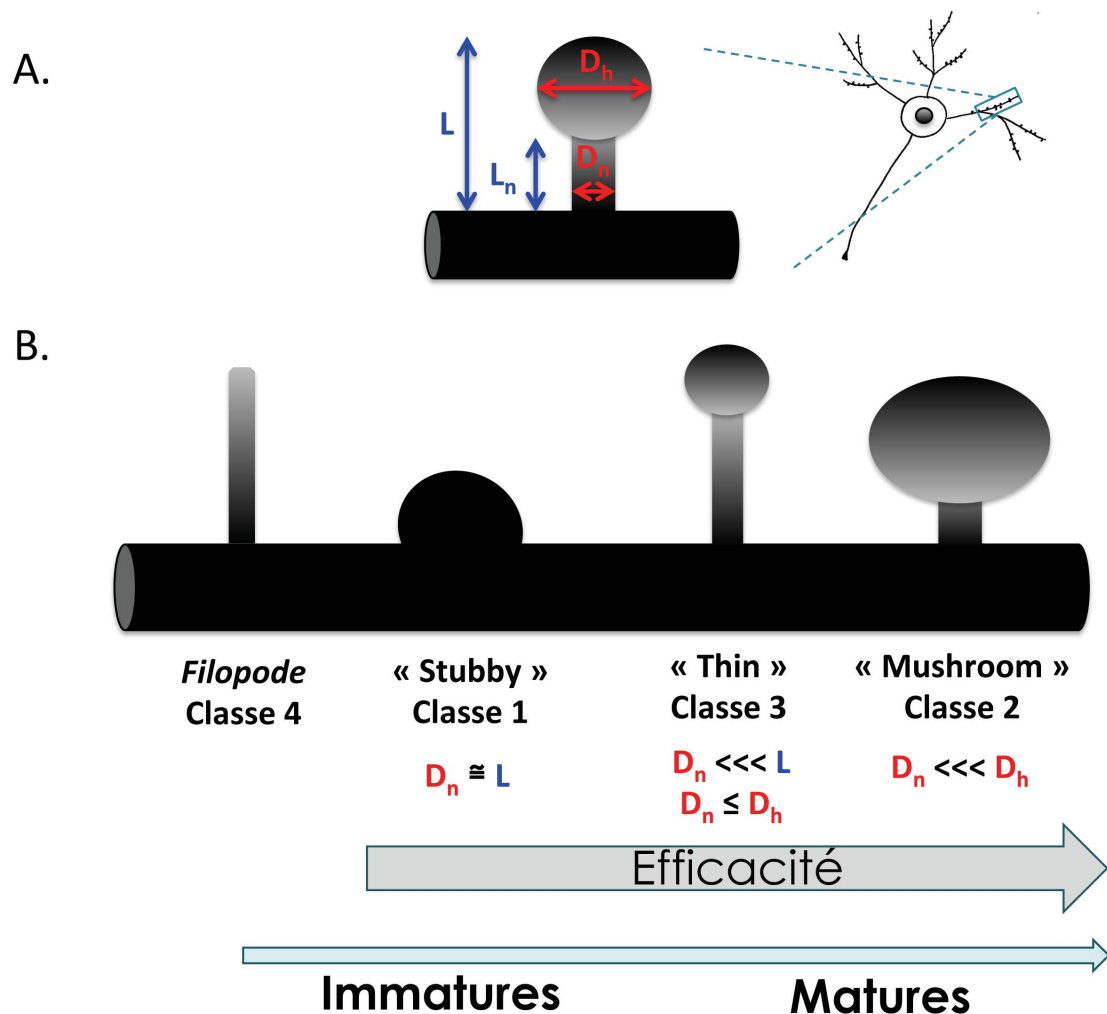


FIGURE 5: CLASSIFICATION DES EPINES DENDRITIQUES

(A) Les épines dendritiques ont été classées en fonction de leur morphologie et plus particulièrement de trois critères, leur longueur totale (L), le diamètre de la tête (D_h) et le diamètre du cou (D_n); L_n : longueur du cou. (B) On obtient ainsi trois types d'épines dendritiques « Stubby », « Thin », « Mushroom », également répertoriées en trois classes (de 1 à 3). Les filopodes (classe 4) ne constituent pas des épines dendritiques à proprement parlé dans la mesure où ils ne supportent pas d'activité synaptique. Il est communément admis que la morphologie de ces épines dendritiques, qui évolue au cours du développement, est en lien étroit avec leur efficacité dans la transmission du message nerveux.

Stabilisation des épines dendritiques

Quel que soit le modèle de formation de l'épine dendritique, le contact avec une terminaison axonale et l'activité neuronale seront très importants pour stabiliser l'épine et donc la synapse. En effet, la libération de glutamate au niveau d'épines immatures induit des changements morphologiques et physiologiques associés à leur maturation (Mattison et al., 2014). De même, Roussignol et coll. ont montré que l'expression de la protéine d'échafaudage post-synaptique Shank3 induisait la formation d'épines dendritiques dans des neurones granulaires du cervelet, originellement exempts d'épines. Cette formation *de novo* d'épines dendritiques fonctionnelles, implique la stabilisation et l'activité des récepteurs glutamatergiques à la surface post-synaptique, confirmant l'implication de l'activité synaptique dans la maturation de la synapse et l'importance d'un complexe protéique post-synaptique dans ce processus (Roussignol et al., 2005). Après la formation des épines dendritiques et leur stabilisation associée à l'activité neuronale, celles-ci subiront une étape d'élimination massive sur le principe de «*use it or loose it* » entraînant donc une disparition des épines inactives non stabilisées. Cette étape est également nécessaire au bon développement des circuits neuronaux. En effet, une densité excessive d'épines dendritiques pourrait être associée à certaines pathologies comme le syndrome du X fragile, pathologie caractérisée par un retard mental souvent associée à un trouble du spectre autistique (TSA) (Kulkarni and Firestein, 2012).

Ainsi dans toutes les étapes de la mise en place des circuits neuronaux, ces derniers évoluent et mûrissent en fonction de processus intrinsèques mais également en réponse à la composition de leur environnement. De ce fait, la présence de protéines membranaires, permettant aux neurones en développement d'interagir avec cet environnement, comme les récepteurs des neurotrophines ou des neurotransmetteurs, sera cruciale et permettra d'adapter la réponse cellulaire, comme la dynamique cytosquelettique ou l'activité transcriptionnelle, aux signaux extracellulaires.

2. Neurogenèse adulte

Bien que la génération de nouveaux neurones semble confinée à une fenêtre développementale précise, l'existence de neuroniches adultes chez l'Homme a été mise en évidence il y a maintenant 17 ans. En effet, l'existence de progéniteurs neuraux a été observée au niveau du gyrus denté de l'hippocampe, mais également au niveau de la couche sous-ventriculaire bordant les ventricules latéraux, adjacente au noyau caudé (Eriksson et al., 1998). Il a, plus récemment, été démontré que, chez l'Homme, les progéniteurs neuraux observés dans la zone sous-ventriculaire adulte, étaient intégrés au niveau du striatum pour devenir des interneurons (Ernst et al., 2014). Chez le rat et la souris, ces neurones rejoignent les bulbes olfactifs, ce qui ne semble pas être le cas chez l'Homme (Ernst et al., 2014). Dans le cas du gyrus denté, les progéniteurs présents dans la zone sous-granulaire migrent dans couche granulaire pour donner, au bout de quelques mois, des cellules granulaires matures, projetant dans l'aire CA3 de l'hippocampe (Aimone et al., 2014). La zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux, ainsi que la zone sous-granulaire du gyrus denté, apparaissent donc comme des neuroniches adultes chez de nombreux mammifères. Les progéniteurs neuraux prolifèrent, se différencient et intègrent les circuits déjà en place. Toutes ces observations montrent donc l'existence d'une neurogenèse adulte, mais est-ce que ces neurones sont soumis aux mêmes systèmes de contrôle qu'au cours du développement embryonnaire ? Et quel est le rôle de ces neurones « néo-formés » ?

a) Contrôle de la neurogenèse adulte

Dans le développement précoce des précurseurs neuraux, certaines voies de signalisation importantes dans le développement embryonnaire, sont également impliquées dans la neurogenèse adulte. C'est par exemple le cas de la voie Shh (*Sonic Hedgehog*). La signalisation associée à Shh, impliquée dans le développement embryonnaire, est très importante au niveau du cil primaire. D'autre part, un blocage post-natal de la formation du cil primaire au niveau des progéniteurs neuraux adultes bloque la neurogenèse, notamment au niveau du gyrus denté, et engendre des déficits mnésiques associés à un dysfonctionnement hippocampique (Amador-Arjona et al., 2011). Ceci confirme l'importance du cil primaire dans la neurogenèse adulte, mais également celle de la neurogenèse adulte dans certains aspects de la cognition. De même, divers facteurs neurotrophiques clés du développement embryonnaire,

conservent un rôle dans la neurogenèse adulte. Le BDNF, par exemple, favorise la survie de nouveaux neurones du gyrus denté (Lee and Son, 2009).

Ces progéniteurs neuraux se trouvent, de fait, entourés de circuits complexes et constituent donc des cibles pour les neurotransmetteurs environnants. Il a par exemple été montré chez la souris, qu'un groupe d'axones sérotoninergiques, provenant des noyaux du raphé rostral, innervait la surface du plexus choroïde, à l'interface entre les ventricules latéraux et la zone de neurogenèse sous-ventriculaire et que l'activité de ces neurones sérotoninergiques induisait la prolifération des progéniteurs neuraux de la zone sous-ventriculaire (Tong et al., 2014). Cette zone serait également innervée par d'autres axones de différentes natures. On observe, par exemple, chez le rat, une innervation dopaminergique, provenant de la substance noire, ayant également un effet positif sur la prolifération des progéniteurs neuraux de la zone sous-ventriculaire. De même, le glutamate serait important pour la survie des jeunes neurones (Young et al., 2011). Enfin, l'activité GABAergique au niveau de la zone de neurogenèse du gyrus denté induit la maturation et l'intégration des jeunes cellules granulaires dans le circuit hippocampique chez la souris (Ge et al., 2006). L'activité cérébrale semble donc moduler, à différentes étapes, le développement des progéniteurs neuraux et des jeunes neurones.

Les mécanismes de maturation des neurones « néo-formés » n'ont pas été clairement décrits. On sait cependant que ces neurones intégrant les circuits pré-existants adoptent une morphologie en tout point similaire aux neurones plus âgés, facilitant ainsi leur intégration. Ceci suggère donc que les mécanismes mis en jeu dans la maturation des neurones à l'âge embryonnaire et à l'âge adulte, doivent être assez similaires. On retrouve notamment une implication importante des Rho GTPases et de la dynamique du cytosquelette (Vadodaria et al., 2013). Toutefois, les neurones « néo-formés » sont entourés de circuits cérébraux matures, ce qui n'est pas le cas des neurones formés au cours de la neurogenèse embryonnaire. Les stimuli perçus par les neurones issus de la neurogenèse adulte ne seront donc pas les mêmes qu'à l'âge embryonnaire.

Tous ces éléments suggèrent donc que la neurogenèse adulte emprunte en partie les mécanismes de la neurogenèse embryonnaire à la différence près que

l'environnement cellulaire dans le cas de la neurogenèse adulte est composé de circuits neuronaux matures. Ces neurones seront donc soumis à différentes stimulations.

b) Rôle des neurones « néo-formés »

Le rôle précis de l'apparition de nouveaux neurones intégrant le cerveau adulte n'a pas clairement pu être établi. En effet, dans le cas des neurones formés au niveau du gyrus denté, des études de corrélation ont pu mettre en évidence un lien entre l'amélioration des tâches cognitives associées à l'hippocampe, comme par exemple dans le test de la piscine de Morris, et la neurogenèse adulte chez la souris (Zhao et al., 2008; Amador-Arjona et al., 2011). De plus, différents stimuli extérieurs modulant la neurogenèse adulte au niveau de la zone sous-granulaire du gyrus denté, impactent les tâches dépendantes de l'hippocampe chez le rat et la souris. L'activité physique, par exemple, stimule la prolifération des progéniteurs neuronaux de la zone sous-granulaire. De même, l'enrichissement du milieu de vie permet de stimuler la différenciation ainsi que la survie de ces nouveaux neurones. Ces stimulations externes améliorent les capacités cognitives telles que la reconnaissance spatiale ou la discrimination de motifs, deux processus liés au circuit hippocampique, probablement par l'intermédiaire de la synthèse de BDNF (Aimone et al., 2014). Bien que ces corrélations aient été établies dans certains paradigmes expérimentaux, leur reproductibilité reste sujette à controverse. Ainsi, le lien entre la neurogenèse adulte et la cognition dépend du modèle expérimental, ainsi que de la tâche comportementale étudiée. Par conséquent, la neurogenèse adulte aurait un rôle restreint à certains aspects de la cognition et qui reste, le plus souvent, à confirmer, notamment chez l'humain.

Chez l'Homme, une altération du processus de neurogenèse adulte dans certaines situations pathologiques, comme les maladies neurodégénératives, a été identifiée. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, par exemple, Ziabreva *et coll.* ont observé une diminution du nombre de progéniteurs neuronaux au niveau de la zone sous-ventriculaire (Ziabreva et al., 2006). Le même type d'observations a été fait dans la maladie de Parkinson, pathologie dans laquelle dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire pourrait avoir un effet négatif sur la neurogenèse sous-ventriculaire (Young et al., 2011). De même, la maladie de Huntington est associée à une diminution du nombre de neurones « néo-formés » (Ernst et al., 2014). Ces pathologies

neurodégénératives étant assez systématiquement associées à des déficits cognitifs importants, on peut supposer que non seulement la dégénérescence des circuits en place, mais également une diminution de la neurogenèse adulte, favorisent l'apparition de ces symptômes.

En somme, le rôle exact de la neurogenèse adulte n'a pas été réellement élucidé et reste hypothétiquement associé à l'évolution des fonctions cognitives au cours de la vie.

B. Pathologies du développement et différenciation neuronale

Une pathologie neurodéveloppementale est caractérisée par une mise en place anormale des réseaux neuronaux au cours du développement, induisant des modifications comportementales post-natales, détectables dès l'enfance ou l'adolescence.

Dans la mesure où la mise en place des circuits neuronaux est une succession d'événements interdépendants, on peut facilement imaginer qu'un dysfonctionnement au cours d'une étape ait des conséquences importantes sur les étapes suivantes. Ainsi, un défaut dans la migration peut impacter la formation de l'arborisation dendritique, elle-même influençant le développement des épines dendritiques qui affecte le fonctionnement cérébral.

1. Pathologies neurodéveloppementales et mutations associées

L'origine neurodéveloppementale de plusieurs pathologies psychiatriques a pu être mise en évidence par la présence de mutations affectant particulièrement les processus du développement neuronal. C'est par exemple le cas des troubles du spectre autistique, ou de la schizophrénie. Dans le cas du syndrome du X fragile, pathologie caractérisée par un retard mental souvent associée à un TSA, une mutation du gène *Fmr1* au niveau du chromosome X est observée. Ce gène code la protéine FMRP qui a récemment été impliquée dans le processus de migration neuronale des neurones pyramidaux du cortex (La Fata et al., 2014). En effet, une invalidation du gène *Fmr1* chez

la souris induit un retard dans la migration de ces neurones modifiant, en conséquence, la connectivité cérébrale. De même, des mutations au niveau du gène codant la protéine Shank3, une protéine d'échaffaudage de la densité post-synaptique, ont été identifiées dans les TSA ou la schizophrénie. Shank3 stabilise un complexe protéique formé par les récepteurs glutamatergiques et l'actine. Alors que Shank3 favorise la formation et la maturation des épines dendritiques par un mécanisme dépendant de l'actine, certaines mutations du gène *SHANK3*, retrouvées chez des patients TSA, affectent cette fonction (Durand et al., 2012). Dans le cas de la schizophrénie une mutation du gène *DISC1*, codant la protéine DISC1 (*Disrupted in Schizophrenia 1*), a été identifiée comme facteur de risque majeur. Des études fonctionnelles ont révélé son importance dans les processus neurodéveloppementaux. En effet, DISC1 joue un rôle clé dans la migration radiale des neurones corticaux via la formation d'un complexe avec deux autres protéines impliquées dans la migration neuronale, Dixdc1 (*DIX domain containing 1*) et Ndel1 (Singh et al., 2010). De plus, le complexe DISC1/Dixdc1 favorise la prolifération des progéniteurs neuronaux, au cours du développement embryonnaire, en régulant la voie Wnt-GSK3 β / β -caténine (Singh et al., 2010). DISC1 participe également à l'intégration des nouveaux neurones dans l'hippocampe adulte et à la morphogenèse de ces neurones, par un mécanisme faisant intervenir la voie de signalisation Akt-mTOR (Duan et al., 2007; Kim et al., 2009).

Les mutations associées aux pathologies neurodéveloppementales comme la schizophrénie ou les TSA, impactent donc les différentes phases du développement neuronal, ainsi que la neurogenèse adulte. De ce fait, ces pathologies s'accompagnent souvent d'une altération de la différenciation neuronale, comme je l'aborderai dans la partie suivante.

2. Différenciation neuronale et pathologies psychiatriques neurodéveloppementales

Des altérations de la différenciation neuronale, que ce soit au niveau des dendrites ou des épines dendritiques, sont observées dans les TSA et la schizophrénie. On retrouve, par exemple, dans le cas de la schizophrénie une altération de l'arborisation dendritique au niveau de l'aire CA3 de l'hippocampe, impactant les circuits cognitifs associés (Kulkarni and Firestein, 2012). De même, une diminution de la densité des épines dendritiques

dans le cortex préfrontal dorso-latéral, a été observée chez les patients schizophrènes. Cette anomalie est corrélée à une diminution de l'ARNm de la Rho GTPase Cdc42, régulateur clé de la morphogenèse des épines dendritiques (Hill et al., 2006). Une altération de la morphogenèse des épines dendritiques est également observée dans le syndrome du X fragile avec une forte augmentation de la densité d'épines longues et fines, associée à une forme immature (Kulkarni and Firestein, 2012). De plus, une anomalie de l'arborisation dendritique est associée à plusieurs pathologies caractérisées par un retard mental. C'est par exemple le cas dans le syndrome de Rett, pathologie neurologique d'origine génétique, parfois associée à des traits autistiques. On observe notamment, chez ces patients, une diminution de l'arborisation dendritique et du nombre d'épines dendritiques dans les neurones pyramidaux du cortex préfrontal et moteur (Kaufmann and Moser, 2000).

Les perturbations de la différenciation neuronale conduisant à des défauts de connectivité cérébrale participent donc à la pathogenèse de différentes pathologies neurodéveloppementales. L'élucidation des mécanismes orchestrant le développement cérébral et la différenciation neuronale est donc nécessaire à la compréhension de la physiopathologie de ces désordres et à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

II. LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE

La sérotonine, ou 5-Hydroxytryptamine (5-HT), est une monoamine biogène synthétisée, à partir du L-tryptophane, par la tryptophane hydroxylase 2 (Tph2) exprimée au niveau central par les neurones sérotoninergiques. Dans les neurones, la sérotonine est stockée dans les vésicules pré-synaptiques via le transporteur vésiculaire spécifique des monoamines (*Vesicular Monoamine Transporter*, VMAT). La sérotonine libérée dans la fente synaptique pourra se fixer à ses récepteurs pré- et post-synaptiques et être ensuite recaptée par le neurone sérotoninergique via un transporteur membranaire spécifique (*Serotonin Transporter*, SERT). Une fois recaptée elle est dégradée par la monoamine oxydase (MAO) en acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA). Ces mécanismes sont illustrés dans la *figure 6*. La découverte de la sérotonine a été faite en plusieurs étapes. D'abord isolée dans les années 30, par Vittorio Erspamer, à partir des cellules entérochromaffines de la muqueuse intestinale de lapin comme une substance capable de provoquer la contraction des muscles lisses du tube digestif, la sérotonine fut ensuite identifiée comme agent vasoconstricteur, en 1948, par l'équipe d'Irvin Page et isolée et caractérisée à partir de sérum bovin en 1949 par Maurice Rapport (Rapport et al., 1948). L'étude de cette molécule a ensuite permis de mettre en évidence ses rôles très variés, comme je l'aborderai par la suite.

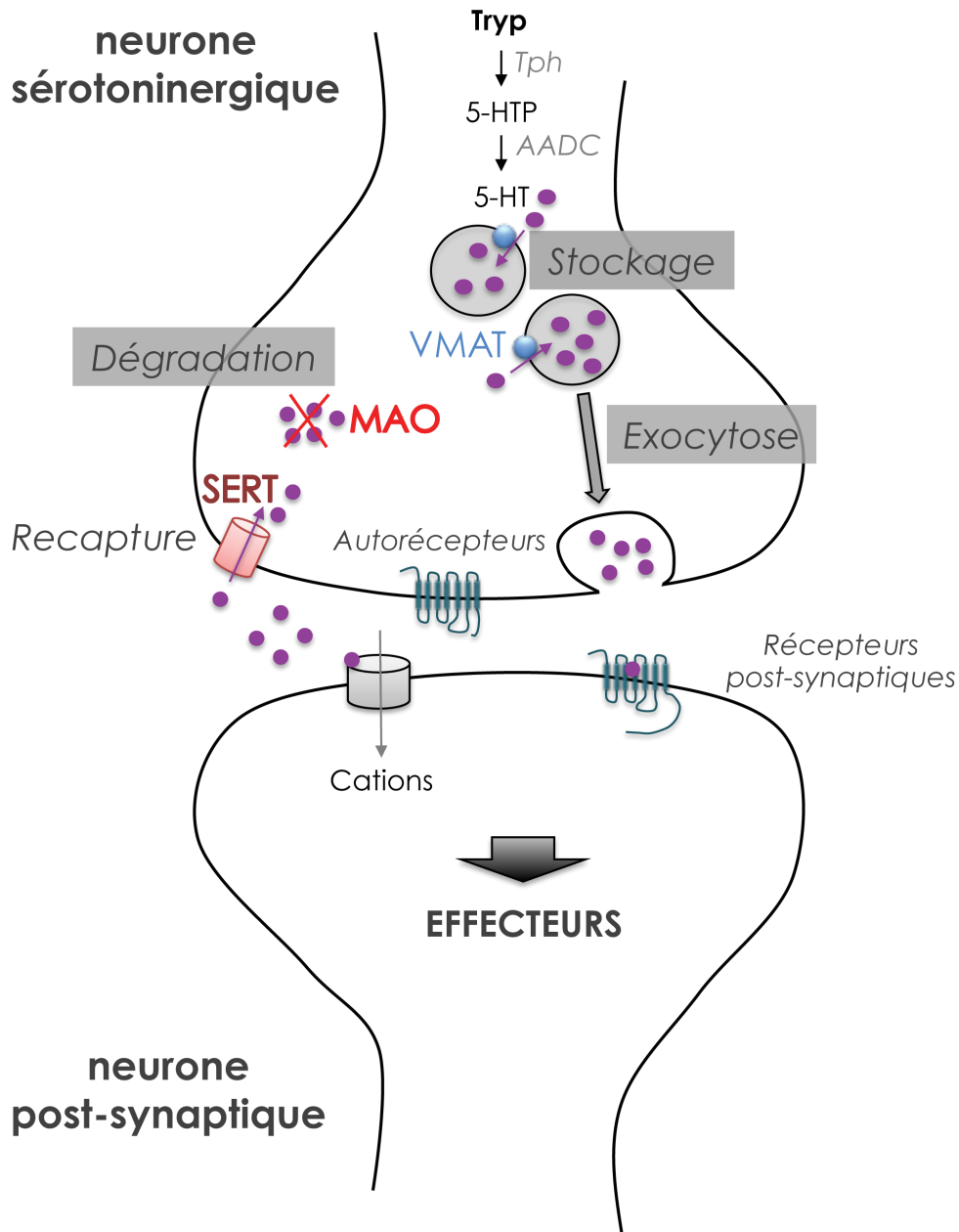


FIGURE 6 : LA SYNAPSE SEROTONINERGIQUE

La sérotonine est synthétisée par les neurones sérotoninergiques à partir du L-tryptophane (Tryp) grâce à la tryptophane hydroxylase (Tph) et à la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC). La sérotonine est ensuite stockée dans des vésicules grâce à un transporteur vésiculaire (VMAT). Une activation du neurone sérotoninergique induit la libération de sérotonine par exocytose dans la fente synaptique. La sérotonine peut alors se lier aux récepteurs postsynaptiques ainsi qu'aux autorécepteurs, qui induisent un rétrocontrôle négatif sur la libération et sur la synthèse de sérotonine. Dans le neurone pré-synaptique, la recapture de la sérotonine par son transporteur (SERT) empêche la persistance de la stimulation. La sérotonine recaptée est dégradée par une monoamine oxydase (MAO).

A. Anatomie et mise en place des circuits sérotoninergiques centraux

1. Circuits sérotoninergiques centraux

Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques sont localisés dans les noyaux du raphé, situés au niveau du tronc cérébral, où ils se rassemblent en plusieurs sous-groupes (B1 à B9). Les neurones des noyaux B1 à B4 forment le raphé caudal projetant dans la moëlle épinière et dans le cervelet. Ceux des noyaux B5 à B9 forment le raphé rostral, subdivisé en raphé dorsal (B6-B7) et médian (B8-B9) et projettent dans l'encéphale (Vitalis et al., 2013). Les projections sérotoninergiques se répartissent très largement au niveau cérébral, conférant ainsi à la sérotonine une fonction neuromodulatrice majeure.

2. Mise en place des circuits sérotoninergiques centraux

Les neurones sérotoninergiques sont formés très précocément au cours du développement embryonnaire, au jour embryonnaire E10 chez la souris et E12 chez le rat (Vitalis et al., 2013). Leur différenciation nécessite l'expression des facteurs de transcription Nkx2.2, Pet-1, ainsi que Lmx1b (Cheng et al., 2003). Pet-1 permet l'expression des protéines définissant l'identité neurochimique des neurones sérotoninergiques, comme la tryptophane hydroxylase, le transporteur SERT ou encore VMAT. Les axones sérotoninergiques se développent un jour après l'apparition des neurones. Ils atteignent le diencéphale au jour embryonnaire E15 chez le rat et le télencéphale deux jours après. Au sein du cortex en développement, les fibres sérotoninergiques se répartissent en deux faisceaux, l'un au niveau superficiel (dans la zone marginale) et l'autre sous la plaque corticale (Kiyasova and Gaspar, 2011).

La mise en place précoce du système sérotoninergique, ainsi que l'étendue de son champ de projection implique que ce système pourra moduler de manière importante non seulement l'activité cérébrale, mais également le développement des circuits neuronaux (Gaspar et al., 2003).

B. Récepteurs sérotoninergiques

La sérotonine est le neurotransmetteur qui exerce ses effets par l'intermédiaire du plus grand nombre de récepteurs, qui sont, pour la majorité des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

1. Structure générale d'un RCPG et transduction du signal

Il existe au moins six familles de RCPG ne présentant aucune similarité de séquence (Bockaert and Pin, 1999). Les récepteurs de la sérotonine appartiennent à la famille 1a des RCPG. Néanmoins, tous les RCPG possèdent un domaine ancestral bien conservé, constitué de sept hélices transmembranaires, appelé domaine heptahélices (heptahelical domain, HD). Les segments transmembranaires (TM, nommés de TM-I à TM-VII) du HD sont reliés par trois boucles intracellulaires (i1, i2 et i3) et trois boucles extracellulaires (e1, e2 et e3), les domaines N- et C-terminaux étant respectivement extra- et intracellulaires. Ces domaines sont de longueurs variables. Les RCPG sont associés à des protéines G hétérotrimériques, composées d'une sous-unité α , liant la guanosine diphosphate (GDP) ou la guanosine triphosphate (GTP) et des sous-unités β et γ (Hall et al., 1999). La reconnaissance sélective de la protéine G par un récepteur dépend de motifs particuliers situés dans les HD, les boucles intracellulaires et l'extrémité carboxy-terminale du récepteur (Bockaert and Pin, 1999). L'activité fonctionnelle de ces récepteurs est régulée par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation. A l'heure actuelle, de nombreux nouveaux concepts ont émergé, rendant l'étude des RCPG d'autant plus complexe. Alors que les premiers modèles décrivant l'activité des RCPG ne proposaient qu'une dynamique d'activation à deux conformations (active/inactive), les études actuelles démontrent l'existence d'un nombre important de conformations actives possibles. Ceci suggère donc que la signalisation impliquant ces récepteurs est beaucoup plus complexe que ce que l'on a pu l'imaginer. D'autre part, on sait désormais qu'en plus des protéines G, un grand nombre de protéines sont capables d'interagir avec les domaines intracellulaires de ces récepteurs (Hall et al., 1999). On peut en effet retrouver des complexes protéiques comprenant des protéines d'échaffaudage, des protéines de signalisation ou des protéines associées au cytosquelette. La zone d'ancrage majeure de ces partenaires intracellulaires ou GIP (*GPCR Interacting Protein*) est le domaine C-terminal de ces récepteurs (Bockaert et al., 2003).

Les RCPG peuvent aussi interagir entre eux pour former des homo- ou hétérodimères. C'est par exemple le cas des récepteurs 5-HT_{2A} et mGluR2 qui forment un complexe fonctionnel modulant la réponse induite par des psychotropes hallucinogènes comme le LSD (*diéthylamide de l'acide lysergique*) (González-Maeso et al., 2008). Tous ces éléments tendent donc à reconsidérer les RCPG comme des plateformes de signalisation autrement nommées « réceptosomes » (Bockaert et al., 2004). L'émergence de ce concept suggère que les RCPG sont capables de réguler des mécanismes aussi divers que la synthèse protéique, l'activité neuronale, ou la dynamique du cytosquelette, de manière très précise, dans l'espace et dans le temps.

2. Classification des récepteurs sérotoninergiques

La sérotonine exerce ses fonctions grâce à des récepteurs qui sont distribués au niveau du système nerveux central et des tissus périphériques. Ces récepteurs sont classés en sept familles (5-HT₁ à 5-HT₇) selon leurs propriétés pharmacologiques, les systèmes de transduction auxquels ils sont couplés, et le degré d'identité de leur séquence (de 40 à 70% dans une même famille) (Hoyer et al., 2002). A l'exception des récepteurs 5-HT₃, qui sont des récepteurs-canaux homopentamériques non sélectifs, perméables aux cations monovalents, notamment aux ions sodium (Na⁺), potassium (K⁺), rubidium (Rb⁺), lithium (Li⁺) et aux ions ammonium (NH₄⁺), les récepteurs de la sérotonine appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Hoyer et al., 2002).

Le couplage des protéines G associé aux différents récepteurs de la sérotonine est illustré en *figure 7*. Au-delà de l'activation de ces voies de signalisation canoniques, la stimulation des récepteurs sérotoninergiques a des effets bien plus complexes. Certains récepteurs, comme les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₇ sont, par exemple, couplés à d'autres protéines G, les protéines G₁₃ et G₁₂ respectivement. Ce couplage aux protéines G₁₃ et G₁₂ est associé à l'activation des Rho GTPases RhoA et Cdc42. De même, le récepteur 5-HT_{2C} module aussi l'activité de l'enzyme NOS (*Nitric Oxide Synthase*) régulant ainsi les voies de signalisation NOS-dépendantes (Millan et al., 2008).

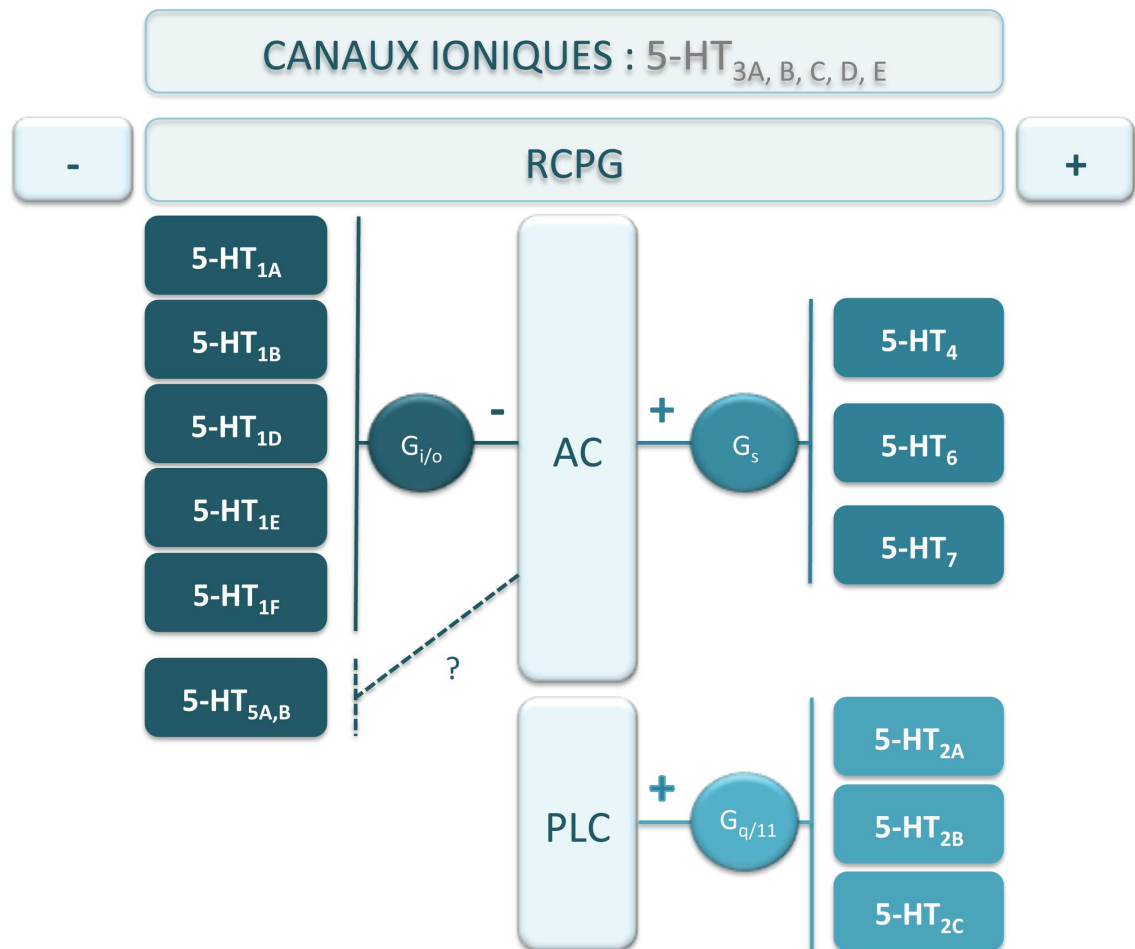


FIGURE 7: TRANSDUCTION DU SIGNAL COUPLE AUX RECEPTEURS DE LA SÉROTONINE

Hormis les récepteurs 5-HT_{3(A-E)} qui sont des récepteurs canaux cationiques, les autres membres de la famille des récepteurs de la sérotonine sont couplés à différentes protéines G. Les récepteurs 5-HT_{1(A,B,D-F)} sont couplés à la protéine G_{i/o} inhibant l'adénylate cyclase (AC) et la production d'AMPc. Les récepteur 5-HT_{5(A,B)} semblent inhiber l'AC mais leur couplage est incertain. Les récepteurs 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇ sont, eux, couplés à la protéine G_s activant l'adénylate cyclase et induisant la production d'AMPc. Enfin, les récepteurs 5-HT_{2(A-C)} sont couplés à la protéine G_{q/11} activant la phospholipase C (PLC) et induisant la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG). (Nichols and Nichols, 2008).

C. Fonctions

1. Fonctions périphériques

Même si la sérotonine apparaît comme un neuromodulateur central clé, il est important de souligner qu'avec 95% de la sérotonine totale libérée en périphérie, de nombreuses fonctions périphériques sont également modulées par cette monoamine.

La 5-HT, au niveau périphérique, est synthétisée grâce à la tryptophane hydroxylase 1 (Tph1), par les neurones sérotoninergiques périphériques et par les cellules entérochromaffines de la muqueuse intestinale. Le rôle de la sérotonine dans le fonctionnement digestif est associé à une modulation du péristaltisme intestinal. Elle est, par ailleurs, impliquée dans le syndrome du côlon irritable, pathologie liée à la motilité gastro-intestinale (Gershon, 2013). La sérotonine agit également comme facteur de croissance permettant le développement et la mise en place du système nerveux entérique. De plus, la sérotonine libérée par les neurones entériques participe au renouvellement de la muqueuse intestinale. La sérotonine sécrétée par les cellules entérochromaffines, quant à elle, favorise le développement et la régénérescence hépatique via les récepteurs 5-HT₂ (Gershon, 2013). Enfin, dans le cadre de sa fonction digestive, la sérotonine sécrétée par les cellules entérochromaffines exerce des effets pro-inflammatoires dans l'intestin, notamment en activant les cellules immunitaires résidentes (Shajib and Khan, 2015).

En plus de son rôle dans l'inflammation gastro-intestinale, la sérotonine a également été impliquée dans la réponse immunitaire et dans le processus général d'inflammation. La sérotonine périphérique est stockée dans les plaquettes grâce à la présence du transporteur SERT à leur membrane. Suite à une activation plaquettaire, la sérotonine peut être libérée par ces dernières et favoriser le recrutement de cellules telles que les éosinophiles, participant au processus inflammatoire (Shajib and Khan, 2015). Ainsi stockée et véhiculée à travers l'organisme par le sang, la sérotonine exerce ses divers effets périphériques. En plus des plaquettes, d'autres cellules impliquées dans l'immunité innée, mais également adaptative, sont en mesure de stocker de la sérotonine. En effet, alors que les lymphocytes B et les mastocytes expriment le transporteur SERT, les macrophages et les lymphocytes T expriment la Tph1, leur

permettant ainsi de synthétiser leur propre stock de sérotonine (Ahern, 2011). De plus, ces cellules expriment divers récepteurs sérotoninergiques (5-HT_{1A/B}, 5-HT_{2A/B}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₇). Dans la réponse immunitaire, la sérotonine contrôle le déplacement des cellules immunitaires par chimiotactisme, l'activité phagocytaire des macrophages et la prolifération des lymphocytes T (Ahern, 2011). De plus, des pathologies inflammatoires telles que l'asthme ou encore l'arthrite rhumatoïde (inflammation synoviale) ont été associées à des niveaux de sérotonine plasmatique élevés (Shajib and Khan, 2015).

La sérotonine tire son nom de son activité de « vasotenseur du sérum » illustrant donc son implication dans la physiologie vasculaire. Comme son nom le suggère, la 5-HT induit une vasoconstriction ou vasorelaxation via les récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A/B}, 5-HT₄ et 5-HT₇ (Côté et al., 2004). D'autre part, du fait de sa localisation plaquettaire, la sérotonine joue un rôle dans l'agrégation plaquettaire, à la suite d'une lésion vasculaire. Elle favorise également la prolifération et la survie des cellules endothéliales permettant ainsi la reconstruction vasculaire (Côté et al., 2004). Enfin, la sérotonine participe au développement cardiaque. Ainsi, chez la souris *Tph1*^{-/-}, invalidée pour le gène codant la tryptophane hydroxylase périphérique, un important dysfonctionnement cardiaque est observé (Côté et al., 2004).

2. Fonctions centrales

En plus de ses nombreux rôles périphériques, la sérotonine apparaît également comme un important régulateur du système nerveux central, où elle contribue à la modulation de nombreux comportements comme l'humeur, l'anxiété, l'agressivité, la prise alimentaire, le comportement sexuel, le cycle veille-sommeil et la cognition (Lucki, 1998).

L'une des classes d'antidépresseurs les plus connue est constituée des inhibiteurs spécifiques de la recapture de sérotonine (ISRS). Bloquant l'activité du transporteur SERT et augmentant ainsi la quantité de 5-HT à la synapse, le rôle de ces molécules illustre l'importance de la 5-HT dans la régulation de l'humeur (Lucki, 1998).

La sérotonine régule également les fonctions cognitives. En fonction du système de neurotransmetteur modulé et/ou de la nature des récepteurs impliqués, la réponse cognitive sera variable. L'impact des différents récepteurs sérotoninergiques sur la

cognition est assez complexe du fait qu'elle dépende fortement de leur couplage et de leur localisation, à l'échelle cérébrale et cellulaire. Les neurones du noyau raphé dorsal modulent la transmission dopaminergique au niveau de plusieurs régions cérébrales comme l'amygdale, le striatum ou le cortex préfrontal (Olvera-Cortés et al., 2008). Il a par exemple été montré que l'activité de la voie dopaminergique mésocorticolimbique (aire tegmentale ventrale, ATV → noyau accumbens → cortex préfrontal) était modulée par la sérotonine via le récepteur 5-HT_{2C}. En effet, l'inhibition de ce récepteur par un antagoniste spécifique augmente la fréquence de décharge des neurones dopaminergiques de l'ATV et la libération de dopamine au niveau du noyau accumbens et du cortex préfrontal. La dérégulation de ce récepteur contribue aux comportements liés à l'addiction (Di Matteo et al., 2001). D'autre part, les neurones sérotoninergiques provenant du noyau raphé médian contrôlent les tâches cognitives faisant intervenir l'hippocampe, comme par exemple la mémoire de travail, ou la mémoire spatiale. La sérotonine exerce notamment un effet inhibiteur sur l'activité hippocampique via le récepteur 5-HT_{1A}. De même, exprimé au niveau des interneurons GABAergiques de l'hippocampe, le récepteur 5-HT₃ inhibe l'induction de la potentialisation à long terme (LTP), communément associée au processus de mémorisation. Les récepteurs 5-HT₄ semblent également jouer un rôle important dans la cognition notamment en modulant l'activité cholinergique au niveau de l'hippocampe ou du cortex préfrontal (Barnes and Sharp, 1999). Enfin, le récepteur 5-HT₆, exprimé dans les régions cérébrales les plus largement impliquées dans la cognition (cortex préfrontal, striatum, hippocampe) joue un rôle central dans les processus cognitifs, comme je l'aborderai dans le chapitre suivant.

La sérotonine exerce également une fonction neuroendocrine importante du fait de sa relation avec l'hypothalamus. En effet, le récepteur 5-HT₇ est fortement exprimé au niveau du noyau supra-chiasmatique hypothalamique où il module l'horloge circadienne (Barnes and Sharp, 1999). De même, une innervation des noyaux médians de l'hypothalamus (noyaux paraventriculaire, ventromédian et suprachiasmatique) par des neurones sérotoninergiques médierait le rôle de la sérotonine dans la prise alimentaire (Leibowitz et al., 1990). Une augmentation de la 5-HT au niveau de ces noyaux est, en effet, associée à une hypophagie notamment via un mécanisme impliquant le récepteur 5-HT_{2C} (Barnes and Sharp, 1999).

3. Fonctions développementales

La sérotonine est également un acteur important du développement embryonnaire. Au cours du développement cérébral, le placenta semble jouer un rôle significatif dans l'apport de sérotonine à l'embryon. En effet la présence d'une tryptophane hydroxylase placentaire catalyserait la synthèse de sérotonine par le placenta, à partir du tryptophane maternel, ce qui permettrait notamment de contrôler la quantité de sérotonine cérébrale pendant le développement des neurones sérotoninergiques (Bonnin et al., 2011).

a) Rôle neurodéveloppemental de la 5-HT

Divers modèles murins d'hyposérotoninergie ont été développés et ont permis de mettre en évidence le rôle développemental de la sérotonine. Dans un premier modèle, une invalidation de la Tph dans les neurones du raphé inhibe la synthèse centrale de sérotonine (souris $Tph2^{-/-}$), dans un second modèle le transporteur vésiculaire de sérotonine VMAT2 est sélectivement aboli dans les cellules exprimant le transporteur SERT, empêchant donc le stockage vésiculaire de 5-HT dans ces neurones (souris $VMAT2^{SERT-Cre}$), enfin dans un troisième modèle, le transporteur VMAT2 est sélectivement invalidé dans les neurones sérotoninergiques du raphé exprimant Pet1 (souris $VMAT2^{Pet1-Cre}$) (Narboux-Nême et al., 2013). Dans les deux premiers modèles, le taux de sérotonine central est réduit de 95% contre 75% chez les souris $VMAT2^{Pet1-Cre}$. Dans chacun de ces modèles, un retard de croissance est observé au cours de la période post-natale précoce. La sévérité du phénotype observé est à mettre en relation avec le niveau de déplétion en sérotonine. Ainsi, les souris $Tph2^{-/-}$ et $VMAT2^{SERT-Cre}$ ont un retard de croissance plus important que les souris $VMAT2^{Pet1-Cre}$, chez lesquelles cette déplétion est plus faible (Narboux-Nême et al., 2013). Bien que ce retard soit par la suite compensé, il confirme l'implication de la sérotonine dans la croissance des nouveau-nés. En plus d'un retard du développement général, un léger retard du développement cérébral post-natal est également observé chez les souris $Tph2^{-/-}$ et $VMAT2^{SERT-Cre}$ (Narboux-Nême et al., 2013). Même si ces observations tendent à montrer un effet modéré de la sérotonine dans le développement, il est fort probable que les altérations engendrées par des variations de la concentration de 5-HT au cours du développement cérébral soient plus subtiles et davantage observables à l'échelle cellulaire. Alors que la déplétion sérotoninergique ne semble pas impacter le développement embryonnaire, mais plutôt le développement

post-natal, une élévation anormale de sérotonine chez l'embryon a un effet délétère sur le développement cortical. En effet, chez des souris KO pour le gène codant le transporteur de la sérotonine, se traduisant par un excès de sérotonine cérébrale, Riccio *et coll.* ont observé une altération dans le positionnement des interneurons GABAergiques du cortex (Riccio et al., 2009). De même, une application de sérotonine à forte concentration réduit la vitesse de migration des neurones pyramidaux de souris par un mécanisme réversible (Riccio et al., 2011). Les mécanismes impliqués dans ce processus seront détaillés ultérieurement. Les altérations observées au niveau cellulaire trouvent, par ailleurs, un écho dans le comportement des souris exposées très jeunes à un excès de sérotonine cérébrale. Une invalidation transitoire du transporteur de la sérotonine au cours du développement cérébral chez la souris (entre P4 et P21) induit une augmentation des comportements anxieux à l'âge adulte, suggérant une altération du fonctionnement émotionnel chez ces souris (Ansorge et al., 2004). Ces résultats sont à mettre en relation avec l'existence d'un polymorphisme sur le promoteur du gène codant le transporteur de la sérotonine chez l'Homme. Cette mutation induit la synthèse d'une forme longue ou courte de ce transporteur, n'ayant pas le même niveau d'expression. Ainsi, les embryons porteurs de la forme courte, associée à une recapture moins efficace de la 5-HT, pourraient être exposés à une concentration extracellulaire excessive de sérotonine au cours de leur développement, induisant un remodelage des circuits neuronaux qui pourrait être à l'origine de leur plus forte susceptibilité à développer des troubles comportementaux (Canli and Lesch, 2007). Un excès de sérotonine sanguine a également été observé chez certains sujets autistes, suggérant, là encore, une rupture de l'homéostasie sérotoninergique (Boylan et al., 2007).

Ces observations confirment donc l'importance du taux de sérotonine au cours du développement pour la formation des circuits cérébraux. La concentration de sérotonine synaptique à l'âge adulte est estimée comme étant de l'ordre du mM pour une concentration de l'ordre du μ M en extra-synaptique (Riccio et al., 2009). Les niveaux de concentration impliqués dans le développement n'ont pas été décrits. On peut toutefois conclure, des différentes études réalisées, que tout ce qui fait varier la quantité de sérotonine disponible au cours du développement, que ce soit des modifications génétiques ou environnementales, a potentiellement un impact sur la mise en place de circuits fonctionnels et de ce fait sur le comportement à l'âge adulte.

b) Récepteurs sérotoninergiques impliqués dans le développement neuronal

Les effets neurodéveloppementaux de la sérotonine sont médiés par ses divers récepteurs et dépendent donc de leur dynamique d'expression, de leur localisation et de la régulation de leur activité fonctionnelle.

Chacune des différentes familles de récepteur sérotoninergique semble jouer un rôle dans le développement neuronal.

Dans la famille des récepteurs 5-HT₁, exprimé tôt au cours du développement embryonnaire, le récepteur 5-HT_{1A} promeut la maturation de l'arbre dendritique dans l'hippocampe, mais également la neurogenèse adulte au niveau des zones sous-granulaire et sous-ventriculaire. Le récepteur 5-HT_{1B}, exprimé au niveau des axones thalamo-corticaux en développement, jouerait un rôle dans leur guidage (Gaspar et al., 2003).

Dans la famille des récepteurs 5-HT₂, le récepteur 5-HT_{2B} favorise la prolifération et la survie cellulaire. Exprimé plus tard au cours du développement embryonnaire, le récepteur 5-HT_{2A} est important pour la différenciation neuronale, mais également pour la maturation dendritique. De plus, il module l'expression du BDNF au niveau du cortex et de l'hippocampe. Le récepteur 5-HT_{2C}, quant à lui, semble plutôt impliqué dans les processus de plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe (Gaspar et al., 2003). Enfin, il a été démontré que l'effet prolifératif des axones sérotoninergiques tapissant le plexus choroïde adulte sur les progéniteurs neuronaux de la zone sous-ventriculaire impliquait les récepteur 5-HT_{2C} (Tong et al., 2014).

Les récepteurs 5-HT₃ participent aussi au développement neuronal. Il a, par exemple, été montré que l'inactivation génétique ou pharmacologique du récepteur 5-HT_{3A} induisait une complexification aberrante de la dendrite apicale des neurones pyramidaux du cortex, via un mécanisme impliquant la reelin (Chameau et al., 2009). Ces résultats suggèrent donc que le récepteur 5-HT_{3A} joue un rôle important dans la maturation de l'arborisation dendritique.

Les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₇ exercent un rôle antagoniste sur le développement de l'arborisation dendritique mettant en jeu un couplage respectif aux protéines G₁₃ et G₁₂

associées à une activation des Rho GTPases RhoA et Cdc42. En effet, il a été démontré qu'en plus d'activer la protéine G_s , le variant d'épissage (a) du récepteur 5-HT₄ était également couplé à la protéine G_{13} et qu'il induisait l'activation de la GTPase RhoA et du mécanisme de transcription dépendant de la séquence SRE (*Serum Responsive Element*), provoquant ainsi une rétraction des neurites, dans une lignée de neuroblastomes ainsi que dans des cultures primaires de neurones hippocampiques (Ponimaskin et al., 2002). A l'inverse, le récepteur 5-HT₇ est couplé à l'activité des Rho GTPases RhoA et Cdc42 et provoque une élongation des neurites dans des neurones hippocampiques en culture (Kvachnina et al., 2005). Le récepteur 5-HT₇ joue également un rôle dans la pousse neuritique via une activation de la voie des MAP kinases ERK1/2 de façon Cdk5-dépendante et une synthèse de protéines (Speranza et al., 2013). En effet, une stimulation du récepteur 5-HT₇ avec un agoniste stimule la voie des MAP kinases ERK1/2 et augmente la longueur des neurites dans des neurones de cortex et de striatum en culture. Cet effet sur la voie ERK1/2 et sur la pousse neuritique est bloqué par la roscovitine (un inhibiteur de Cdk5).

Enfin, l'implication du récepteur 5-HT₆ dans le développement neuronal sera abordée dans le chapitre suivant.

III. LE RECEPTEUR 5-HT₆

A. Gène et protéine

Le récepteur 5-HT₆ a été cloné en 1993 par Ruat *et coll.* à partir du striatum de rat (Ruat et al., 1993). La protéine humaine, comptant 440 acides aminés, est codée par le gène *htr6* sur le chromosome 1. Un homologue de ce gène a également été mis en évidence chez diverses espèces dont le rat et la souris. L'homologue du récepteur 5-HT₆ est exprimé à partir du chromosome 5 chez le rat et 4 chez la souris et donne une protéine plus courte de deux acides aminés chez le rat (Woolley et al., 2004). Au cours du développement cérébral, l'ARNm du récepteur 5-HT₆ est exprimé de manière précoce, à partir du 12^{ème} jour embryonnaire (E12) chez le rat (E10 chez la souris), en parallèle à l'apparition des premiers neurones sérotoninergiques. Son expression se stabilise ensuite à l'âge adulte (Vitalis et al., 2013).

D'un point de vue structural, l'analyse du récepteur de rat a montré qu'il conservait des similitudes avec d'autres récepteurs sérotoninergiques couplés à la protéine G_s, comme la présence d'un aspartate en position 106, important pour la liaison de la sérotonine au récepteur et la présence d'une boucle i3 et d'un domaine C-terminal de grande taille. En N-terminal, une asparagine en position 9 est impliquée dans la glycosylation du récepteur 5-HT₆, et deux cystéines en position 99 et 180 sont probablement responsables de la formation d'un pont disulfure entre les boucles e2 et e3 (Ruat et al., 1993). Le site de liaison de la sérotonine sur le récepteur 5-HT₆ se situe au niveau d'une poche formée par les domaines transmembranaires III, V et VI. Quatre acides aminés, identifiés à partir de la séquence du récepteur 5-HT₆ de rat, seraient particulièrement importants pour la liaison de ce ligand: Trp¹⁰², Asp¹⁰⁶, Ala²⁸⁷ et Asn²⁸⁸ (Boess et al., 1998). Ces différents acides aminés sont conservés chez l'Homme.

Le gène *htr6* humain peut également être à l'origine d'un variant d'épissage du récepteur 5-HT₆. En effet, il existe une forme tronquée du récepteur due à une délétion de 289 paires de bases codant le domaine transmembranaire IV et la boucle i3 du récepteur. Cette délétion entraîne un décalage du cadre de lecture provoquant l'apparition d'un codon STOP prématuré et la synthèse d'une protéine avec trois domaines transmembranaires et un domaine C-terminal court. Surexprimé dans une lignée de

COS-7, ce récepteur tronqué, bien qu'exprimé à la membrane, est incapable de lier la sérotonine et est non fonctionnel. Ce variant d'épissage est inexistant chez le rat ou la souris (Olsen et al., 1999).

Un seul polymorphisme a été détecté sur le gène codant le récepteur 5-HT₆ (C267T) donnant lieu à une modification synonyme d'acides aminés. Bien que de nombreuses études se soient attelées à faire le lien entre ce polymorphisme et la susceptibilité à développer des pathologies comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie ou encore les troubles bipolaires, les résultats se sont avérés très hétérogènes et fortement dépendant de la population étudiée. Ainsi, aucune conclusion claire n'a pu être tirée sur l'implication de ce polymorphisme dans les maladies psychiatriques (Woolley et al., 2004).

B. Localisation

Différentes études ont cherché à caractériser la localisation du récepteur 5-HT₆ chez l'Homme, le rat et la souris.

Chez l'Homme, l'utilisation post-mortem d'un ligand du récepteur 5-HT₆ radiomarqué et de techniques d'immunohistochimie, a permis de mettre en évidence l'expression du récepteur en grande majorité au niveau du striatum, mais aussi dans le cortex préfrontal et l'hippocampe (Marazziti et al., 2012; Marazziti et al., 2013). Ces études ont également permis de montrer que le récepteur 5-HT₆ était exprimé au niveau neuronal dans le striatum, dans les astrocytes et les neurones pyramidaux du cortex, ainsi que dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe. Il semble donc qu'en fonction de la région cérébrale étudiée, le récepteur 5-HT₆ humain soit exprimé dans différents types cellulaires.

L'étude de la localisation du récepteur 5-HT₆ chez le rat a été conduite grâce à différentes approches. L'étude de la répartition de l'ARNm du récepteur par hybridation *in situ* a révélé une expression majoritaire du récepteur dans le striatum, le noyau accumbens et, bien que moins importante, dans le cortex et l'hippocampe (Ward et al., 1995). De plus, l'utilisation d'un antagoniste radiomarqué du récepteur (le SB258585) a permis d'observer l'expression très importante du récepteur 5-HT₆ dans les noyaux caudé-

putamen, le noyau accumbens et, dans une moindre mesure, dans le cortex et l'hippocampe (Roberts et al., 2002). Une très forte expression du récepteur 5-HT₆ a également été observée dans le plexus choroïde de ces rats, suggérant que ce récepteur pourrait médier l'effet des afférences sérotoninergiques choroïdales sur la neurogenèse adulte dans la zone sous-ventriculaire. La localisation du récepteur 5-HT₆ dans le cerveau de rat a également été observée par une approche d'immunohistochimie (*figure 8*). En effet, un anticorps dirigé contre un segment de la partie C-terminale du récepteur 5-HT₆ a permis de mettre en évidence, une fois de plus, l'expression du récepteur 5-HT₆ dans le striatum, le noyau accumbens, les tubercules olfactifs et l'hippocampe. Cette approche a également mis en évidence un gradient d'expression cortical antéro-postérieur, suggérant une expression plus importante du récepteur dans le cortex préfrontal. Elle a aussi permis de montrer la présence du récepteur au niveau du cervelet (Gérard et al., 1997). Ainsi, l'ensemble de ces approches, réalisées sur le cerveau de rat, montre l'expression préférentielle du récepteur 5-HT₆ dans des régions fortement impliquées dans les processus cognitifs comme le striatum, le cortex préfrontal et l'hippocampe. Du point de vue de la localisation cellulaire du récepteur 5-HT₆ chez le rat, il semble être exprimé dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe ou du cortex, ainsi que dans les neurones GABAergiques (Hamon et al., 1999; Woolley et al., 2004). Dans le striatum, le récepteur semble majoritairement exprimé dans les *medium spiny neurons* (MSN), neurones GABAergiques de projection. Concernant sa localisation sub-cellulaire, le récepteur est exprimé préférentiellement dans le compartiment dendritique et on en retrouve une forte quantité au niveau du cil primaire, dans certaines régions comme le striatum (Hamon et al., 1999). Le cil primaire est présent à la surface de nombreuses cellules y compris les neurones. Cette structure concentre plusieurs RCPG jouant un rôle important dans le développement. Le trafic de ces récepteurs au niveau des cils primaire est primordial et plusieurs mutations dans les gènes codant des protéines impliquées dans ce processus ont été associées à une altération du développement cérébral. Le cil primaire apparaît donc comme un compartiment cellulaire important pour le développement cérébral (Lee and Gleeson, 2010).

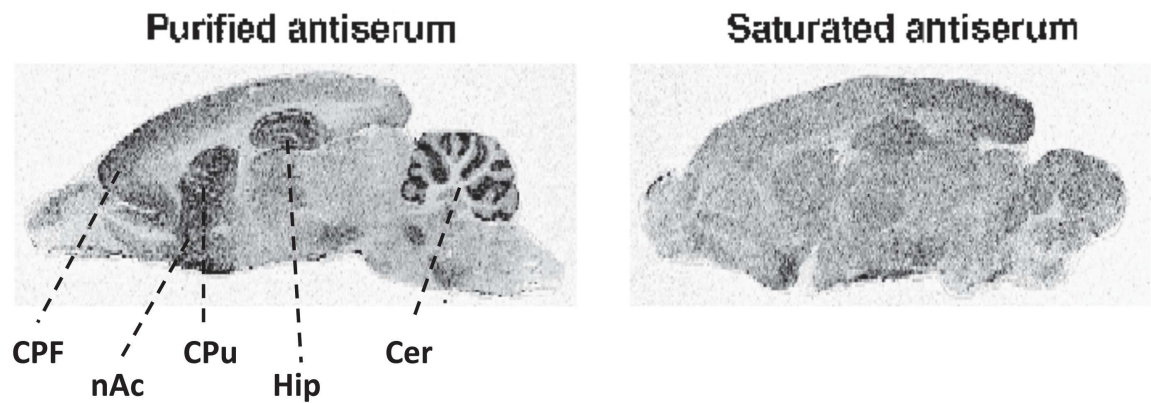


FIGURE 8 : IMMUNOLOCALISATION DU RECEPTEUR 5-HT₆ DANS LE CERVEAU DE RAT

Immunoradiogrammes sur tranches sagittales de cerveaux de rats, obtenus après incubation, à gauche, en présence d'un anticorps reconnaissant le récepteur 5HT₆ et à droite en présence du même anticorps préalablement saturé. On distingue l'expression du récepteur dans le cortex préfrontal (CPF), le noyau accumbens (nAc), les noyaux caudé-putamen (CPu), l'hippocampe (Hip) et le cervelet (Cer). Adapté de (Gérard et al., 1997).

Les études portant sur le récepteur 5-HT₆ chez la souris sont moins nombreuses. Hirst et coll. ont montré, en utilisant le SB258585 radiomarqué, que le niveau d'expression du récepteur 5-HT₆ dans le cerveau de souris était moins important que chez le rat et l'Homme. Le niveau d'ARNm codant le récepteur est également moindre chez la souris, comparé aux deux autres espèces étudiées (Hirst et al., 2003). Cependant d'autres études, utilisant pour modèle la souris, ont pu mettre en évidence un enrichissement du récepteur au niveau du cortex, du striatum et du noyau accumbens, de manière cohérente avec ce qui a précédemment été établi chez l'Homme et le rat. Le niveau d'expression général du récepteur 5-HT₆ semble toutefois moins important chez la souris (Svenningsson et al., 2007). L'expression du récepteur 5-HT₆ murin a notamment été observée dans les neurones pyramidaux et les interneurons du cortex, au cours de la phase migratoire (Riccio et al., 2009; Riccio et al., 2011). La différence de profil pharmacologique entre le récepteur de rat, d'Homme et de souris est également soulignée dans l'étude de Hirst et coll. Alors que certains antagonistes du récepteur ont une forte affinité pour les récepteurs de rat et d'humain, celle-ci semble perdue dans le cas de la souris. Ce fait n'est toutefois pas une généralité et il est important de nuancer ces observations. Dans cette étude, seul un ligand parmi la dizaine testée, ne se lie plus au

récepteur. En revanche, de nombreux ligands ont des affinités voisines pour les récepteurs d'Homme, de rat et de souris, comme par exemple le SB271046 dont le pKi varie de 9,1 chez l'Homme et le rat à 8,9 chez la souris. En somme, l'utilisation de la souris comme modèle d'étude dans le cas du récepteur 5-HT₆ est pertinent, il faudra cependant s'assurer de l'expression du récepteur dans les régions étudiées ainsi que du profil pharmacologique des ligands utilisés.

En conclusion, le récepteur 5-HT₆ est exprimé quasiment exclusivement dans le système nerveux central, au niveau de régions jouant un rôle essentiel dans les processus cognitifs. Sa localisation cellulaire et sub-cellulaire suggère une implication du récepteur dans la modulation de la neurotransmission mais également dans le développement neuronal. Le récepteur 5-HT₆ représente donc un candidat sérieux au contrôle des fonctions cognitives, d'une part, en modulant l'activité de régions telles que l'hippocampe, le striatum et le cortex préfrontal et, d'autre part, en contribuant au développement des circuits au sein de ces structures.

C. Couplage et signalisation

Depuis sa découverte, les mécanismes de signalisation associés au récepteur 5-HT₆ ont fait l'objet de nombreuses études. Ainsi, en plus de la voie G_s « classique », d'autres voies de signalisation ont pu être mises en évidence, comme cela est illustré dans la *figure 9*.

Le récepteur 5-HT₆ interagit avec la protéine G_s par l'intermédiaire sa troisième boucle intracellulaire (Kang et al., 2005). L'activation de la protéine G_s par le récepteur induit la production d'AMPc, activant ainsi la kinase PKA (*Protein Kinase A*). La PKA phosphoryle le facteur de transcription CREB (*cAMP Responding Element Bound*) permettant l'expression de gènes dépendant du motif CRE (*cAMP Responding Element*). Plusieurs mutants associés à une activation variable de la protéine G_s ont été générés, participant à la compréhension des mécanismes de signalisation du récepteur impliquant cette voie. Alors que la boucle i3 est importante pour l'interaction avec la protéine G_s, le domaine TMII serait important pour l'activation de cette protéine G. En effet, une triple mutation au niveau des acides aminés 69, 70 et 72, du domaine TMII, empêche l'activation de la protéine G_s. Ainsi, le triple mutant 5-HT₆ (F⁶⁹L/T⁷⁰I/D⁷²A), ou mutant 5-HT₆-G_sDead, ne

stimule plus la production d'AMPC (Zhang et al., 2006). Alors que l'implication de ces résidus dans la liaison du ligand est discutable, l'absence d'activation de la protéine G_s suggèrerait plutôt leur implication dans les changements conformationnels du récepteur, responsables de l'activation de la protéine G_s . De la même façon, une stratégie de mutagenèse a permis de mettre en évidence une séquence critique pour l'activité constitutive de récepteur vis-à-vis de la voie G_s . Le motif BBXXB (B : résidu basique, X : résidu non-basique), module l'activité constitutive des RCPG. Ce motif est présent dans la boucle i3 du récepteur 5-HT₆ et conservé chez l'Homme, le rat et la souris (Woolley et al., 2004). L'introduction de mutations ponctuelles au niveau de ce motif, dans le récepteur 5-HT₆ murin, inhibe l'activité constitutive de ce dernier, dans un système d'expression hétérologue, confirmant donc l'importance de cette séquence dans l'activité constitutive du récepteur (Kohen et al., 2001).

Une interaction entre le récepteur 5-HT₆ et la Src kinase Fyn a également été décrite par Yun *et coll.* (Yun et al., 2007). La protéine Fyn interagit avec le domaine C-terminal du récepteur 5-HT₆ par l'intermédiaire de son domaine SH3. La surexpression de Fyn dans un système d'expression hétérologue, augmente l'adressage membranaire et l'activité du récepteur 5-HT₆, alors qu'une activation du récepteur induit l'autophosphorylation de Fyn au niveau de la Tyr⁴²⁰, augmentant ainsi son activité kinase. La voie 5-HT₆/Fyn est associée à l'activation de la voie des MAP Kinases ERK1/2 (Yun et al., 2007).

La même équipe a mis en évidence, quelques années plus tard, une interaction entre la protéine Jab-1 (*Jun Activation domain Binding protein-1*) et la boucle i3 ainsi que le domaine C-terminal du récepteur 5-HT₆ (Yun et al., 2010). Une action réciproque entre ces deux protéines a été décrite. Ainsi, l'expression de Jab-1 régule non seulement l'activité du récepteur mais également son adressage à la membrane, alors que l'activation du récepteur induit la translocation de Jab-1 dans le noyau, son association avec le facteur de transcription c-Jun et une augmentation de la phosphorylation de ce dernier. La voie 5-HT₆/Jab-1 permettrait donc de réguler l'activité transcriptionnelle de c-Jun. De plus, des conditions hypoxiques provoquent une augmentation de l'expression de 5-HT₆ et Jab-1, un processus qui est à l'origine d'un effet neuroprotecteur (Yun et al., 2010).

Kim *et coll.* ont aussi récemment identifié une interaction entre le récepteur 5-HT₆ et la protéine MAP1b (*Microtubule Associated Protein 1b*). MAP1b interagit avec le domaine C-terminal du récepteur via sa sous-unité légère LC1 (*Light Chain 1*). Cette interaction permettrait notamment d'augmenter l'expression membranaire du récepteur et de diminuer son internalisation activité-dépendante. Cette interaction induit donc une augmentation de la production d'AMPc et l'activation de la voie ERK1/2, médiée par le récepteur 5-HT₆ (Kim et al., 2014).

Enfin, grâce à une approche protéomique, notre équipe a récemment mis en évidence une interaction entre différents membres du complexe mTORC1 (*mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) et le récepteur 5-HT₆ (Meffre et al., 2012). L'étude fonctionnelle qui a suivi a montré que l'activation des récepteurs 5-HT₆ stimulait la voie mTOR non seulement *in vitro*, mais aussi dans le cortex préfrontal de rat. Cette activation dépend de l'association entre le récepteur et mTOR et fait intervenir la voie PI3K-Akt et la petite protéine G Rheb. De plus, l'administration de rapamycine à des rats reverse les déficits cognitifs induits par l'injection d'agonistes 5-HT₆, démontrant l'implication de la voie mTOR dans la régulation des fonctions cognitives par le récepteur. De même, l'activation prolongée de mTOR, dépendante du récepteur 5-HT₆ dans des modèles développementaux de schizophrénie (isolement social après sevrage ou traitement chronique à la phencyclidine au stade néonatal), est associée à des déficits cognitifs réversés par la rapamycine mais aussi par un antagoniste spécifique du récepteur 5-HT₆. Cette étude a donc permis d'identifier une nouvelle voie de signalisation déclenchée par le récepteur 5-HT₆ et a démontré l'implication du récepteur dans la régulation des fonctions cognitives.

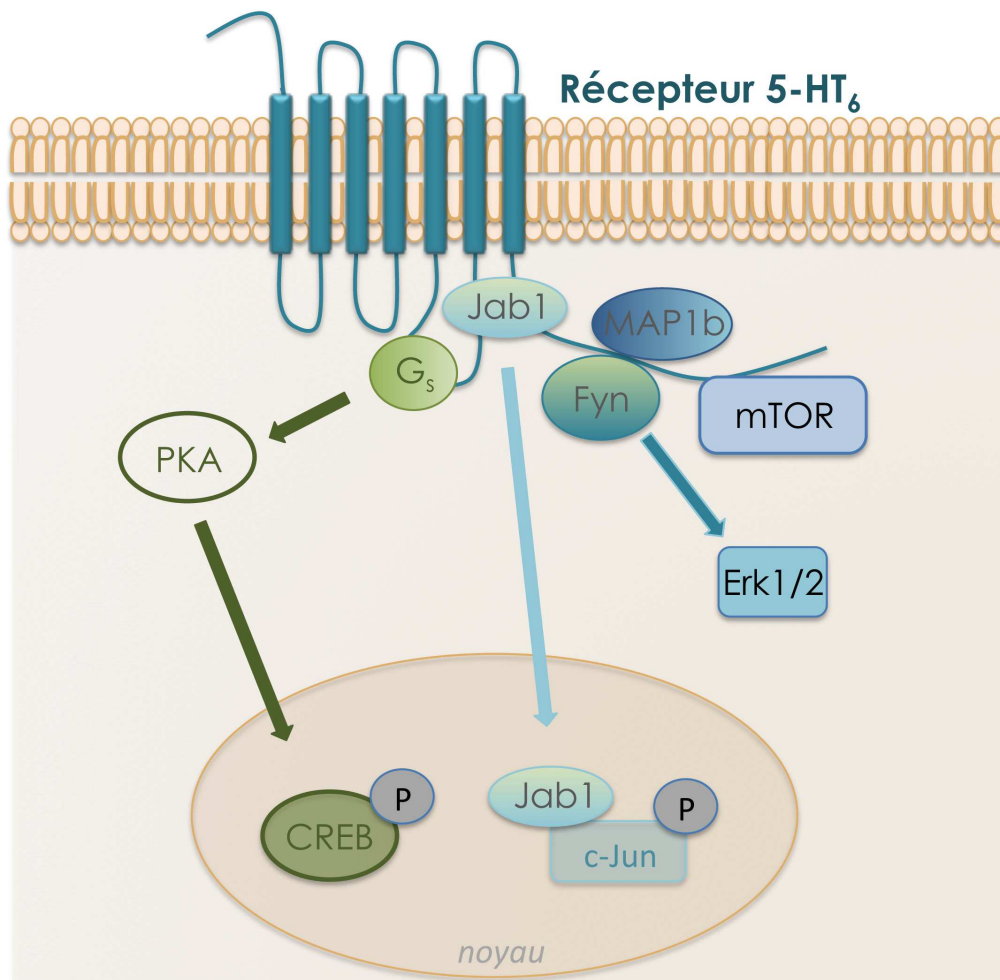


FIGURE 9 : VOIES DE SIGNALISATION ASSOCIEES AU RECEPTEUR 5-HT₆

Le récepteur 5-HT₆ est associé à plusieurs partenaires intracellulaires médiant différentes voies de signalisation. La voie G_s permet l'activation du facteur de transcription CREB par l'intermédiaire de la PKA. L'activation du récepteur induit une translocation de la protéine Jab1 et l'activation subséquente de c-Jun. Jab1, Fyn et MAP1b augmente l'expression membranaire du récepteur. Fyn induit également l'activation de la voie des MAP Kinases ERK1/2. Enfin, le récepteur interagit avec plusieurs membres du complexe mTORC1, dont mTOR. L'activation de la voie mTOR par les agonistes du récepteur passe par la voie PI3K-Akt.

D. Fonctions

1. Contrôle de la prise alimentaire

Le mutant G_s Dead a été utilisé pour générer une souris KI (*Knock In*) dans laquelle le récepteur 5-HT₆ est incapable d'activer la protéine G_s . La souris 5-HT₆- G_s Dead a un développement normal et, a priori, pas de phénotype comportemental particulier. En revanche, l'étude du comportement alimentaire de cette souris a montré qu'elle avait une tendance à l'hypophagie lorsqu'elle était soumise à un régime riche en graisses. De plus, cette souris est plus résistante à la prise de poids induite par ce régime, comparé à des souris sauvages (Frassetto et al., 2008). Ces résultats suggèrent donc une implication du récepteur 5-HT₆ et de la voie G_s associée, dans la prise alimentaire. De la même façon, l'inhibition du récepteur par injection d'un oligonucléotide antisens ou d'un antagoniste (le Ro-046790) induit une diminution de la prise alimentaire et de la masse corporelle chez le rat (Woolley et al., 2001).

La régulation de la prise alimentaire par le récepteur 5-HT₆ s'expliquerait par l'expression du récepteur au niveau des neurones GABAergiques du noyau arqué de l'hypothalamus. L'inhibition du récepteur 5-HT₆ exprimé par les neurones GABAergiques du noyau arqué provoquerait une activation des neurones à POMC (*Pro-opiomélanocortine*). Ceci favoriserait la libération du peptide anorexigène α -MSH (*α -Melanocyte Stimulating Hormone*) par ces derniers, diminuant, en conséquence, la prise alimentaire (Woolley et al., 2004).

2. Modulation de la neurotransmission

a) Neurotransmission cholinergique

Des expériences de microdialyse chez le rat, ont mis en évidence qu'une administration orale d'un antagoniste compétitif du récepteur 5-HT₆ doublait la concentration préfrontale en acétylcholine (ACh) jusqu'à deux heures après l'administration. Le fait que le blocage du récepteur induise une augmentation dans la libération d'ACh au niveau du cortex préfrontal, suggère que celui-ci exerce une inhibition de la transmission cholinergique (Riemer et al., 2003). L'augmentation de la libération d'ACh dans le cortex préfrontal, induite par les antagonistes du récepteur 5-HT₆, a, de plus, été associée à une amélioration des performances dans le test d'évitement passif

(Riemer et al., 2003). Ceci implique donc, non seulement que le récepteur module la neurotransmission cholinergique au niveau du cortex préfrontal, mais également qu'il module les fonctions cognitives dans des paradigmes expérimentaux dans lesquels celle-ci est altérée. L'effet bénéfique des antagonistes du récepteur 5-HT₆, dans les déficits cognitifs induit par une altération de la transmission cholinergique, a été confirmé dans d'autres études. Dans un modèle de souris traitées à la scopolamine (un antagoniste des récepteurs cholinergiques muscariniques), des altérations cognitives sont observées, comme par exemple dans le test de reconnaissance d'objet. Le Ro-4368554 (un antagoniste du récepteur 5-HT₆) améliore de manière significative les déficits observés dans ce modèle (Lieben et al., 2005).

Ainsi, le récepteur 5-HT₆ pourrait être une cible intéressante dans le contrôle des fonctions cognitives impliquant le système cholinergique.

b) Neurotransmission glutamatergique

Des études de microdialyses chez le rat ont également montré que le récepteur 5-HT₆ modulait la neurotransmission glutamatergique. En effet, Dawson *et coll.* ont mis en évidence une augmentation de la libération de glutamate au niveau du cortex frontal après traitement aigu avec un antagoniste du récepteur (le SB271046) alors que ce traitement n'impacte pas le niveau extracellulaire de monoamines dans le cortex et le striatum (Dawson et al., 2000). Ces résultats ont été confirmés dans une seconde étude réalisée par la même équipe, ajoutant cette fois aux régions déjà étudiées, l'hippocampe et le noyau accumbens. Ainsi, alors que le traitement avec le SB271046 n'induit pas de variations dans la concentration extracellulaire de monoamines au niveau de l'hippocampe dorsal et du noyau accumbens, ce dernier provoque une augmentation significative de la libération de glutamate dans l'hippocampe, suggérant donc l'existence d'une inhibition tonique de la libération de glutamate dans cette structure, levée par l'inhibition du récepteur 5-HT₆ (Dawson et al., 2001). Dans l'hippocampe, le traitement avec un agoniste du récepteur 5-HT₆ (le WAY181187) induit une diminution de la libération de glutamate, confirmant l'effet répresseur exercé par le récepteur sur la transmission glutamatergique (Schechter et al., 2008).

c) Neurotransmission monoaminergique

Comme cela a été précédemment évoqué, chez le rat adulte, aucun changement dans le niveau extracellulaire basal en dopamine (DA), sérotonine ou noradrénaline (NA) n'a été observé dans le cortex, le striatum, l'hippocampe ou le noyau accumbens à la suite d'une inhibition aigue du récepteur 5-HT₆ (Dawson et al., 2000). A l'inverse, une diminution de la libération de DA a été observée dans le cortex frontal, l'amygdale ainsi que dans le striatum, après activation du récepteur 5-HT₆ par un traitement aigu avec un agoniste (Schechter et al., 2008). La stimulation du récepteur induit également une diminution de la quantité de DA et de 5-HT dans le cortex frontal dorsolatéral. Ces effets sur la libération de 5-HT et de DA sont inhibés par un traitement avec un antagoniste des récepteurs GABA_A (la bicuculline). Ces résultats suggèrent que l'inhibition la libération de 5-HT et de DA passe par une activation du récepteur GABA_A (Schechter et al., 2008). Alors qu'une inhibition du récepteur 5-HT₆ ne semble pas avoir d'effet sur la neurotransmission monoaminergique, une stimulation de celui-ci induit une diminution de la quantité extracellulaire de dopamine et de sérotonine, suggérant donc que ce dernier exerce un contrôle négatif sur la neurotransmission monoaminergique.

d) Neurotransmission GABAergique

Une stimulation par des agonistes du récepteur 5-HT₆ induit une augmentation de la libération de GABA. En effet, deux agonistes du récepteur récemment décrits, le WAY181187 et le WAY208466, augmentent la transmission GABAergique dans plusieurs régions cérébrales chez le rat. Schechter *et coll.* ont montré que la stimulation du récepteur avec le WAY181187, induisait une augmentation de la libération de GABA dans le cortex frontal dorsolatéral, associée à la diminution de la quantité basale de sérotonine et de dopamine extracellulaires précédemment mentionnée. De la même façon, une stimulation du récepteur 5-HT₆ dans le striatum, l'hippocampe et l'amygdale induit une augmentation importante de la libération de GABA dans ces régions (Schechter et al., 2008). Le WAY181187 provoque également une augmentation des courants inhibiteurs dans l'aire CA1 de l'hippocampe de rat, parallèlement à une inhibition du processus de LTP (West et al., 2009).

Ainsi, d'après les différentes études réalisées, le récepteur 5-HT₆ semble contrôler directement la libération de GABA et indirectement la libération de glutamate, de dopamine, de sérotonine et d'acétylcholine. L'expression du récepteur sur les neurones GABAergiques est probablement à l'origine de ces observations, comme cela est schématisé en *figure 10*. Cependant, le récepteur 5-HT₆ étant également exprimé sur les neurones pyramidaux excitateurs du cortex et de l'hippocampe, la régulation de la neurotransmission par ce dernier doit être plus complexe. Le récepteur 5-HT₆ semble donc être un acteur clé de la modulation de la neurotransmission GABAergique et glutamatergique dans différentes régions contrôlant les fonctions cognitives.

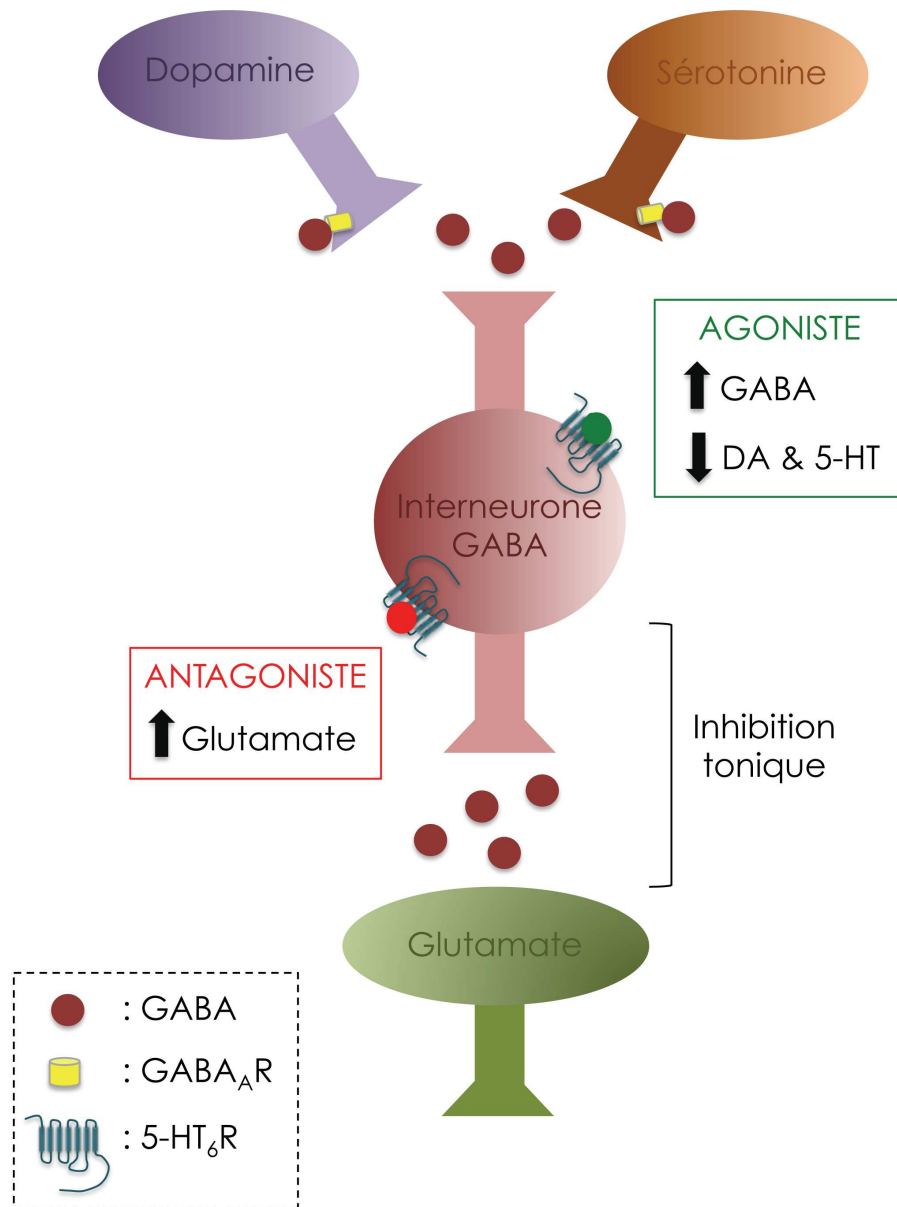


FIGURE 10: CONTROLE DE LA NEUROTRANSMISSION PAR LE 5-HT₆R EXPRIME SUR LES NEURONES GABAERGIQUES

L'inhibition tonique exercée par les neurones GABAergiques, exprimant le récepteur 5-HT₆, sur les neurones glutamatergiques du cortex et de l'hippocampe est levée par un traitement avec un antagoniste du récepteur 5-HT₆. D'autre part, la stimulation de ces neurones GABAergique, avec un agoniste du récepteur 5-HT₆, augmente la libération de GABA par ces neurones et inhibe la neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique par l'intermédiaire des récepteurs GABA_A. Adapté de (Schechter et al., 2008).

3. Cognition

De nombreux antagonistes du récepteur 5-HT₆ exercent un effet pro-cognitif chez les rongeurs, mais également chez l'Homme (Mitchell and Neumaier, 2005; Benhamú et al., 2014).

L'utilisation d'un oligonucléotide antisens (OA) bloquant l'expression du récepteur 5-HT₆, ou d'une approche pharmacologique avec des antagonistes du récepteur, a permis de mettre en évidence l'implication du récepteur 5-HT₆ dans les processus cognitifs chez le rat. En effet, un traitement avec le Ro 04-6790, ou une injection ICV d'OA, ciblant le récepteur 5HT₆ améliore les performances dans le test de la piscine de Morris chez le rat (Woolley et al., 2001).

L'effet pro-cognitif de l'inhibition du récepteur 5-HT₆ a également été observé dans différents modèles pré-cliniques de déficits cognitifs chez le rat. Lieben *et coll.* ont montré que l'antagoniste du récepteur 5-HT₆ Ro-4368554, réversait les déficits cognitifs associés à une altération du système cholinergique ou du système sérotoninergique. En effet, alors qu'un traitement à la scopolamine ou qu'une modification de la neurotransmission sérotoninergique, induite par une diminution de l'apport en tryptophane, altèrent les performances dans le test de reconnaissance d'un nouvel objet, l'utilisation d'un antagoniste du récepteur reverse ces déficits (Lieben et al., 2005). De même, alors que l'administration de Ro 04-6790, un autre antagoniste du récepteur 5-HT₆, n'améliore pas par lui-même les performances dans le test de reconnaissance d'un nouvel objet chez le rat, il est en revanche capable de réverser les déficits induits par un blocage de la neurotransmission cholinergique dans ce test, confirmant ainsi les résultats obtenus précédemment (Woolley et al., 2003). L'inhibition du récepteur 5-HT₆ est également en mesure de réverser les altérations cognitives observées dans des modèles pré-cliniques neurodéveloppementaux de schizophrénie. Des rats soumis à un isolement social après le sevrage ou bien à un traitement néo-natal avec de la phencyclidine (PCP, antagoniste du récepteur NMDA) voient leurs performances décliner dans les tests de reconnaissance sociale ou de reconnaissance d'un nouvel objet. Un traitement aigu de ces rats, au stade adulte, avec un antagoniste du récepteur 5-HT₆ (le SB258585), avant la phase d'entraînement, reverse les déficits observés (Meffre et al., 2012). Un autre antagoniste du récepteur, le Lu AE58054 (ou SGS-518) exerce aussi un effet pro-cognitif sur des rats

traités avec la PCP. En effet, alors qu'un traitement subchronique avec la PCP diminue les performances dans un test de reconnaissance d'objet, un traitement aigu avec le Lu AE58054 restaure les capacités cognitives dans ce test (Arnt et al., 2010). De plus, le SB399885, un antagoniste oralement actif du récepteur 5-HT₆, améliore les capacités de reconnaissance spatiale, chez des rats âgés (Hirst et al., 2006). Ces résultats suggèrent donc que les antagonistes du récepteur 5-HT₆ exercent un effet bénéfique sur les altérations normales et pathologiques des processus cognitifs.

De nombreuses études ont donc pu attester de l'efficacité des antagonistes du récepteur 5-HT₆ dans les performances cognitives mettant en jeu différents circuits cérébraux comme les tests de reconnaissance spatiale, de reconnaissance d'objet ou de reconnaissance sociale chez le rat. Les mécanismes d'action de ces antagonistes du récepteur 5-HT₆ ne sont pas totalement compris. Comme je l'ai précédemment présenté, le récepteur 5-HT₆ module la neurotransmission associée à plusieurs grands systèmes impliqués dans les processus cognitifs (glutamate, dopamine, acétylcholine). Ainsi, l'inhibition du récepteur 5-HT₆ pourrait participer à l'amélioration des fonctions cognitives, altérées dans diverses pathologies, en modulant l'activité des circuits cérébraux impliqués dans la cognition.

4. Développement neuronal

En plus de ses fonctions neuromodulatrices, le récepteur 5-HT₆ joue également un rôle central dans la mise en place des circuits cérébraux (Dayer et al., 2015). Au moment où a démarré mon projet de thèse, l'implication du récepteur 5-HT₆ dans le développement du cerveau avait essentiellement été décrite dans le processus de migration neuronale. En effet, Riccio *et coll.* ont mis en évidence le fait que les effets délétères sur la migration des neurones corticaux causés par un excès de sérotonine, passaient par le récepteur 5-HT₆. Comme je l'ai précédemment évoqué, la vitesse de migration des interneurones corticaux est affectée de manière dose-dépendante et réversible, par une augmentation de la sérotonine extracellulaire, dans des tranches de cortex de souris embryonnaires. Alors que ces neurones expriment les récepteurs 5-HT_{3A} et 5-HT₆, l'application d'un agoniste du récepteur 5-HT₆ (l'EMD386088) mime les effets induits par un excès de 5-HT, contrairement à l'agoniste 5-HT_{3A}. De plus, les effets de la 5-HT et de l'EMD386088 sont bloqués par l'application d'un antagoniste du récepteur

5-HT₆, le SB258585. Alors que l'application de forskoline (un activateur de l'adénylate cyclase) mime les effets obtenus avec un agoniste du récepteur 5-HT₆, indiquant l'implication de la voie G_s dans ce processus, un inhibiteur de la PKA ne réverse que partiellement le ralentissement neuronal induit par l'EMD386088, suggérant donc l'existence d'une autre voie dans la régulation du processus migratoire par le récepteur 5-HT₆ (Riccio et al., 2009). De la même façon, Riccio *et coll.* ont montré, sur un modèle comparable, qu'une application d'EMD386088 induisait un ralentissement des neurones pyramidaux du cortex de manière réversible. Ainsi, une augmentation de la quantité de 5-HT au cours du développement cortical induit un défaut de migration des neurones pyramidaux, médié par le récepteur 5-HT₆ et est associé à une accumulation de ces neurones dans les couches corticales les plus profondes (Riccio et al., 2011).

Le récepteur 5-HT₆ joue donc un rôle important dans la migration neuronale. Le but de mon travail de thèse a consisté à **mettre en évidence de rôle du récepteur dans d'autres phases du développement neuronal** et à **élucider les mécanismes moléculaires associés au contrôle neurodéveloppemental par le récepteur 5-HT₆**. Les résultats seront décrits ultérieurement.

E. Le récepteur 5-HT₆, une cible thérapeutique

Depuis la découverte du récepteur 5-HT₆, celui-ci est devenu une cible thérapeutique prometteuse dans diverses pathologies impliquant un dysfonctionnement du système nerveux central (Yun and Rhim, 2011).

1. Obésité

Comme je l'ai mentionné précédemment, une inhibition du récepteur 5-HT₆ permettrait de lever l'inhibition des neurones à POMC du noyau arqué hypothalamique favorisant ainsi la libération d' α -MSH et diminuant, en conséquence, la prise alimentaire (Woolley et al., 2004). Les études pré-cliniques ont, en effet, pu montrer que les antagonistes du récepteur 5-HT₆ induisaient une diminution de la prise alimentaire et de la masse corporelle en favorisant la sensation de satiété. De ce fait, certains de ces antagonistes ont pu passer en phase clinique de développement pour traiter l'obésité (Heal et al., 2008).

2. Schizophrénie

De nombreuses pathologies psychiatriques neurodéveloppementales sont associées à des altérations cognitives. Que ce soit, par exemple, dans le cas des troubles du spectre autistique, ou dans la schizophrénie, une altération du comportement social ou des fonctions exécutives est observée chez l'Homme (Millan et al., 2012). Les antagonistes spécifiques du récepteur 5-HT₆ se sont montrés très efficaces jusqu'à maintenant pour traiter ces altérations, notamment dans des modèles pré-cliniques de schizophrénie. Alors que les molécules de la nouvelle génération d'antipsychotiques, comme la clozapine ou l'olanzapine, ont une affinité importante pour le récepteur, leur effet pro-cognitif est limité (Keefe et al., 2007; Millan et al., 2012). L'absence d'effets sur la cognition pourrait être expliquée par des effets délétères liés à leur association à d'autres récepteurs. De nouvelles molécules qui possèdent une affinité importante pour le récepteur 5-HT₆, mais également une importante sélectivité vis-à-vis de celui-ci, ont donc été développées (Mitchell and Neumaier, 2005). Ces antagonistes 5-HT₆ sélectifs exercent un effet pro-cognitif dans de nombreux paradigmes expérimentaux où la cognition est affectée. Le SB258585, par exemple, est capable de réverser les déficits observés dans des tests de reconnaissance sociale ou de reconnaissance d'objets dans des modèles neurodéveloppementaux de schizophrénie chez le rat (Meffre et al., 2012). De même, dans le test de reconnaissance d'un nouvel objet effectué sur le rat, le SB271046 restaure les performances après un intervalle prolongé entre la phase d'apprentissage et la phase de test (King et al., 2004). Certains antagonistes du récepteur 5-HT₆ comme, par exemple, le SB742457, ou encore le SGS-518, sont en cours de développement clinique pour traiter les symptômes cognitifs observés dans la schizophrénie (Codony et al., 2011). Bien qu'aucune de ces molécules ne soit spécifiquement développée pour les troubles du spectre autistique, la compréhension des mécanismes cognitifs complexes impliqués dans ces pathologies et l'élucidation des mécanismes de signalisation associés au récepteur 5-HT₆ déclenchés par ces molécules pro-cognitives, pourra ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques.

3. Maladie d'Alzheimer

De même que dans le cas des pathologies neurodéveloppementales, les pathologies neurodégénératives sont également associées à des déficits cognitifs

importants (Upton et al., 2008). Comme je l'ai abordé dans le chapitre précédent, le Lu AE58054 (SGS-518) a un effet bénéfique sur les déficits cognitifs induits par un traitement à la PCP. Ce nouvel antagoniste du récepteur 5-HT₆ apparaît donc comme un outil pharmacologique prometteur dans le traitement des altérations cognitives observées non seulement dans la schizophrénie, mais aussi dans la maladie d'Alzheimer (Arnt et al., 2010). Cet antagoniste du récepteur 5-HT₆ est, en effet, en phase III de développement clinique dans le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer (Codony et al., 2011). De plus, cette même molécule est en phase de test clinique en complément du donépézil, un inhibiteur de l'acétylcholine estérase, déjà utilisé dans le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer (Codony et al., 2011). Ainsi, alors que des antagonistes 5-HT₆ réversent les déficits cognitifs observés chez des animaux âgés, ou induits par une altération de la transmission cholinergique, un certain nombre de ces molécules, comme le Lu AE58054, le SB742457 ou le SAM-531, sont actuellement en phase de développement clinique pour traiter ces déficits dans le contexte de la maladie d'Alzheimer (Upton et al., 2008).

4. Anxiété et dépression

Contrairement aux autres pathologies, dans le cas de la dépression ou des troubles anxieux, ce sont majoritairement les agonistes du récepteur 5-HT₆ qui exercent un effet bénéfique. Ceci est en accord avec le fait que l'un des principaux phénotypes de la souris 5-HT₆ KO est une anxiété accrue (Tecott and Brennan, 2000). Ainsi, l'EMDT, administré par voie systémique à la souris, diminue la période d'immobilité dans le test de la suspension par la queue, dans lequel l'absence de mouvement atteste de l'état de désespoir de la souris. En parallèle, la stimulation du récepteur 5-HT₆ par l'EMDT induit une augmentation de la phosphorylation de la protéine DARPP32 (*Dopamine and cAMP Regulated Phosphoprotein 32*) et de la sous-unité GluR1 du récepteur glutamatergique AMPA, ainsi que l'augmentation de l'ARNm du facteur de transcription c-Fos, dans le cortex et le striatum. Les effets positifs sur le comportement induits par l'agoniste du récepteur sont, par ailleurs, inhibés par le prétraitement avec un antagoniste du récepteur 5-HT₆, confirmant la spécificité de l'implication de ce dernier dans ce processus (Svenningsson et al., 2007). Une autre explication pouvant être à l'origine de l'effet des agonistes 5-HT₆ a été mise en évidence par De Foubert *et coll.* qui ont observé une augmentation de la synthèse de BDNF lors d'une stimulation sub-chronique du récepteur

5-HT₆. Alors qu'une diminution de la quantité de BDNF, notamment au niveau de l'hippocampe, est observée dans la dépression, un traitement avec des antidépresseurs semble avoir un effet positif sur la synthèse de BDNF, supportant l'hypothèse neurotrophique de la dépression (de Foubert et al., 2013). Dans cette étude, De Foubert *et coll.* montrent qu'un traitement quotidien, pendant quatre jours, par un agoniste du récepteur 5-HT₆ (le LY586713) induit une augmentation de l'ARNm du BDNF dans l'hippocampe (de Foubert et al., 2013). La transcription du gène du BDNF est notamment sous le contrôle du facteur CREB, lui-même indirectement activé par la production d'AMPC par l'intermédiaire de la PKA. On peut donc imaginer que c'est via ce mécanisme que le récepteur 5-HT₆ contrôle l'expression du BDNF. Ces résultats suggèrent donc qu'une augmentation de l'activité du récepteur 5-HT₆ pourrait avoir un effet bénéfique sur la dépression, en augmentant la synthèse de facteurs de croissance comme le BDNF. Ainsi, les agonistes du récepteur 5-HT₆ pourront constituer une stratégie thérapeutique potentielle pour traiter les troubles de l'humeur, tout en risquant d'impacter négativement la cognition.

Le récepteur 5-HT₆ est donc une cible thérapeutique prometteuse dans diverses pathologies. Les différents comportements médiés par les antagonistes ou les agonistes du récepteur 5-HT₆ impliquent très probablement différentes voies de signalisation induisant, a fortiori, une réponse cellulaire variable. Les agonistes du récepteur ont, par exemple, un effet bénéfique sur la dépression, mais délétère sur la cognition. Afin de limiter certains effets secondaires associés aux ligands du récepteur 5-HT₆, il sera donc important, à l'avenir, d'analyser précisément les mécanismes de signalisation associés à ces différents ligands.

IV. LA PROTEINE CDK5

La protéine Cdk5 (*Cyclin Dependent Kinase 5*) est une Cdk atypique dans la mesure où elle possède ses propres co-activateurs, son activité kinase ne dépendant pas majoritairement des cyclines et où sa fonction principale n'est pas le contrôle du cycle cellulaire comme nous allons le voir par la suite.

A. Structure et Fonctions

1. Structure et régulation

a) Cdk5, une « pseudo » Cdk

En dépit de ces caractéristiques différentes, Cdk5 conserve toutefois une structure similaire aux autres Cdk (*figure 11*). En effet, la protéine Cdk5 est une sérine/thréonine kinase qui conserve la structure bilobée caractéristique des Cdk, avec un lobe N-terminal (Lobe N) et un lobe C-terminal (Lobe C). Entre ces deux lobes se trouve le site de liaison de l'ATP. L'accès de l'ATP à Cdk5 est contrôlé par un segment (la boucle T) qui, lorsque la Cdk est inactive, empêche la liaison de l'ATP ainsi que du substrat. Contrairement aux autres Cdk, Cdk5 ne nécessite pas de phosphorylation particulière au niveau de la boucle T pour être activée. Au niveau du lobe N, se trouve une séquence PSSALRE (PSTAIRE chez les autres Cdk) adjacente à la boucle d'inhibition, riche en glycines (boucle G). Cette séquence est importante pour l'activation de Cdk5. Deux phosphorylations au niveau de la boucle G sont également importantes pour moduler l'activité de Cdk5. Alors que la phosphorylation de la Thr¹⁴ inhibe l'activité de cette Cdk, la phosphorylation de la Tyr¹⁵ par les kinases de la famille de Src, c-Abl et Fyn, stimule l'activité de Cdk5 (Lalioi et al., 2010). Les mutants Cdk5 D¹⁴⁴N et Cdk5 K³³T, deux dominants négatifs dépourvus d'activité kinase, ont, par ailleurs, fortement contribué à la compréhension des fonctions dépendantes de cette Cdk atypique (Nikolic et al., 1996).

b) Régulation dépendante de p35/p39

L'activité de Cdk5 dépend de son interaction avec l'un de ses co-activateurs p35 ou p39, tous deux exprimés au niveau cérébral. La liaison de l'une de ces protéines, par son domaine C-terminal, au motif PSSALRE de Cdk5, permet les changements conformationnels nécessaires à l'activation de Cdk5. Les protéines p35 et p39 semblent

avoir des fonctions distinctes, bien que parfois redondantes, en fonction de la région où elles sont exprimées. Elles sont toutefois associées à la même spécificité de substrat *in vitro* (Yamada et al., 2007). Cependant, p35 a été largement plus étudiée que p39. Le contrôle de l'état de phosphorylation de p35 semble particulièrement important pour l'activité Cdk5. En effet, Cdk5 phosphoryle elle-même p35 au niveau de la Ser⁸ et de la Thr¹³⁸. La phosphorylation de la Ser⁸ est associée à une rétention cytoplasmique du complexe p35/Cdk5 (Shah and Lahiri, 2014). La phosphorylation de la Thr¹³⁸, en revanche, induit une dégradation protéasomale de p35 relativement rapide et empêche le clivage calpaïne-dépendant de p35 associé à sa neurotoxicité (*figure 12*) (Kusakawa et al., 2000). L'état de phosphorylation de p35 varie au cours du développement. On retrouve, en effet, dans le cerveau embryonnaire, une forme de p35 résistante à la calpaïne et dont le renouvellement sera rapide, alors que dans le cerveau adulte l'absence de phosphorylation de la Thr¹³⁸ est associée à une augmentation de la sensibilité au clivage par la calpaïne et à un ralentissement de son renouvellement (Saito et al., 2003; Shah and Lahiri, 2014).

En plus du contrôle de l'activité de Cdk5, p35 et p39 régulent également sa localisation sub-cellulaire. En effet, la présence d'une glycine myristoylée (G²) au niveau N-terminal de ces protéines permet l'adressage à la membrane du complexe p35-p39/Cdk5, facilitant son accès à des substrats membranaires (Asada et al., 2008).

L'expression de p35 est modulée par des facteurs de croissance comme le BDNF ou le NGF. En effet, dans des cellules PC12, une stimulation par le NGF induit une forte augmentation de l'expression de p35 alors que l'expression de Cdk5 n'est pas affectée. La stimulation par le NGF provoque une activation soutenue de la voie des MAPK et une activation du facteur de transcription Egr1, conduisant à une augmentation de l'expression de p35 et de l'activité Cdk5 associée (Harada et al., 2001). Ces résultats confirment l'importance de p35 dans le contrôle de l'activité de Cdk5. Ce processus semble également engagé lors d'une stimulation, par le BDNF, de neurones cérébelleux en culture primaire, indiquant que cette voie serait préservée dans les neurones (Harada et al., 2001).

Tous ces éléments suggèrent que l'activité de Cdk5, contrôlée par p35 et p39, doit être finement régulée dans le temps mais aussi dans l'espace. Des formes tronquées en N-terminal des co-activateurs p35/p39 (p25/p29) sont associées à des dysfonctionnements très importants, impliqués dans différentes pathologies, comme je l'aborderai ultérieurement (Cruz and Tsai, 2004).

c) Régulation par les cyclines

La cycline E est en mesure d'inhiber indirectement l'activité de Cdk5. Cette cycline est fortement exprimée dans le cerveau et notamment dans le cortex et l'hippocampe. Dans les neurones, la cycline E est enrichie dans les dendrites et dans l'axone (Odajima et al., 2011). Odajima *et coll.* ont mis en évidence, par une approche protéomique, l'interaction entre la cycline E et Cdk5 dans le cerveau de souris. L'analyse fonctionnelle a révélé que, dans ce complexe, Cdk5 était inactive (Odajima et al., 2011). Ce groupe a donc pu mettre en évidence la séquestration de Cdk5 par la cycline E dans un complexe catalytiquement inactif, indiquant donc une inhibition indirecte de l'activité Cdk5 par cette cycline (*figure 12*). De plus, la surexpression du mutant dominant négatif de Cdk5 est capable de réverser le phénotype induit par une invalidation de la cycline E dans des neurones en culture, confirmant que la séquestration par la cycline E est importante dans la régulation de l'activité de Cdk5 (Odajima et al., 2011). La régulation de Cdk5 par la cycline E ajoute une dimension à la régulation de l'activité de cette kinase, confirmant l'importance de contrôler le plus finement possible l'activité de Cdk5 afin de maintenir un fonctionnement cérébral normal.

Même si p35/p39 sont les co-activateurs principaux de Cdk5, certaines cyclines contribuent également à son activation. C'est le cas de la cycline I qui, en plus d'activer Cdk5, contrôle aussi sa localisation sub-cellulaire. L'utilisation de souris n'exprimant plus la cycline I (cyclin I^{-/-}) ou bien p35 (p35^{-/-}) ont permis de mettre en évidence cette régulation. En effet, chez les souris cyclin I^{-/-}, Cdk5 est localisée préférentiellement au niveau du cytosol et de la membrane plasmique. A l'inverse, chez les souris p35^{-/-}, Cdk5 est majoritairement observée dans le noyau. Ces résultats suggèrent donc que les proportions respectives de p35 et de cycline I permettent de contrôler la localisation sub-cellulaire de Cdk5 (*figure 12*). De plus, l'interaction entre la cycline I et Cdk5 permet à

cette dernière d'avoir un point d'ancrage dans le noyau, favorable à une activité nucléaire (Hagmann et al., 2015).

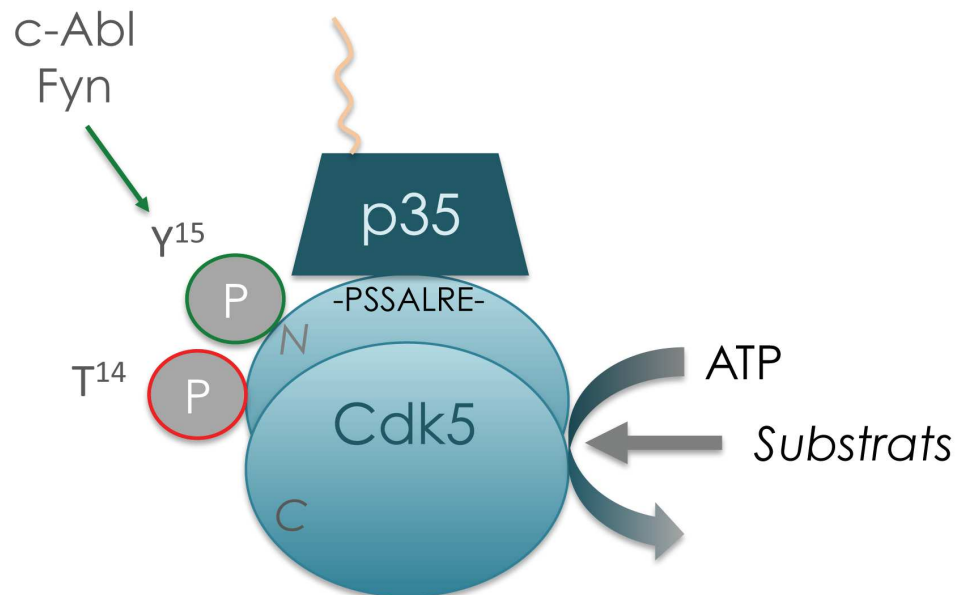


FIGURE 11 : STRUCTURE DE CDK5

Cdk5 est une protéine bilobée, constituée d'un lobe C-terminal (C) et d'un lobe N-terminal (N). Entre ces deux lobes se trouve le site de liaison de l'ATP. L'accès de l'ATP à Cdk5 est contrôlé par un segment (la boucle T) qui, lorsque la Cdk est inactive, empêche la liaison de l'ATP ainsi que du substrat. Ici, Cdk5 est schématisée dans sa conformation active, liée à son co-activateur p35. Ce dernier se lie au niveau de la séquence PSSALRE du lobe N adjacente à la boucle d'inhibition (boucle G). Deux phosphorylations au niveau de la boucle G modulent l'activité de Cdk5. La phosphorylation Thr¹⁴ inhibe l'activité de Cdk5 alors que la phosphorylation de la Tyr¹⁵ par les kinases c-Abl et Fyn l'active.

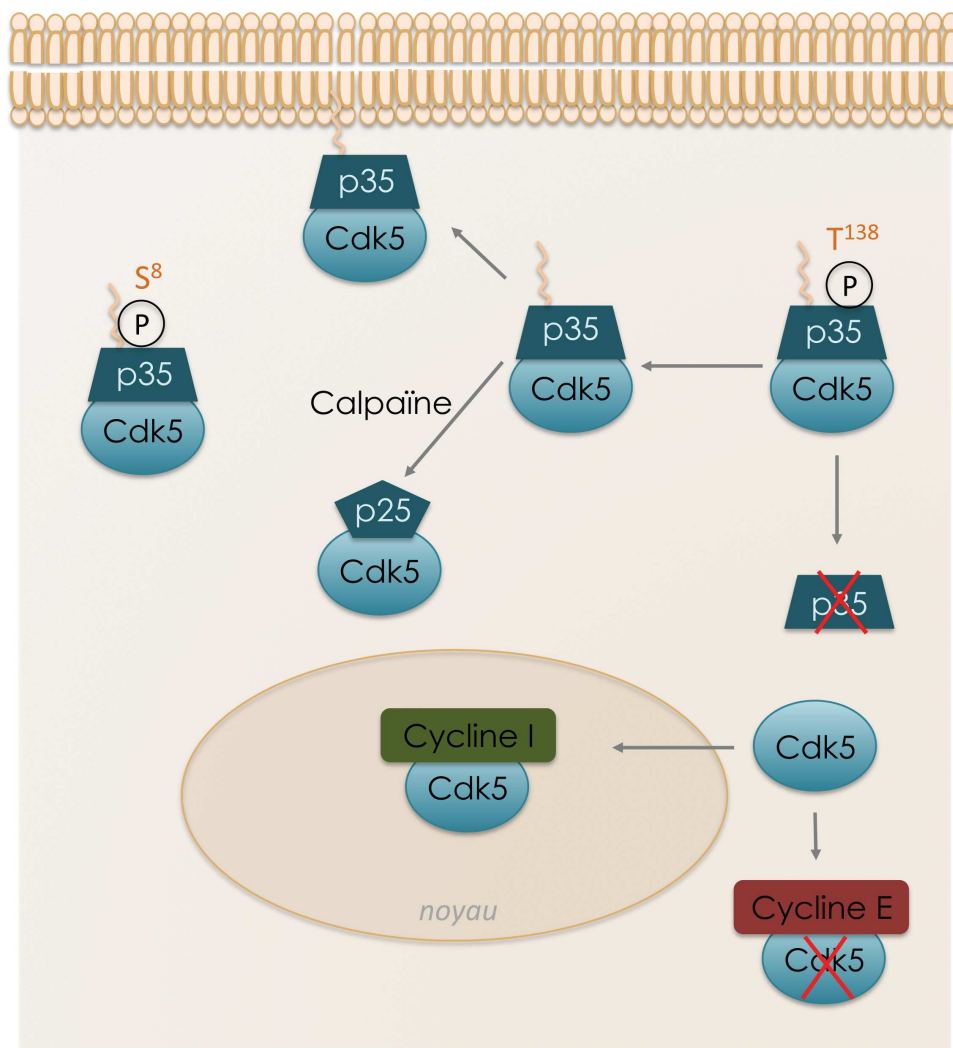


FIGURE 12 : REGULATION DE L'ACTIVITE ET DE LA LOCALISATION DE CDK5

La myristoylation de p35 induit un ancrage du complexe p35/Cdk5 à la membrane plasmique. Cdk5 phosphoryle p35 au niveau de la Ser⁸ induisant une rétention cytoplasmique du complexe p35/Cdk5. La phosphorylation de la Thr¹³⁸ de p35 par Cdk5 induit une dégradation protéasomale de p35 relativement rapide et empêche le clivage calpaïne-dépendant de p35 associé à sa neurotoxicité. La déphosphorylation de cette thréonine dépendrait des phosphatases PP1 ou PP2A (Shah and Lahiri, 2014). La cycline E séquestre Cdk5 dans un complexe inactif. La cycline I interagit avec Cdk5 et favorise ainsi sa localisation nucléaire.

2. Fonctions neuronales normales et pathologiques

Cdk5 est exprimée très fortement dans le cerveau et régule de nombreux mécanismes clés du fonctionnement cérébral par l'intermédiaire de très nombreuses cibles. En effet, cdk5 phosphoryle des protéines impliquées dans différents processus comme, par exemple, certains récepteurs membranaires (NMDA, TrkB,...), des protéines de la densité post-synaptique comme PSD-95, des protéines de signalisation comme DARPP32, des protéines contrôlant la dynamique de cytosquelette (Tau, WAVE-1) et des protéines impliquées dans la migration neuronale (Ndel1, Dcx) (Laloti et al., 2010). J'ai, dans la suite de ce chapitre, choisi certaines de ces cibles afin d'illustrer le rôle de Cdk5 dans le fonctionnement neuronal normal et pathologique. Enfin, Cdk5 phosphoryle des facteurs de transcription comme MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*) et STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) (Laloti et al., 2010). Ainsi, Cdk5 est impliquée dans divers processus comme la transmission et la plasticité synaptique ainsi que la différenciation neuronale. De ce fait, une dérégulation de l'activité Cdk5 pourra avoir des conséquences délétères sur le fonctionnement cérébral.

a) Fonctions normales

Cdk5 exerce une fonction importante dans la transmission et la plasticité synaptique.

Cdk5 compte, parmi ses cibles, différents récepteurs transmembranaires. Cette kinase phosphoryle, par exemple, la sous-unité NR2A du récepteur glutamatergique NMDA au niveau de la Ser¹²³². Cette phosphorylation est associée à une modulation du processus de LTP dans l'aire CA1 de l'hippocampe (Li et al., 2001). L'utilisation d'un modèle de souris KO conditionnel (KO_c) de Cdk5, a également participé à la compréhension de l'implication de cette kinase dans la plasticité synaptique et l'apprentissage. Une augmentation de la sous-unité NR2B du récepteur NMDA, dans l'hippocampe de ces souris, a permis de mettre en évidence la régulation de la dégradation de cette sous-unité par Cdk5. Chez les souris KO_c, la dégradation de NR2B est bloquée, induisant une augmentation des courants NMDA et une diminution du seuil d'induction de la LTP dans l'aire CA1. Du point de vue comportemental, les souris KO_c possèdent une flexibilité cognitive supérieure aux souris sauvages. En effet, elles montrent une amélioration des performances dans un paradigme de conditionnement de peur mais aussi dans l'extinction de ce conditionnement. La

même tendance est observée dans le test de la piscine de Morris, après inversion du quadrant cible contenant la plateforme (Hawasli et al., 2007).

Cdk5 phosphoryle également le récepteur TrkB du BDNF au niveau de la Ser⁴⁷⁸. La phosphorylation de cette sérine permet une interaction entre TrkB et la Rho GEF TIAM qui semble nécessaire pour la plasticité structurale dépendante de l'activité du récepteur NMDA. En effet, la phosphorylation de TrkB par Cdk5 permet l'activation de la voie Rac-PAK, dépendant de l'activité du récepteur NMDA, modulant ainsi la morphologie des épines dendritiques. L'interaction entre TrkB et TIAM est également nécessaire à la synthèse protéique mTOR-dépendante mise en jeu dans le processus de plasticité synaptique. En conséquence, la LTP dans l'hippocampe est altérée chez les souris KI, mutées au niveau du site de phosphorylation de Cdk5 sur TrkB (souris TrkB^{S478A/S478A}). On observe, en parallèle, une diminution des performances dans les tests de la piscine de Morris et de la reconnaissance d'un nouvel objet, chez ces souris. Ceci suggère donc l'existence d'un lien entre la phosphorylation de TrkB(Ser⁴⁷⁸) par Cdk5 et la régulation de la dynamique d'actine et de la synthèse protéique dépendante du récepteur NMDA, nécessaire au remodelage activité-dépendant des épines dendritiques (Lai et al., 2012).

Cdk5 est donc une protéine clé de la signalisation neuronale. Elle régule les mécanismes supportant la mémorisation mais également l'oubli et exerce donc un rôle central dans la plasticité neuronale.

b) Fonctions pathologiques

Comme je l'ai précédemment mentionné, l'activité de Cdk5 est régulée de manière précise en fonction de la présence de son activateur principal p35 et de sa localisation sub-cellulaire. Une dérégulation des systèmes de contrôle de l'activité de Cdk5 a des effets délétères sur le fonctionnement neuronal. La protéine p35 est clivée en N-terminal par la calpaïne, dont l'activité est dépendante du Ca²⁺, pour donner la protéine p25. Une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire associée à un stress cellulaire, provoque donc le clivage de p35 et augmente la proportion de p25. La protéine p25 est toujours capable de se lier à Cdk5 et de l'activer, cependant ce clivage supprime le segment myristoylé nécessaire à l'adressage membranaire de p35 (Kusakawa et al., 2000). L'association de Cdk5 avec ce co-activateur tronqué a deux effets majeurs ; 1) la

modification de la localisation sub-cellulaire de Cdk5 liée à l'absence de la partie N-terminale responsable de l'adressage membranaire de p35. En l'absence d'adressage membranaire, le complexe p25/Cdk5 devient cytosolique et favorise donc l'accès de Cdk5 aux protéines environnantes (Kusakawa et al., 2000), 2) la liaison de p25 à Cdk5 est associée à une hyperactivation de Cdk5 (Cruz and Tsai, 2004; Lee et al., 2000). L'hyperactivité de Cdk5 a été associée à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (protéine associée aux microtubules) dans le contexte de la maladie d'Alzheimer (Cruz et al., 2003). En effet, dans un modèle de souris KI p25 inducible, une augmentation de la proportion de p25 à l'âge adulte est clairement associée à une neurodégénérescence dans le cortex et l'hippocampe. Certains des principaux marqueurs de la pathologie sont observés chez ces souris, comme une diminution du volume cérébral, une augmentation de l'activation gliale (associée à un état inflammatoire) et la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires (Cruz et al., 2003). Ces observations sont à mettre en relation avec une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau dans les régions touchées chez ces souris p25 (Cruz et al., 2003). Une surexpression de p25 n'induit pas une hyperphosphorylation des cibles physiologiques de Cdk5 mais provoque plutôt un changement de cibles. En effet, alors que Tau n'est pas ou peu phosphorylée par Cdk5 en conditions normales, le complexe p25/Cdk5 a une spécificité d'action accrue pour cette protéine (Cruz et al., 2003). Ce changement de cible, associé à une activité prolongée de Cdk5, conduit à un mécanisme d'hyperphosphorylation pathologique, provoquant la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires neurotoxiques, dans l'hippocampe et le cortex de ces souris (Cruz et al., 2003). Le complexe p25/Cdk5 est également impliqué dans la mort neuronale induite par le peptide $A\beta_{(1-42)}$ chez la souris, suggérant donc un mécanisme à l'origine de la neurotoxicité associée au peptide $A\beta_{(1-42)}$ dans la maladie d'Alzheimer (Lee et al., 2000). De même, une augmentation de l'activité Cdk5 a été observée dans un modèle murin de la maladie de Parkinson. Alors qu'une augmentation de l'activité de la calpaïne est responsable de la mort neuronale dans ce modèle, Smith et coll. ont observé une augmentation de l'expression de p25 et de l'activité de Cdk5. Bien que la cible de Cdk5 dans ce modèle n'ait pas été décrite, l'activation aberrante de Cdk5 par p25 est liée à la dégénérescence des neurones striataux dans ce paradigme expérimental (Smith et al., 2003). Ceci confirme donc le rôle du complexe p25/Cdk5 dans des processus neurotoxiques d'étiologies différentes.

B. Rôle dans le développement neuronal

Le rôle de Cdk5 dans le développement neuronal est déjà suggéré par le phénotype des souris déficientes en Cdk5 (souris Cdk5^{-/-}). En effet, les souris Cdk5^{-/-} sont de plus petite taille, meurent peu de temps après leur naissance et présentent un important défaut de lamination corticale, suggérant donc l'importance de Cdk5 dans la migration neuronale. De plus, les souris double KO pour les co-activateurs de Cdk5 (p35^{-/-} et p39^{-/-}) possèdent le même phénotype que les souris Cdk5^{-/-}, indiquant que ces co-activateurs sont nécessaires aux fonctions neurodéveloppementales de Cdk5 (Ko et al., 2001). Il existe cependant une différence entre les doubles mutants p35^{+/-}/p39^{-/-} et p35^{-/-}/p39^{+/-}. En effet, alors que la lamination corticale et hippocampique des souris p35^{+/-}/p39^{-/-} ressemble à celle des souris sauvages, les souris p35^{-/-}/p39^{+/-} présentent un phénotype similaire aux souris double KO p35^{-/-}/p39^{-/-}. Ces résultats suggèrent que l'activité embryonnaire de Cdk5 serait davantage associée à p35 qu'à p39 (Ko et al., 2001). De plus, l'expression de la protéine p35 est régulée au cours du développement neuronal. On observe, en effet, une expression maximale au cours de la migration neuronale chez la souris, entre le jour embryonnaire 15 (E15) et la naissance (P0) (Nikolic et al., 1996). Ces résultats suggèrent l'existence d'un niveau de régulation spécifique à la période développementale, probablement associé à la fonction de Cdk5 dans le développement neuronal.

Alors que l'implication des Rho GTPases dans le développement neuronal a largement été décrite, le complexe p35/Cdk5 jouerait un rôle dans la signalisation dépendant de la protéine Rac. Le complexe p35/Cdk5 peut, en effet, s'associer avec la forme active de Rac et son effecteur PAK1. La formation de ce complexe de manière transitoire exerce un rôle inhibiteur sur l'activité de PAK1. Ce complexe serait donc un moyen de réguler de façon dynamique la polymérisation de l'actine associée à PAK1 dans le développement neuronal (Nikolic et al., 1998).

L'implication de Cdk5 dans la migration neuronale passe par la phosphorylation de différentes cibles impliquées dans le processus de nucléokinèse. En effet, les protéines Lis1 et Dcx, décrites précédemment, sont régulées par Cdk5. Dans le cas de la Dcx, la phosphorylation la Ser²⁹⁷ par Cdk5, est nécessaire à l'activité de la Dcx dans la translocation nucléaire. Cet effet passe probablement par une régulation de la dynamique

des microtubules (Tanaka et al., 2004b). La protéine Ndel1, contenue dans le complexe Lis1/dynéine/Ndel1, est également une cible de Cdk5. Cdk5 phosphoryle Ndel1 au niveau de trois résidus localisés dans la région impliquée dans son interaction avec la dynéine. Bien que le rôle de ces phosphorylations ne soit pas clair, le fait qu'elles se situent dans la région impliquée dans l'interaction de Ndel1 avec la dynéine implique que ces phosphorylations pourraient contrôler l'interaction entre Ndel1 et la dynéine (Niethammer et al., 2000). La protéine FAK (*Focal Adhesion Kinase*) est fortement impliquée dans la motilité cellulaire et constitue aussi une cible de Cdk5. Cdk5 phosphoryle FAK au niveau de la Ser⁷³². Cette phosphorylation est nécessaire à la stabilisation FAK-dépendante des microtubules périnucléaires au cours de la migration neuronale. La surexpression d'un mutant FAK(S⁷³²A) induit un défaut de positionnement des neurones corticaux chez la souris, probablement dû à une altération du mouvement nucléaire. La phosphorylation de FAK par Cdk5 joue donc un rôle majeur dans la migration neuronale en participant à la stabilisation des réseaux de microtubules périnucléaires favorisant ainsi la translocation nucléaire (Xie et al., 2003). Enfin, Cdk5 phosphoryle la protéine Dixdc1 au niveau de la Ser²⁵⁰ permettant à cette protéine d'interagir avec le complexe DISC1/Ndel1, mécanisme essentiel au processus de migration radiale (Singh et al., 2010).

En plus de son rôle dans la migration, Cdk5 est aussi très importante pour la différenciation neuronale. Elle promeut notamment la pousse neuritique de différentes façons. La phosphorylation de la kinase Pctaire1 au niveau de la Ser⁹⁵, par exemple, est nécessaire au développement de l'arbre dendritique des neurones d'hippocampe en culture (Fu et al., 2011). De même, Cdk5 est nécessaire à la pousse neuritique induite par une stimulation au BDNF. En effet, comme je l'ai précédemment évoqué, alors que p35/Cdk5 interagit avec le récepteur TrkB, une stimulation au BDNF provoque la phosphorylation réciproque de la Tyr¹⁵ de Cdk5 par TrkB et de la Ser⁴⁷⁸ dans le domaine intracellulaire de TrkB par Cdk5. Ces événements de phosphorylation entraînent une augmentation du nombre de neurites primaires sur des neurones d'hippocampes en culture par un mécanisme Cdc42-dépendant (Cheung et al., 2007). Cdk5 participe aussi à la morphogenèse des épines dendritiques. En effet, Cdk5 phosphoryle la protéine WAVE-1, régulateur clé de la dynamique du cytosquelette d'actine, au niveau de trois sérines (Ser³¹⁰, Ser³⁹⁷ et Ser⁴⁴¹). La phosphorylation des sérines 310 et 397 induit une

augmentation du nombre de protrusions de classe 4 (filopodes) parallèlement à une diminution des épines de classes 1, 2 et 3 (« stubby », « mushroom », « thin ») dans des cultures primaires et des tranches de striatum (Kim et al., 2006). De plus, dans les neurones n'exprimant pas la cycline E on observe une hyperphosphorylation des Ser³¹⁰ et Ser⁴⁴¹ de WAVE-1, associée à une diminution du nombre de synapses dans l'hippocampe de souris, indiquant donc que cette cycline régule l'activité de Cdk5 dans la morphogenèse des épines dendritiques (Odajima et al., 2011).

Ces résultats suggèrent donc que Cdk5 contrôle la différenciation neuronale à différents niveaux, de la migration à la complexification de l'arborisation dendritique, par l'intermédiaire de différentes cibles impliquées dans la signalisation ou la dynamique du cytosquelette.

En conclusion Cdk5 joue un rôle clé dans la plasticité synaptique mais également dans la mise en place des circuits neuronaux. L'activité de cette kinase est régulée très finement par son interaction avec ses différents activateurs qui modulent également sa localisation subcellulaire et sa spécificité de substrat. Une altération du fonctionnement de cette protéine aura donc de graves conséquences pathologiques comme cela a été illustré dans ce chapitre.

V. LA PROTEINE WAVE-1

Comme cela a précédemment été mentionné, la protéine WAVE-1 constitue une cible importante de Cdk5 dans la morphogenèse des épines dendritiques. Ce chapitre présentera donc cette protéine d'un point de vue structural et fonctionnel.

A. Structure et régulation des WASP

La dynamique du cytosquelette d'actine est un élément fondamental dans la réponse des cellules à leur environnement. Les changements de morphologie observés non seulement au cours de l'activité neuronale adulte, mais aussi tout au long du développement des neurones, impliquent un remaniement important du cytosquelette sous-jacent (Luo, 2002). On peut, par exemple, observer au sein des cônes de croissance, structures très dynamiques, moteurs du prolongement des neurites, une forte densité de polymères d'actine. De même, les épines dendritiques sont des structures très riches en actine (Luo, 2002). La polymérisation de l'actine monomérique (G) pour former des filaments d'actine (F) est une étape primordiale pour assurer cette dynamique. Ces filaments s'assemblent en doubles hélices, elles-mêmes organisées en réseaux branchés. Afin de permettre la formation de nouveaux filaments d'actine, l'association de trois protéines d'actine G est nécessaire, il s'agit de l'étape de nucléation. La formation de nouveaux filaments d'actine branchés est permise grâce à l'intervention de protéines de nucléation comme le complexe Arp2/3 (Actin Related Protein 2/3). Très peu actif par lui-même, le complexe Arp2/3 requiert l'intervention de Nucleation Promoting Factors (NPF) pour permettre le processus de nucléation et donc la dynamique du réseau d'actine (Rodal et al., 2005).

1. La Famille WASP

a) Description

Cette fonction de NPF est assurée par les protéines de la famille WASP, pour *Wiskott Aldrich Syndrome Protein*. Une mutation récessive sur le chromosome X, associée au syndrome de Wiskott-Aldrich, pathologie caractérisée par une immunodéficiences, a permis d'identifier la protéine WASP. Par la suite, les autres membres de la famille WASP ont été identifiés par homologie de séquence (Burianek and Soderling, 2013). Cette

famille de NPF comprend six membres, de structure très similaire, mais dont la localisation varie : WASP, N-WASP, WAVE, WASH, WHAMM et JMY. La répartition des membres de cette famille est assez large, cependant les protéines N-WASP et WAVE-1/3 se retrouvent en grande majorité dans le système nerveux central. Le domaine C-terminal, à l'origine de l'activation du complexe Arp2/3, est très conservé au sein de cette famille. La partie N-terminale, en revanche, leur confère leur spécificité spatiale (Burianek and Soderling, 2013).

b) WASP/WAVE et Rho GTPases

Afin d'adapter la dynamique du cytosquelette d'actine à l'environnement des neurones tout au long de leur existence, il est nécessaire que l'information provenant des stimuli extracellulaires transite de la membrane vers le cytosquelette. Les petites GTPases de type Rho sont des protéines clés dans l'adaptation de la dynamique du cytosquelette d'actine aux stimuli extérieurs (Govek et al., 2005). Ces Rho GTPases peuvent être activées par plusieurs récepteurs membranaires et modulent le cytosquelette d'actine, notamment par l'intermédiaire des protéines WASP (*figure 13*) (Ponimaskin et al., 2007). Alors que la sérotonine est impliquée dans la différenciation neuronale, certains de ses récepteurs modulent directement l'activité des Rho GTPases par l'intermédiaire des protéines G_{12} et G_{13} . C'est notamment le cas des récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₇ qui, comme je l'ai abordé précédemment, contrôlent ainsi la pousse neuritique de neurones d'hippocampe en culture. De même, le récepteur NMDA du glutamate module la morphogenèse des épines dendritiques en activant les Rho GTPases par l'intermédiaire de GEFs comme, par exemple, Tiam1 (Ponimaskin et al., 2007). L'activation de Cdc42 par le récepteur TrkB, suite à une stimulation par le BDNF, illustre également l'implication des récepteurs tyrosine kinase dans le contrôle de l'activité des Rho GTPases (Cheung et al., 2007). Les Rho GTPases agissent par l'intermédiaire d'un certain nombre d'effecteurs, capables de moduler le cytosquelette, comme par exemple PAK (*p21 Activated Kinase*) qui contrôle la polymérisation de l'actine via la kinase LIMK (*Lin-11, Isl-1, and Mec-3 kinase*) et la cofilin, ou encore les protéines WASP qui font l'objet du paragraphe suivant (Govek et al., 2005).

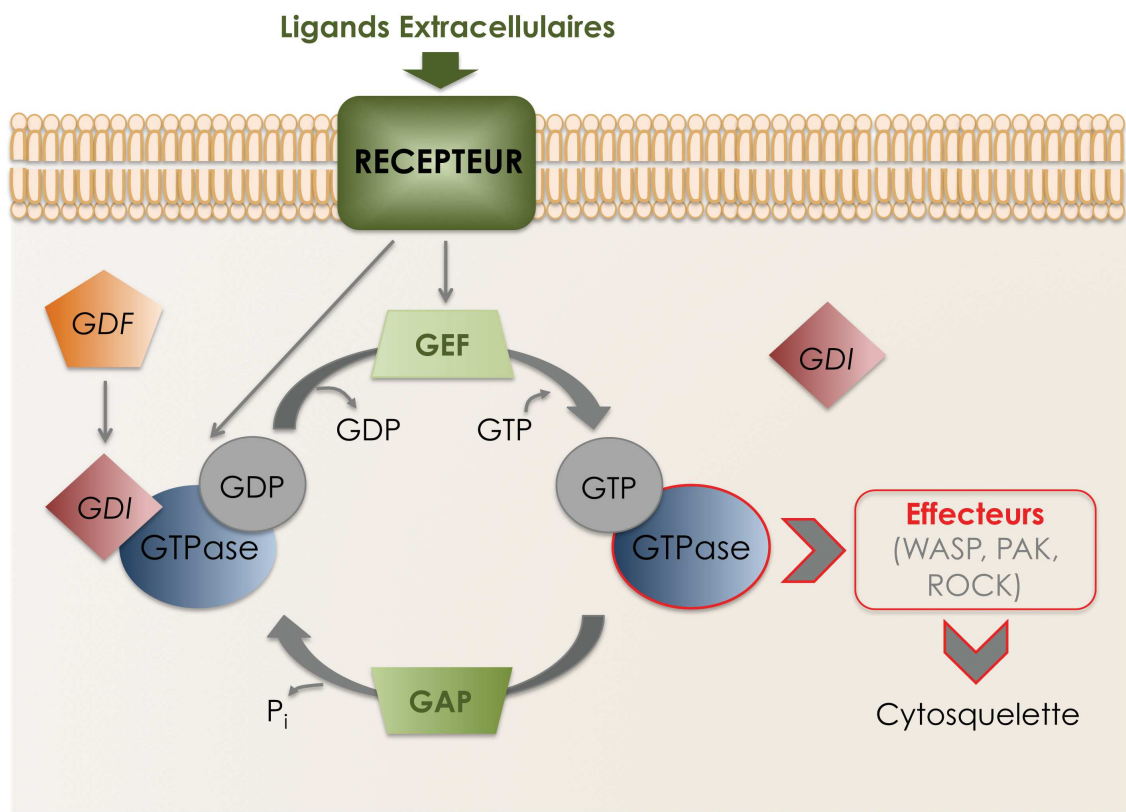


FIGURE 13: LIEN ENTRE SIGNAL EXTRACELLULAIRE, WASPS ET CYTOSQUELETTE

Différents récepteurs transmembranaires comme, par exemple, les récepteurs du glutamate, de la sérotonine, des neurotrophines, ou encore des semaphorines, sont capables d'activer les Rho GTPases. Les GEFs (guanine nucleotide exchange factor) facilitent la libération du GDP par les GTPases. La Rho GTPase liée au GTP est active et permet à son tour l'activation de différents effecteurs, parmi lesquels se trouvent les protéines de la famille WASP. Les GAPs (GTPase activating proteins) permettent l'hydrolyse du GTP par les Rho GTPases, ramenant ainsi ces dernières à leur conformation inactive. L'activité des Rho GTPases est également modulée par les GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors) dont l'activité est inhibée par les GDFs (GDI dissociation factors). PAK : p21 activated kinase ; ROCK : Rho associated protein Kinase. Adapté de (Ponimaskin et al., 2007).

2. Structure et Régulation des protéines WAVE

La protéine WAVE (*WASP family Verprolin-homologous protein*), ou SCAR (*Suppressor of cAMP Receptor signaling*), a été mise en évidence en 1998 par homologie de séquence avec les protéines WASP et N-WASP (Miki et al., 1998). Un an après, le même groupe identifie deux autres isoformes, WAVE-2 et WAVE-3, WAVE-1 étant la première caractérisée (Suetsugu et al., 1999). La différence entre ces isoformes réside principalement dans leur répartition tissulaire, leur structure et leur fonction étant très conservées. Les isoformes WAVE-1 et WAVE-3 sont très majoritairement exprimées au niveau du tissu cérébral. On retrouve notamment les niveaux les plus élevés de WAVE-1 dans le cortex, l'hippocampe, l'amygdale et le striatum (Dahl et al., 2003). La protéine WAVE-2 est exprimée dans le cerveau, le coeur, le côlon, le thymus, la rate, les reins et de manière plus importante dans le placenta, les poumons et les leucocytes circulants (Suetsugu et al., 1999).

Les protéines WAVE sont composées d'un domaine WHD (*WAVE Homologous Domain*) N-terminal, suivi d'un domaine basique (B), puis d'une zone riche en prolines (P) et à l'extrémité C-terminale, une région appelée V-C-A, constituée de trois domaines : V (*Verprolin homology*), C (*Central ou Connecting sequence*) et A (*Acidic sequence*) (Burianek and Soderling, 2013). La structure des protéines WAVEs est illustrée en *figure 14, A*. La région VCA permet la liaison de l'actine et l'activation du complexe Arp2/3. En effet, le domaine V est impliqué dans la liaison de l'actine monomérique et le domaine A dans l'interaction avec le complexe Arp2/3. Les domaines V et C sont nécessaires à l'activité NPF de ces protéines (Hüfner et al., 2001). Cette région VCA, lorsqu'elle est isolée, possède une activité constitutive et nécessite donc d'être finement régulée pour contrôler la dynamique de l'actine (Hüfner et al., 2001). En plus des domaines B et P, le domaine VCA est également conservé chez tous les membres de la famille WASP. Les protéines WASP et N-WASP possèdent un système d'auto-inhibition conformationnelle caractérisé par une interaction intramoléculaire entre le domaine VCA et le domaine de liaison des RhoGTPases (GBD, *GTPases Binding Domain*), absent dans les protéines WAVEs. Cdc42 dans sa conformation active se lie directement au niveau du domaine GBD levant ainsi l'inhibition imposée par l'interaction avec le domaine VCA et permettant son interaction avec le complexe Arp2/3 (Kim et al., 2000). Cependant, WAVE se distingue structurellement de ses homologues WASP et N-WASP non seulement par la présence du

domaine N-terminal WHD mais également par l'absence du domaine GBD. Etant donné l'absence de ce domaine, impliqué dans l'auto-inhibition de WASP et N-WASP, on peut imaginer que le mode de régulation de WAVE est très probablement différent.

a) *WAVE regulatory complex*

La protéine WAVE-1 est séquestrée dans un complexe protéique appelé WRC, pour *WAVE Regulatory Complex*. Ce complexe est formé par les protéines PIR121 (*p53 Inducible messenger RNA 121*), Nap1 (*Nck-Associated Protein 1*), HSPC300 (*Hematopoietic Stem/Progenitor Cell protein 300*) et Abi1 (*Abl Interactor 1*) (Eden et al., 2002). WAVE-2 et WAVE-3 font également partie de complexes analogues (Gautreau et al., 2004; Stovold et al., 2005). Au sein du complexe WRC, seuls Abi1 et HSPC300 interagissent directement avec WAVE. Nap1 est recrutée par Abi1, associée au domaine WHD et interagit avec PIR121 (Gautreau et al., 2004; Eden et al., 2002). La structure de ce complexe est illustrée en figure 14, B.

Alors que WAVE-1 seule active de manière constitutive la polymérisation de l'actine, WAVE-1 au sein du complexe WRC ne possède pas une telle activité, suggérant que les protéines constituant ce dernier exercent une action inhibitrice sur l'activité de WAVE-1 (Eden et al., 2002; Lebensohn and Kirschner, 2009).

Contrairement aux protéines WASP dont l'activation est associée à Cdc42, c'est la Rho GTPase Rac qui participe à l'activation des WAVE (Miki et al., 1998). Ainsi, Eden et coll. ont proposé un mécanisme d'activation selon lequel la liaison de Rac à PIR121 induit une dissociation des complexes Rac/PIR121/Nap1 et HSPC300/WAVE-1, permettant ainsi l'activation de WAVE-1 et la polymérisation de l'actine (Eden et al., 2002). Cependant, cette vision a été remise en question plus récemment. La liaison de la protéine Rac à PIR121 induit plutôt une modulation conformationnelle libérant le domaine VCA de WAVE-1, processus à l'origine de son activation (*figure 14,B*) (Chen et al., 2010). De plus, la liaison du domaine basique B des WAVE à des phospholipides membranaires, comme le PIP₃ (*Phosphatidylinositol (3,4,5)triPhosphate*), favorise un rapprochement avec la face interne de la membrane plasmique. Cette interaction permet donc le recrutement membranaire des WAVE favorable à la formation de lamellipodes à la surface cellulaire. Enfin, l'état de phosphorylation des WAVE apparaît important dans la régulation de leur activité catalytique, comme je l'aborderai dans la prochaine partie (Chen et al., 2010).

En conclusion, comme illustré dans la *figure 14*, l'activité de la protéine WAVE-1 est régulée par son association à quatre autres protéines au sein du complexe WRC. La fixation de la Rho GTPase Rac au niveau de ce complexe induit des changements conformationnels libérant la région catalytique de WAVE-1 (région VCA) favorisant ainsi la nucléation de l'actine par l'intermédiaire d'Arp2/3.

b) Régulation par phosphorylation

Abl, Src et Cdk5 sont les trois kinases connues pour phosphoryler WAVE-1. Les protéines Abl (*Abelson tyrosine kinase*) et Src (*Rous Sarcoma virus*), sont deux tyrosine kinases reconnaissant les motifs respectifs I/V/L-**Y**-X-X-P/F et **Y**-S ou **Y**-D/E. La phosphorylation de WAVE-1 au niveau des tyrosines 151 et 125 par Abl et Src, respectivement, permet de libérer la région VCA favorisant ainsi la libération de ce domaine et l'activité de WAVE-1 (Chen et al., 2010; Mendoza, 2013). La protéine Cdk5, qui reconnaît les motifs **S/TP**, cible, en revanche, trois sérines au niveau du domaine riche en prolines de WAVE-1. En effet, les sérines 310, 397 et 441 sont phosphorylées par Cdk5 à stœchiométrie égale chez le rat (Kim et al., 2006). Ces sérines sont, par ailleurs, conservées chez la souris et chez l'Homme, de même que leur phosphorylation, à l'exception de la Ser⁴⁴¹ dont la phosphorylation n'a pas été identifiée chez l'Homme. D'un point de vue fonctionnel, la phosphorylation de ces trois sérines a un effet inhibiteur sur la polymérisation de l'actine induite par WAVE-1, avec un effet prédominant de la phosphorylation de la sérine 310, par rapport aux sérines 397 et 441 (la phosphorylation de la Ser⁴⁴¹ n'ayant que très peu d'effet sur l'activité WAVE-1) (Kim et al., 2006). Ces phosphorylations sont impliquées dans le processus de morphogenèse des épines dendritiques. En effet, en diminuant l'activité de WAVE-1, ces phosphorylations induisent une augmentation de la proportion de filopodes dans des cultures primaires et des tranches de striatum (Kim et al., 2006). La déphosphorylation de ces sérines est assurée par la phosphatase PP2A, elle-même dépendante de l'activité de la kinase PKA, par l'intermédiaire d'une phosphorylation activatrice de la sous-unité B56δ de PP2A (Ceglia et al., 2010; Ahn et al., 2007).

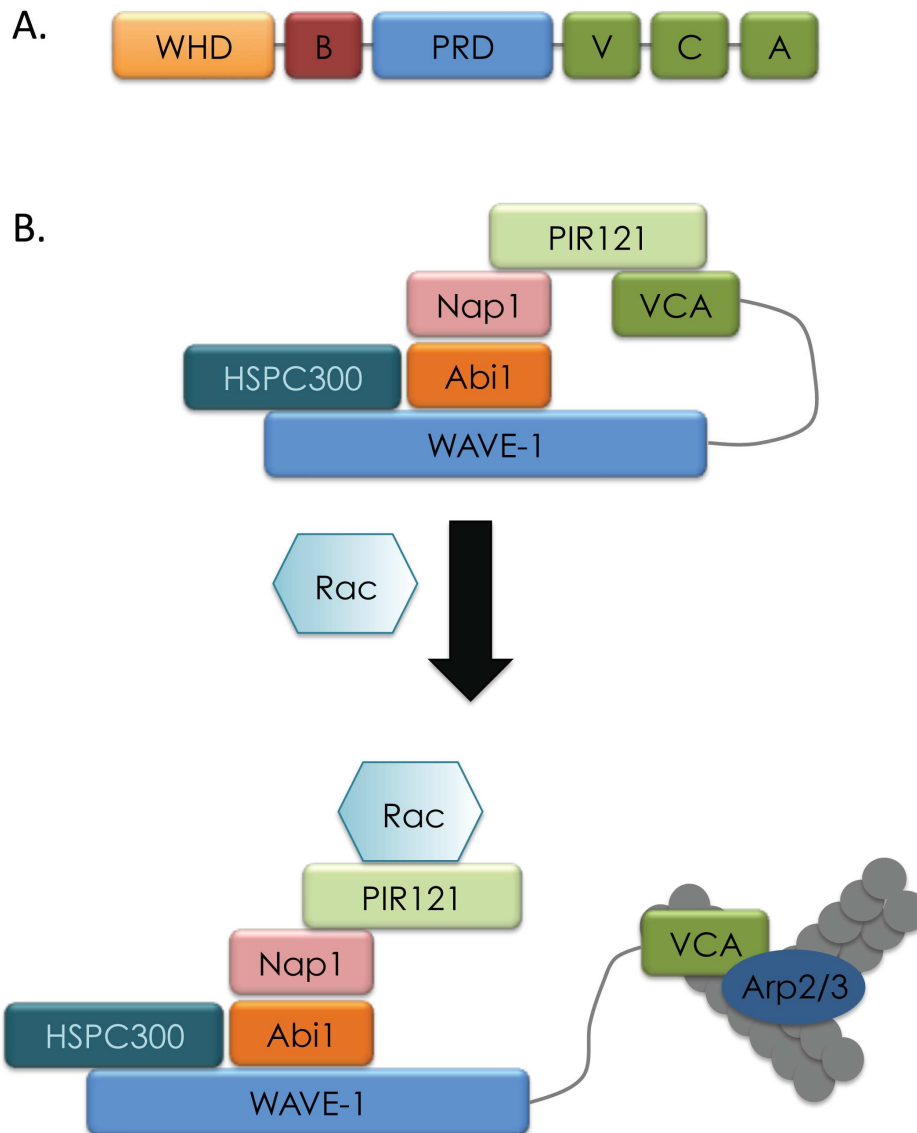


FIGURE 14 : STRUCTURE ET REGULATION DE WAVE-1

(A) Structure générale des protéines WAVE. WHD : WAVE Homology Domain, B : Basic sequence, PRD : Proline Rich Domain, V : Verprolin homology, C : Connecting sequence, A : Acidic sequence. **(B)** Structure du WAVE Regulatory Complex (WRC). WAVE-1 interagit avec les protéine HSPC300 et Abi1. Cette dernière interagit avec Nap1 qui recrute PIR121. L'activité de WAVE-1 est ainsi inhibée par son interaction avec ce complexe protéique. La fixation de la Rho GTPase Rac provoque un changement de conformation du WRC, libérant ainsi le domain VCA favorisant son interaction avec Arp2/3 et la polymérisation de l'actine. Adapté de (Burianek and Soderling, 2013).

B. Fonctions neurodéveloppementales de WAVE-1

WAVE-1 agit principalement comme un effecteur de Rac1. Etant donné le rôle majeur du cytosquelette d'actine dans la morphogenèse neuronale, on imagine que la protéine WAVE-1 est un médiateur important de ces changements. On retrouve, par ailleurs, un enrichissement de WAVE-1 au niveau du cône de croissance, mais aussi au niveau des épines dendritiques (Soderling et al., 2007). Ces structures expriment plusieurs récepteurs membranaires, suggérant donc que WAVE-1 participe activement à la morphogenèse neuronale en adaptant la dynamique du cytosquelette d'actine aux signaux extracellulaires perçus par ces deux régions en particulier.

L'observation de souris invalidées pour WAVE-1 (souris WAVE-1^{-/-}) a permis de tirer quelques conclusions préliminaires sur l'implication de cette protéine dans le développement neuronal. L'expression de WAVE-1 est progressivement restreinte au système nerveux central au cours du développement. En effet, alors qu'au jour embryonnaire 9 (E9) WAVE-1 est exprimé partout dans l'embryon, elle adopte progressivement une expression spécifique au niveau du cerveau et de la moëlle épinière à E18. Les nouveaux-nés KO sont légèrement plus petits que leurs homologues sauvages. Ils possèdent également un volume cérébral inférieur. Ces souris meurent très précocément. L'étude du développement *in vitro* des neurones corticaux des souris WAVE-1^{-/-} n'a pas révélé de différences majeures, en matière de développement neuronal. Ceci paraît étonnant au vu de l'importance de cette protéine dans le contrôle du cytosquelette d'actine (Dahl et al., 2003). D'autres études, utilisant également des neurones n'exprimant plus WAVE-1, ont cependant apporté d'autres résultats. En effet, les neurones d'hippocampe issus des souris WAVE-1^{-/-} développent des neurites moins longs comparés aux neurones sauvages (Soderling et al., 2007). Cette observation est cohérente avec un enrichissement de WAVE-1 dans les cônes de croissance. De même, on observe une diminution de la densité des épines dendritiques sur des tranches de cortex et d'hippocampe de souris WAVE-1^{-/-} adulte. Ces observations suggèrent donc fortement que WAVE-1 joue un rôle important dans le développement de l'arborisation dendritique (Soderling et al., 2007). De plus, alors que l'inhibition de WAVE-1 est associée à une altération de la transmission synaptique hippocampique et du processus de LTP, on observe également une diminution des performances cognitives dans les tests de la

piscine de Morris et de la reconnaissance d'un nouvel objet chez les souris WAVE-1^{-/-} (Soderling et al., 2003).

WAVE-1 est donc un acteur clé de la différenciation neuronale du fait de son rôle central dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. De plus, l'activité de WAVE-1 peut être modulée, non seulement par les kinases Abl, Src et Cdk5, mais aussi par différents récepteurs membranaires par l'intermédiaire de la Rho GTPase Rac1.

RESULTATS

I. Implication de la voie 5-HT₆/Cdk5 dans la pousse neuritique

A. Contexte et objectifs

Comme je l'ai évoqué en introduction, au cours de la différenciation des neurones, les prolongements qui les caractérisent s'allongent progressivement et se différencient morphologiquement et fonctionnellement pour former d'une part l'axone, qui transmet l'information, et d'autre part les dendrites, qui intègrent les informations reçues. Le développement des neurites est donc une étape cruciale pour permettre les contacts entre les neurones et la mise en place des circuits cérébraux. Une anomalie au cours du développement de l'arborisation neuronale peut, de ce fait, être à l'origine de nombreux dysfonctionnements cérébraux (Kulkarni and Firestein, 2012).

Le récepteur 5-HT₆, exprimé de manière précoce au cours du développement cérébral, est connu pour jouer un rôle important dans la migration des neurones corticaux. Ce dernier pourrait potentiellement être impliqué dans d'autres étapes du développement neuronal. De plus, le récepteur 5-HT₆ est devenu, depuis quelques années, une cible de choix d'un point de vue pharmacologique. En plus de son expression enrichie dans certaines régions cérébrales centrales dans les processus cognitifs, les antagonistes du récepteur réversent les déficits cognitifs notamment observés dans la schizophrénie (pathologie neurodéveloppementale) et dans la maladie d'Alzheimer (pathologie neurodégénérative) (Mitchell and Neumaier, 2005; Benhamú et al., 2014).

Le point de départ de ce travail a été de caractériser de manière non biaisée l'interactome du récepteur afin d'avoir une vision d'ensemble des voies de signalisation potentiellement engagées par ce dernier. Un premier crible protéomique a été précédemment réalisé par notre équipe, dans le but d'identifier les protéines interagissant avec le récepteur 5-HT₆. L'expression d'un récepteur 5-HT₆ tagué, dans un système d'expression hétérologue, a permis de mettre en évidence l'interaction entre le récepteur et des protéines telles que mTOR ou Cdk5, toutes les deux impliquées dans la différenciation neuronale (Meffre et al., 2012). Afin de préciser ces résultats obtenus à partir d'une lignée de HEK-293, nous avons, dans le travail présenté ici, utilisé une approche protéomique complémentaire. Les protéines exprimées dans le cerveau de

souris adulte ont été purifiées par chromatographie d'affinité en utilisant le domaine C-terminal du récepteur 5-HT₆ comme appât, ce domaine ayant un rôle clé dans l'interaction avec les partenaires intracellulaires. Ces protéines ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse par la Plateforme de Protéomique Fonctionnelle (FPP). Cette approche a permis de confirmer les résultats précédemment obtenus et de mettre en évidence 37 protéines interagissant avec le domaine C-terminal du récepteur 5-HT₆. Grâce à cette approche complémentaire, nous avons pu identifier des partenaires additionnels du récepteur 5-HT₆ qui ne sont pas exprimés dans les HEK-293, mais enrichis dans le tissu cérébral. C'est par exemple le cas de la GTPase Rheb (*Ras Homolog Enriched in Brain*) qui module l'activité du complexe mTORC1 (Huang and Manning, 2008). De plus, un réseau de protéines connues pour être impliquées dans la dynamique du cytosquelette d'actine et dans la différenciation neuronale a été identifié, principalement grâce à ce second crible. Ce réseau comprend les protéines Cdk5, WAVE-1, Arp2/3, GPRIN1 (*G Protein Regulated Inducer of Neurite growth 1*), la phosphatase PP2A et la paralemmin (PALM). Une protéine en particulier, étant donné sa position clé au sein de ce réseau, a attiré notre attention : la sérine/thréonine kinase Cdk5, également identifiée dans le crible protéomique précédent.

Du fait de l'importance de Cdk5 dans les processus neurodéveloppementaux, l'étude fonctionnelle réalisée par la suite a donc visé à **comprendre l'implication du complexe 5-HT₆/Cdk5 dans le développement neuronal** et à **disséquer la cascade de signalisation associée**.

Cdk5 induces constitutive activation of 5-HT₆ receptors to promote neurite growth

Fanny Duhr¹⁻³, Paul Délérís¹⁻³, Fabrice Raynaud¹⁻³, Martial Séveno¹⁻³, Séverine Morisset-Lopez⁴, Clotilde Mannoury la Cour⁵, Mark J. Millan⁵, Joël Bockaert¹⁻³, Philippe Marin^{1-3}, Séverine Chaumont-Dubel^{1-3*}*

¹ CNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, F-34000 Montpellier, France; ² INSERM, U661, F-34000 Montpellier, France; ³ Universités de Montpellier 1 & 2, UMR-5203, F-34000 Montpellier, France; ⁴ UPR 4301 du CNRS, Centre de Biophysique Moléculaire, rue Charles Sadron 45071 Orléans Cedex 02; ⁵ Institut de Recherches Servier, F-78290 Croissy-sur-Seine, France.

* These authors equally contributed to this study.

Cdk5 induces constitutive activation of 5-HT₆ receptors to promote neurite growth

Fanny Duhr¹⁻³, Paul Délérès¹⁻³, Fabrice Raynaud¹⁻³, Martial Séveno¹⁻³, Séverine Morisset-Lopez⁴, Clotilde Mannoury la Cour⁵, Mark J Millan⁵, Joël Bockaert¹⁻³, Philippe Marin^{1-3,6*} & Séverine Chaumont-Dubel^{1-3,6*}

The serotonin₆ receptor (5-HT₆R) is a promising target for treating cognitive deficits of schizophrenia often linked to alterations of neuronal development. This receptor controls neurodevelopmental processes, but the signaling mechanisms involved remain poorly understood. Using a proteomic strategy, we show that 5-HT₆Rs constitutively interact with cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5). Expression of 5-HT₆Rs in NG108-15 cells induced neurite growth and expression of voltage-gated Ca²⁺ channels, two hallmarks of neuronal differentiation. 5-HT₆R-elicited neurite growth was agonist independent and prevented by the 5-HT₆R antagonist SB258585, which behaved as an inverse agonist. Moreover, it required receptor phosphorylation at Ser350 by Cdk5 and Cdc42 activity. Supporting a role of native 5-HT₆Rs in neuronal differentiation, neurite growth of primary neurons was reduced by SB258585, by silencing 5-HT₆R expression or by mutating Ser350 into alanine. These results reveal a functional interplay between Cdk5 and a G protein-coupled receptor to control neuronal differentiation.

In addition to its well-established role in neurotransmission in the adult brain, serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) influences neurodevelopmental processes such as neuronal migration, neurite growth and dendritic spine morphogenesis and thereby contributes to the shaping of brain circuits essential for higher-order functions such as cognition and mood¹. Accordingly, anomalies in 5-HT-mediated signaling during critical phases of cerebral development may be related to the pathogenesis of neurodevelopmental disorders such as schizophrenia, autism and attention deficit hyperactivity disorder².

Among the G protein-coupled receptors (GPCRs) activated by 5-HT and suspected to modulate neuronal development, 5-HT₆Rs are of particular interest inasmuch as their activation in prefrontal cortex is implicated in the cognitive deficits observed in several developmental models of schizophrenia, whereas their blockade improves cognition in these models³⁻⁵. However, the precise role of 5-HT₆Rs in developmental processes and the signaling pathways mediating their action remain largely unknown. One obvious candidate would be the canonical 5-HT₆R-linked G_s/adenylyl cyclase pathway⁶ as cyclic AMP is strongly implicated in the control of neuronal migration, which itself is modulated by 5-HT₆Rs⁷. However, a protein kinase A inhibitor only partially reversed the influence of 5-HT₆R stimulation upon migration, raising the possibility that alternative signaling mechanisms participate in the control of neuronal migration by 5-HT₆Rs⁷.

Identifying protein partners of a given GPCR is a valuable strategy to uncover new signaling pathways in light of much evidence indicating that GPCRs can interact with extensive protein networks, which include proteins dedicated to signal transduction⁸. Exploiting a proteomic analysis of the 5-HT₆R complex purified by co-immunoprecipitation with recombinant 5-HT₆Rs, we recently found that 5-HT₆Rs interact with mTOR complex 1 (mTORC1) and that activation of the mTOR pathway by 5-HT₆Rs transduces their deleterious influence upon cognition⁹.

Here, we used a complementary strategy based on affinity purification of receptor interacting proteins from mice brain using the

receptor C terminus as bait, in line with previous findings that identified this domain as the major site contributing to GPCR association with intracellular protein networks¹⁰. We found that the 5-HT₆R C terminus recruits a network of proteins, including Cdk5 and some of its substrates, known to control actin cytoskeleton dynamics as well as neuronal migration, neurite growth and dendritic spine morphogenesis^{11,12}. Functional studies revealed that 5-HT₆Rs promote neurite growth of cultured neurons via a mechanism involving their phosphorylation by associated Cdk5 at a serine residue located in the C terminus and activation of the Cdc42 signaling pathway.

RESULTS

Identification of a 5-HT₆R-associated protein network

We incubated the C-terminal domain of the mouse 5-HT₆R (5-HT₆Ct) fused to GST with detergent-solubilized protein extracts from mice brain and pulled-down proteins retained by affinity. We included a cleavage site for the Tev protease between GST and 5-HT₆Ct to eliminate contaminant proteins interacting with beads or GST. This strategy limited the recruitment of contaminating proteins in control pulldowns performed with beads conjugated to GST and allowed the detection of proteins specifically recruited by the 5-HT₆Ct directly on the gels (Fig. 1a). Systematic analysis by tandem MS of proteins in samples from four independent control experiments and four experiments performed with the 5-HT₆Ct bait identified 37 proteins specifically interacting with the 5-HT₆Ct (Supplementary Results, Supplementary Tables 1 and 2). These included a network of proteins known to control actin cytoskeleton dynamics, including Cdk5, Wiskott-Aldrich syndrome protein-family verprolin homologous protein 1 (WAVE-1), one of the Cdk5 substrates; phosphatase 2A (PP2A), which dephosphorylates and activates WAVE-1; and the Arp2-Arp3 complex, which is also known to be activated by WAVE-1 (refs. 12–14) (Fig. 1b).

This protein network is a key regulator of neuronal migration, neurite growth and dendritic spine morphogenesis^{11,12}, suggesting that it might contribute to the regulation of these neurodevelopmental

¹CNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, F-34000 Montpellier, France. ²INSERM, U661, Montpellier, France. ³Universités de Montpellier 1 and 2, UMR-5203, Montpellier, France. ⁴UPR 4301 du CNRS, Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans, France. ⁵Institut de Recherches Servier, Croissy-sur-Seine, France. ⁶These authors contributed equally to this work. *e-mail: philippe.marin@igf.cnrs.fr or severine.chaumont-dubel@igf.cnrs.fr

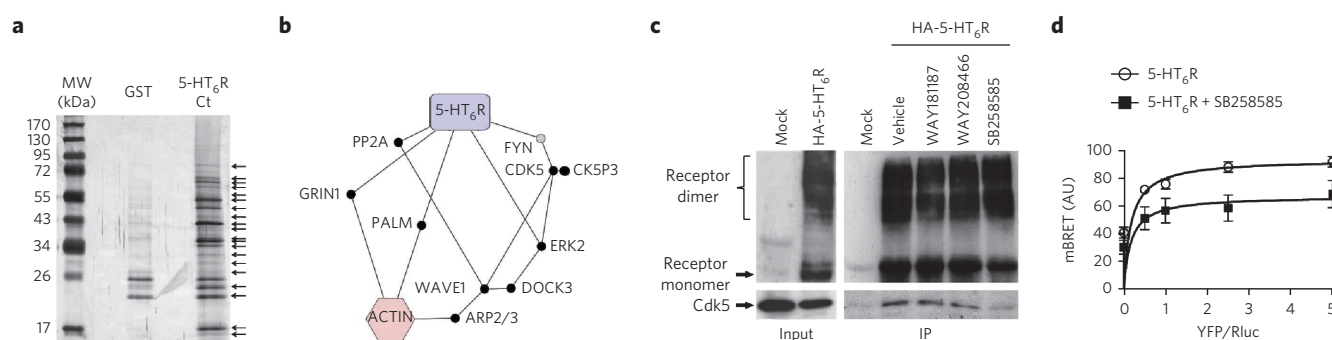


Figure 1 | Proteomic characterization of the 5-HT₆R-associated complex. (a) SDS-PAGE analysis of mouse brain proteins pulled down with 5-HT₆ C-terminal domain (5-HT₆Ct). Control pulldown was performed with GST alone. The image shows a colloidal Coomassie blue-stained gel obtained in a typical experiment. Arrows indicate the position of protein bands specifically recruited by 5-HT₆Ct. MW, molecular weight. (b) A simple interaction file was designed and imported in Cytoscape (v 2.8.1) to graphically show the interactions between the 5-HT₆R and a network of proteins involved in the control of cytoskeleton dynamics. The black nodes represent receptor partners identified in the current screen. (c) Co-immunoprecipitation (IP) of Cdk5 with HA-5HT₆R expressed in NG108-15 cells, treated with either vehicle, WAY181187 (1 μ M), WAY208466 (1 μ M) or SB258585 (10 μ M). The inputs represent 5% of the total protein amount used for immunoprecipitations. The image shows representative blots of four independent experiments performed on different sets of cultured cells. (d) Titration curves of the 5-HT₆-YFP-Cdk5-Rluc interaction in NG108-15 cells with or without exposure to SB258585 (10 μ M). BRET max went from 93.4 ± 2.4 arbitrary units (AU) for the nontreated cells to 66.8 ± 2.6 AU for cells treated with SB258585. Data show mean $\pm$ s.e.m. of quadruplicate determinations performed in a representative experiment. Three other experiments performed on different sets of cultured cells yielded similar results.

processes by 5-HT₆Rs. Given the importance of Cdk5 in the functional regulation of this network, we focused our study on the 5-HT₆R–Cdk5 interaction. Immunoprecipitation followed by western blot analysis confirmed the association of Cdk5 with the hemagglutinin (HA)-tagged 5-HT₆R expressed in neuroblastoma NG108-15 cells (Fig. 1c and Supplementary Fig. 13). Moreover, activation of 5-HT₆Rs by WAY181187 or WAY208466, two specific synthetic 5-HT₆ agonists, did not further enhance the 5-HT₆R–Cdk5 interaction, whereas the treatment of cells with SB258585, a 5-HT₆ ‘antagonist’, strongly reduced the recruitment of Cdk5 (Fig. 1c and Supplementary Fig. 1a). To further validate this interaction and its modulation by SB258585 in an authentic cellular context, we performed bioluminescence resonance energy transfer (BRET) experiments in NG108-15 cells expressing YFP-tagged 5-HT₆R and a *Renilla* luciferase (Rluc)-tagged Cdk5. Donor saturation curves showed that this interaction can be detected by BRET, is inhibited by SB258585 (Fig. 1d) and is specific of the 5-HT₆R as it is not detectable in cells expressing YFP-tagged 5-HT₄R (another G_s-coupled 5-HTR) and Rluc-Cdk5 (Supplementary Fig. 1b). The activity of Cdk5 is tightly regulated by its interaction with specific activators, the most abundant one being p35 (refs. 15,16). Though our proteomic screen did not identify Cdk5 activators, p35 co-immunoprecipitated with the 5-HT₆R expressed in NG108-15 cells (Supplementary Figs. 2 and 13), indicating that the receptor recruits a Cdk5–activator complex.

5-HT₆Rs induce neurite growth of NG108-15 cells via Cdk5

In line with increasing evidence implicating Cdk5 in CNS development^{11,12}, we examined whether 5-HT₆Rs, via the recruitment of Cdk5, promote the differentiation of neuroblastoma NG108-15 cells, a model commonly used for investigating mechanisms underlying neuronal development. Expression of YFP-tagged 5-HT₆Rs in NG108-15 cells induced marked morphological changes usually associated with neuronal differentiation, including neurite growth (Fig. 2a). Treating cells with WAY181187 did not amplify neurite growth elicited by 5-HT₆R expression, whereas SB258585 treatment strongly reduced neurite length (Fig. 2a and Supplementary Fig. 3a). As raising cAMP levels triggers NG108-15 cell differentiation¹⁷, we examined whether cAMP signaling has a role in receptor-elicited neurite growth

by using a 5-HT₆R bearing a triple mutation at conserved TM II residues, which impairs receptor signaling through G_s (referred to as 5-HT₆R G_s dead)¹⁸. Expressing the 5-HT₆R triple mutant in NG108-15 cells induced the same morphological changes as those induced by expression of the wild-type receptor (Fig. 2a and Supplementary Fig. 3a). Further supporting cAMP-independent effects and a specific role for 5-HT₆R, expression in NG108-15 cells of the 5-HT₄ receptor, which exhibits strong (constitutive) activity at G_s signaling¹⁹, induced a much less pronounced increase in neurite length compared with 5-HT₆Rs (Supplementary Fig. 4). Moreover, the morphogenetic effects induced by 5-HT₆R expression were independent of mTORC1 activation as they were not affected by treatment of cells with rapamycin (Fig. 2a and Supplementary Fig. 3a).

In contrast, treating NG108-15 cells expressing 5-HT₆R with roscovitine or alsterpaullone, two pharmacological Cdk5 inhibitors, strongly reduced the neurite length, as assessed 24 h after transfection (Fig. 2b and Supplementary Fig. 3b). Further supporting a role of Cdk5, co-expressing a Cdk5 dominant-negative mutant (Cdk5^{T33S})²⁰ with the 5-HT₆R also significantly ($P < 0.001$) reduced neurite length (Fig. 2b and Supplementary Fig. 3b).

5-HT₆R induces NG108-15 cell differentiation through Cdk5

As only differentiated NG108-15 cells express high voltage-activated Ca²⁺ channels^{17,21}, we next examined whether NG108-15 cells expressing 5-HT₆Rs and displaying morphological changes showed functional Ca²⁺ responses upon KCl depolarization. As expected, in cells expressing 5-HT₆Rs, we observed robust KCl-induced elevations in cytosolic Ca²⁺ concentration that were suppressed by isradipine, a blocker of voltage-gated calcium channels, whereas KCl did not elicit a detectable Ca²⁺ response in NG108-15 cells expressing GFP alone (Fig. 3a–c). WAY181187 did not affect 5-HT₆R-elicited Ca²⁺ responses (Fig. 3d), whereas SB258585 or roscovitine treatment abolished KCl-elicited Ca²⁺ increases (Fig. 3e,f). Further supporting the specificity of 5-HT₆R-mediated effects, we did not detect KCl-induced Ca²⁺ responses in cells transfected with a 5-HT₄ receptor construct (Fig. 3g). Ca²⁺ responses measured in cells expressing 5-HT₆Rs were comparable with those obtained in cells treated with dibutyl cAMP and dexamethasone for 48 h (Fig. 3h,i), a procedure classically used to induce NG108-15 cell

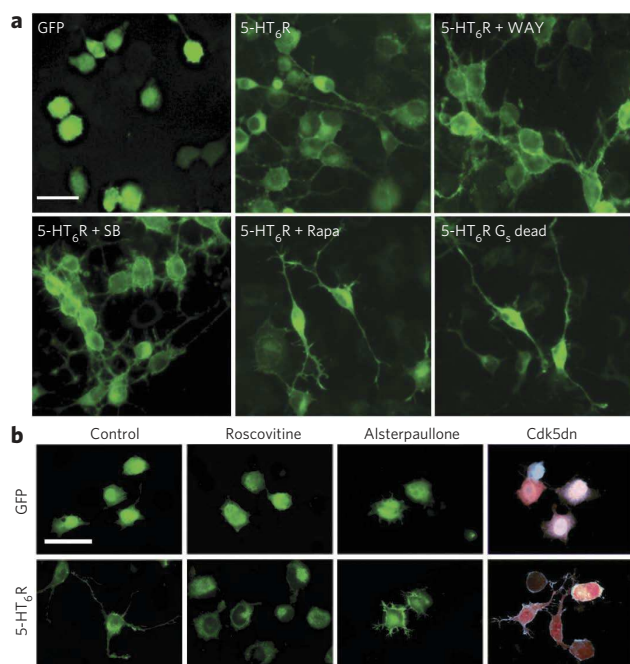


Figure 2 | 5-HT₆R expression induces neurite growth of NG108-15 cells through a Cdk5-dependent mechanism. (a) NG108-15 cells were transfected with plasmids encoding either GFP alone or wild-type YFP-tagged 5-HT₆R or YFP-tagged receptor mutant not able to activate G_s-adenylyl cyclase (G_s dead) and treated with WAY181187 (WAY, 1 μ M), SB258585 (SB, 10 μ M) or rapamycin (Rapa, 100 nM). Cells were fixed, and neurite length was quantified (**Supplementary Fig. 3a**). The image shows fields representative of three independent experiments performed on different cultures. Scale bar, 10 μ m. (b) NG108-15 cells were transfected together with a plasmid encoding either GFP alone or wild-type YFP-tagged 5-HT₆R and either an empty vector or a plasmid encoding mCherry-tagged Cdk5 dominant-negative mutant (Cdk5dn, magenta labeling). Roscovitine (50 μ M) and Alsterpaullone (25 μ M) were added immediately after transfection, and neurite length was quantified 24 h after transfection. The image shows fields representative of three independent experiments performed on different cultures. Neurite length, measured in each experimental condition, is indicated in **Supplementary Figure 3b**. Scale bar, 10 μ m.

differentiation¹⁷. Collectively, these results show that expression of 5-HT₆Rs induces agonist-independent morphological and functional changes in NG108-15 cells that are characteristic of neuronal differentiation and require Cdk5 activity.

Cdk5 phosphorylates the 5-HT₆R at Ser350

To further examine the functional role of physically associated Cdk5, we immunoprecipitated 5-HT₆Rs and analyzed the activity of co-immunoprecipitated Cdk5 using histone H1 as a substrate for *in vitro* kinase assay. Cdk5 co-immunoprecipitated with 5-HT₆Rs was active and able to phosphorylate its substrate *in vitro* (**Fig. 4a** and **Supplementary Figs. 5a** and **13**). We then explored whether Cdk5 can phosphorylate the receptor itself, in line with previous findings indicating that Cdk5-elicited phosphorylation of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) receptor TrkB is essential for TrkB-mediated regulation of dendritic growth²². Analysis by tandem MS of the immunoprecipitated receptor followed by database search using phosphorylation as a variable modification identified a single phosphorylated residue (Ser350) located in the 5-HT₆Ct (**Supplementary Fig. 5b**). Interestingly, *in silico* analysis identified this serine as a Cdk5 consensus phosphorylation site. Consistent with these findings, quantification of the corresponding

phosphorylated peptide ion signal from extracted ion chromatograms indicated that roscovitine treatment strongly inhibited Ser350 phosphorylation. In line with its ability to disrupt the 5-HT₆R-Cdk5 interaction, SB258585 also reduced Ser350 phosphorylation (**Fig. 4b** and **Supplementary Fig. 5b**).

Role of Ser350 phosphorylation in neurite growth

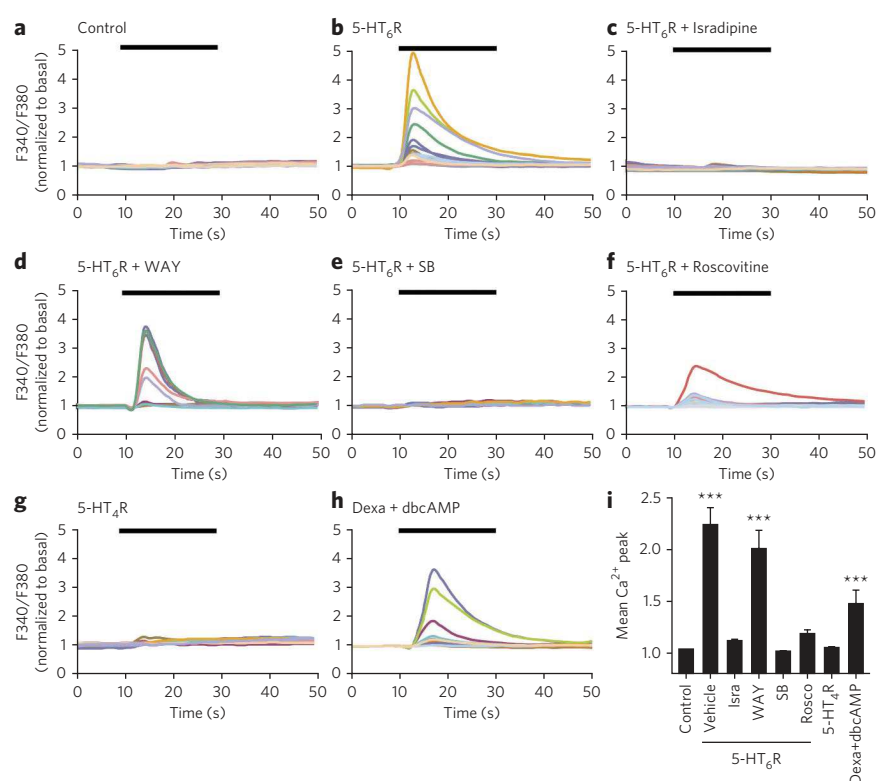
To analyze the impact of Ser350 phosphorylation upon NG108-15 cell differentiation, we mutated it into either alanine (S350A) or aspartate (S350D) to inhibit or mimic phosphorylation, respectively. Stimulation of the S350A 5-HT₆R expressed in NG108-15 cells by WAY181187 elicited cAMP production at a level comparable to that determined in cells expressing wild-type receptors, indicating that it was expressed at the cell surface and functionally coupled to G_s (**Supplementary Fig. 6a**). However, mutating Ser350 into alanine strongly reduced the ability of 5-HT₆R to promote neurite growth of NG108-15 cells (**Fig. 4c** and **Supplementary Fig. 5d**). In contrast, expression of the S350D mutant clearly enhanced neurite growth, and the co-expression of the Cdk5 dominant-negative mutant did not affect these morphological changes (**Fig. 4c** and **Supplementary Fig. 5d**). Further supporting a cAMP-independent mechanism, mutating Ser350 into aspartate resulted in a complete loss of the ability of the 5-HT₆R to stimulate adenylyl cyclase (**Supplementary Fig. 6a**). The inability of the aspartate mutant to elicit a cAMP response upon agonist stimulation did not reflect an inhibition of G_s signaling induced by Cdk5-operated Ser350 phosphorylation. Indeed, we measured comparable basal and agonist-stimulated cAMP production in cells expressing the wild-type receptor alone or in combination with the Cdk5 activator p35 (**Supplementary Fig. 6b**). Likewise, treating cells expressing the wild-type receptor with roscovitine did not affect constitutive and agonist-elicited cAMP levels. This suggests that the lack of cAMP signaling observed for the S350D mutant might result from a conformational change induced by the mutation itself. It is unlikely that such a conformational change would affect neurite growth, as the S350D mutant promoted neurite growth to the same extent as the wild-type receptor. This result, together with the inability of the S350A mutant to elicit neurite growth, as observed in cells expressing the wild-type receptor following Cdk5 inhibition, strongly supports a direct role of Ser350 phosphorylation in the morphogenetic effects of the receptor.

Phosphorylation of the 5-HT₆R activates the Cdc42 pathway

The previous findings show a critical role of Cdk5 catalytic activity in 5-HT₆R-elicited neurite extension and that the growth-promoting effect of Cdk5 depends on 5HT₆R phosphorylation at Ser350. Rho GTPases, such as RhoA, Rac1 and Cdc42, are key regulators of the actin cytoskeleton, and the Cdc42 signaling pathway has been involved in BDNF-induced neurite growth, a process depending on phosphorylation of TrkB receptors by Cdk5 (ref. 22). We thus explored whether 5-HT₆R expression in NG108-15 cells results in the activation of a Rho GTPase pathway, using RhoA, Rac1 and Cdc42 Raichu probes^{23,24}. These probes consist of chimera containing a Rho GTPase and the Rho GTPase binding domain of Pak, fused to the fluorophores CFP and YFP. When the Rho GTPase is activated, the conformation of the binding domain is altered, resulting in increased fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the fluorophores. We found that expression of the 5-HT₆R in NG108-15 cells only affected the FRET signal of the Cdc42 Raichu probe (**Fig. 5a** and **Supplementary Fig. 7**), indicating a specific activation of the Cdc42 signaling pathway by the 5-HT₆R. Exposing cells to either roscovitine or SB258585 inhibited Cdc42 activation elicited by 5-HT₆R expression. Moreover, expression of the S350D mutant, but not the S350A mutant, activated the Cdc42 pathway, even in the presence of roscovitine (**Fig. 5b**). Collectively, these results

Figure 3 | 5-HT₆R expression induces NG108-15 cell differentiation.

NG108-15 cells transfected with a plasmid encoding either GFP alone (**a, h**), YFP-tagged 5-HT₆R (**b–f**) or YFP-tagged 5-HT₄ receptor (5-HT₄) (**g**). Cells expressing GFP were treated for 48 h with either vehicle (**a**; control) or dexamethasone (Dexa, 2 μ M) and dibutyryl-cAMP (dbcAMP, 20 μ M) (**h**). Cells expressing YFP-tagged 5-HT₆R were treated for 48 h with either vehicle (**b**), WAY181187 (WAY, 1 μ M) (**d**), SB258585 (SB, 10 μ M) (**e**), roscovitine (Rosco, 50 μ M) (**f**). Representative recordings of variations in cytosolic Ca²⁺ levels in response to KCl (50 mM)-induced depolarization (black bars). (**c**) Cells were treated with isradipine (3 μ M) before KCl-induced depolarization. (**i**) The histogram shows the quantification of the calcium peak height in three independent experiments (at least three fields containing approximately ten transfected cells counted per experiment) each carried out on different cultures. Data represent mean $\pm$ s.e.m. *** P < 0.001 versus control.



clearly identify Ser350 phosphorylation by Cdk5 as a necessary step for 5-HT₆R-elicited Cdc42 activation. Co-expression of a dominant-negative Cdc42 mutant (Cdc42dn) with the 5-HT₆R in NG108-15 cells resulted in a significant (P < 0.001) decrease in neurite length (Fig. 5c and Supplementary Fig. 8), indicating that Cdc42 activation is involved in 5-HT₆R-induced neurite growth.

5-HT₆Rs promote neurite growth in primary neurons

To explore whether the 5-HT₆R can also promote neurite growth of primary cultured neurons, we first overexpressed 5-HT₆Rs in neurons from regions known to endogenously express the receptor, such as the striatum and the hippocampus²⁵. Infection of neurons from both structures with a 5-HT₆R viral construct resulted in a significant (P < 0.001) increase in neurite length after 1 d *in vitro* compared with that in GFP-infected neurons (Fig. 6a and Supplementary Fig. 9a). To assess whether endogenous 5-HT₆Rs have a role in neurite growth of primary neurons, we silenced their expression by transfecting neurons with a siRNA directed against the receptor. We validated the ability of the siRNA to impair 5-HT₆R expression by immunofluorescence and western blotting in NG108-15 cells and by quantitative PCR in primary neurons (Supplementary Fig. 10), as no antibody allowing for detection of endogenously expressed 5-HT₆Rs is currently available. Silencing 5-HT₆R expression resulted in shortening of neurite length measured 24 h after seeding, both in hippocampal neurons and striatal neurons (Fig. 6b and Supplementary Fig. 9b). Further supporting a role of endogenously expressed 5-HT₆Rs in the control of neurite growth of hippocampal and striatal neurons, treatment of cultures with SB258585 reduced neurite length to levels comparable to those measured in cultures transfected with the siRNA directed against 5-HT₆Rs (Fig. 6b and Supplementary Fig. 9b). Neither SB258585 nor the 5-HT₆R siRNA affected the number of primary dendrites and the complexity of the dendritic tree of these neurons, as assessed by Sholl analysis (Supplementary Fig. 11), suggesting that 5-HT₆Rs selectively stimulate neurite extension.

Treating striatal or hippocampal neurons with roscovitine also decreased their neurite length (Supplementary Fig. 12a) but did not affect the number of primary dendrites nor the complexity of their dendritic tree (Supplementary Fig. 11), supporting a role for

Cdk5 in neurite extension of primary neurons. In contrast with expression of the wild-type receptor, expression of the 5-HT₆R^{S350A} did not increase neurite growth of hippocampal neurons (Fig. 6c and Supplementary Fig. 9c). Moreover, co-expression of Cdc42dn resulted in a marked inhibition of neurite growth induced by 5-HT₆R expression and also reduced the neurite length of GFP-transfected neurons (Fig. 6d and Supplementary Fig. 9d), indicating that the Cdc42 pathway contributes to neurite growth elicited by native receptors. Collectively, these observations indicate that 5-HT₆R-elicited neurite growth of primary neurons requires both receptor phosphorylation at Ser350 and the activation of the Cdc42 signaling pathway by Cdk5, as previously established in neuroblastoma cells. In contrast, neurite growth elicited by 5-HT₆Rs was independent of G_s and mTOR signaling pathways, as the 5-HT₆R G_s dead mutant was still able to induce neurite growth to the same extent as the wild-type receptor in hippocampal neurons (Fig. 6c), and treatment of neurons with rapamycin did not affect neurite length (Supplementary Fig. 12a).

5-HT₆Rs promote neurite growth in cultured brain explants

We next sought to determine the influence of 5-HT₆R upon neurite growth in organized brain tissue using cultured hippocampal and striatal explants. Treating the explants with SB258585 induced a significant (P < 0.01) reduction of neurite length, as assessed 24 h after the onset of the treatment (Supplementary Fig. 12b). Roscovitine treatment likewise reduced neurite length of explants. This suggests that the 5-HT₆R–Cdk5 pathway promotes neurite growth in organized brain tissue, as previously established in primary cultures of dissociated neurons.

DISCUSSION

To characterize new signaling mechanisms underlying the control of neurodevelopmental processes by 5-HT₆Rs, we exploited an unbiased proteomic approach, which identified 37 proteins that reproducibly interact with the 5-HT₆R C-terminal domain, including the serine/threonine kinase Cdk5 and a number of its substrates, which are known to control actin cytoskeleton dynamics. Further

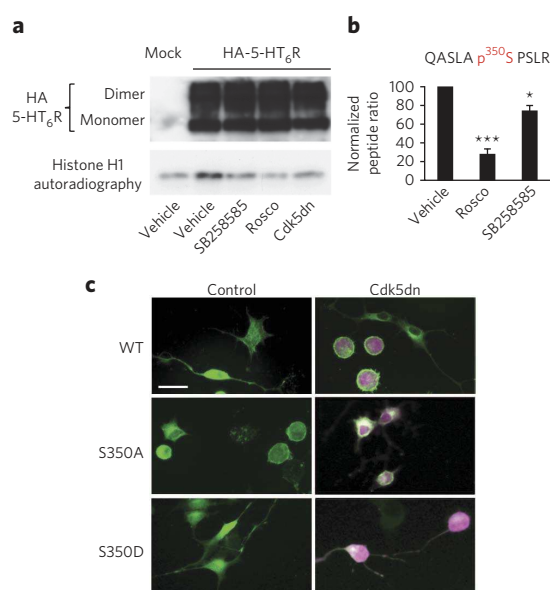


Figure 4 | Neurite growth elicited by 5-HT₆R expression requires receptor phosphorylation at Ser350. (a) NG108-15 cells were transfected with either an empty plasmid (Mock) or a plasmid encoding HA-tagged 5-HT₆R alone or were transfected together with Cdk5dn, and then cells were exposed to either vehicle or SB258585 (10 μM) or roscovitine (Rosco, 50 μM). Receptors were immunoprecipitated with the anti-HA antibody, and Cdk5 activity in immunoprecipitates was analyzed in an *in vitro* kinase assay using histone H1 as a substrate. The data illustrated are representative of three independent experiments. (b) Quantification of the QASLA p³⁵⁰S PSLR peptide ion signal, based on calculated extracted ion chromatogram (XIC) area (Supplementary Fig. 5b). Values were normalized to the XIC area of the nonphosphorylated QASLA PSLR peptide. Data, expressed in percentage of the normalized value obtained from vehicle-treated cells, represent mean ± s.e.m. of values obtained in three independent analyses. **P* < 0.05 and ****P* < 0.001 versus vehicle. (c) NG108-15 cells were transfected together with a plasmid encoding either GFP alone or YFP-tagged versions of the wild type (WT) or 5-HT₆R^{S350A} or 5-HT₆R^{S350D} and either an empty vector (control) or a plasmid encoding the mCherry-tagged Cdk5 dominant-negative mutant (Cdk5dn, magenta labeling). Neurite length was quantified 24 h after transfection. The pictures show representative fields of three independent experiments. Neurite length, measured in each experimental condition, is indicated in Supplementary Figure 5c. Scale bar, 10 μm.

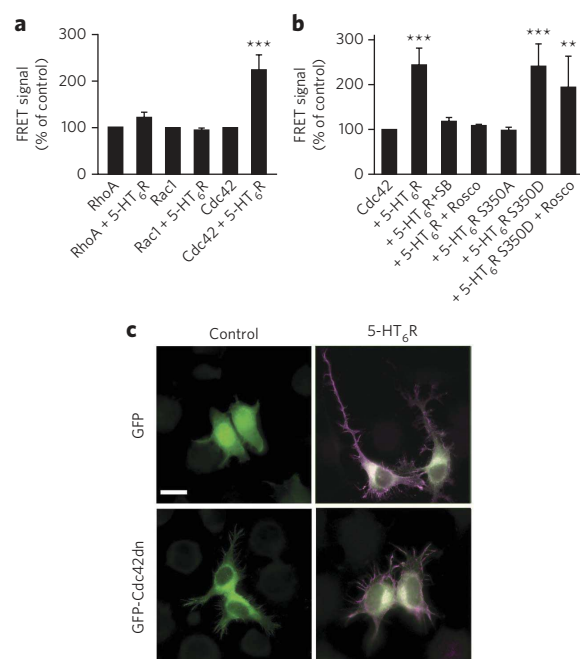


Figure 5 | Neurite growth elicited by 5-HT₆R expression requires Cdc42 activity. (a) NG108-15 cells were transfected with plasmids encoding either Rac1 or RhoA or Cdc42 Raichu probes, alone or in combination with a plasmid encoding 5-HT₆R. The histogram shows the FRET signal reflecting Rho-GTPase activation state. Data, expressed in percentage of values measured in absence of receptor, represent mean ± s.e.m. of values obtained in five independent experiments. ****P* < 0.001 versus corresponding condition in absence of 5-HT₆R. (b) NG108-15 cells were transfected with the plasmid encoding the Cdc42 Raichu probe, alone or in combination with a plasmid encoding the wild type or 5-HT₆R^{S350A} or 5-HT₆R^{S350D}, and treated with either vehicle, SB258585 (10 μM) or roscovitine (50 μM) for 24 h. The histogram shows the FRET signal reflecting Cdc42 activation state. Data represent mean ± s.e.m. of values obtained in four independent experiments. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 versus Cdc42 alone. (c) NG108-15 cells were transfected together with a plasmid encoding HA-5-HT₆R in combination with either GFP or a GFP-tagged Cdc42 dominant-negative (GFP-Cdc42dn) construct. The magenta signal corresponds to HA labeling of the receptor. Neurite length measured in each experimental condition is indicated in Supplementary Figure 8. Scale bar, 10 μm.

experiments showed that the interaction of Cdk5 with full-length 5-HT₆Rs, already detected in absence of ligand, is a dynamic process that depends on their conformational state. One particular receptor conformation in the absence of ligand is favorable for 5-HT₆R–Cdk5 complex formation, and SB258585, a specific 5-HT₆ antagonist of G_s signaling, behaves as an inverse agonist to disrupt this spontaneous (constitutive) association. Apart from the classic association of GPCRs with G_s proteins and β-arrestins, the present results represent what is to our knowledge one of the first examples whereby the conformational state of a receptor modifies its interaction with a GPCR-interacting protein²⁶.

Cdk5 differs from other members of the Cdk family in that its interaction with a specific activator (p35 or p39 in neurons) rather than cyclins governs its functional activity¹⁵. Though the proteomics screen did not allow identification of Cdk5 activators by MS, most likely reflecting the low expression level of p35 in adult mouse brain²⁷, western blot experiments clearly demonstrated co-immunoprecipitation of the 5-HT₆R with p35, the primary Cdk5 activator expressed during cortical development. The precise architecture and stoichiometry of the complex formed by 5-HT₆Rs, Cdk5

and p35 remains to be established. However, recruitment of the p35–Cdk5 complex by 5-HT₆Rs supports the notion that Cdk5 bound to 5-HT₆Rs is enzymatically active, as outlined by the ability of the 5-HT₆R complex to induce phosphorylation of the Cdk5 substrate histone H1 *in vitro*.

The critical part played by the p35–Cdk5 kinase complex in neurodevelopmental processes such as neurite growth¹² prompted us to investigate whether 5-HT₆Rs control neuronal differentiation via Cdk5. The data showed that 5-HT₆Rs promote neurite growth in NG108-15 cells, primary hippocampal or striatal neurons as well as in hippocampal or striatal explants in an agonist-independent manner. Moreover, these morphogenetic effects were independent of receptor coupling to G_s and to mTOR, another signaling pathway known to influence neurodevelopmental processes²⁸ and, as recently reported⁹, be involved in the control of cognition by the 5-HT₆R. Instead, we found that control of neurite growth required functional activity of Cdk5. Reminiscent of its ability to prevent association of 5-HT₆Rs with Cdk5, SB258585 inhibited the neurite growth induced by 5-HT₆R expression. Accordingly, SB258585 behaved as an inverse agonist toward 5-HT₆R-operated Cdk5 signaling. The

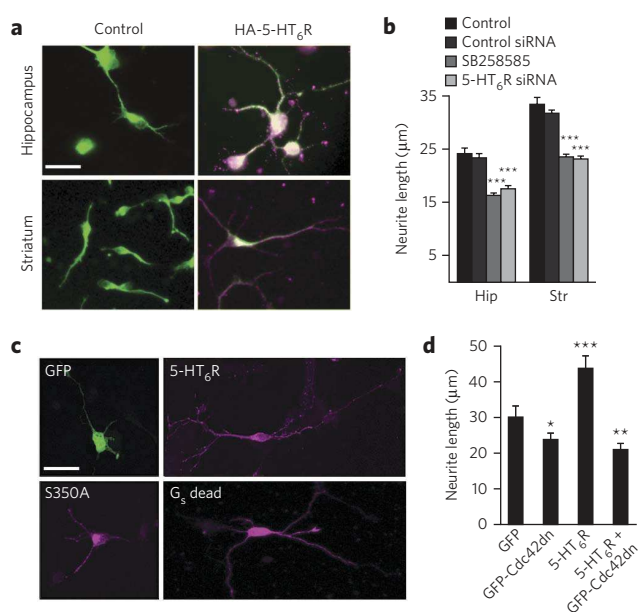


Figure 6 | 5-HT₆Rs promote neurite growth of cultured hippocampal and striatal neurons Primary cultured striatal and hippocampal neurons were infected with viral constructs encoding either HA-tagged 5-HT₆-IRES-GFP or GFP alone. (a) The magenta labeling corresponds to HA staining. Neurite length was measured using the GFP signal. Representative fields of three independent experiments performed on different cultures are illustrated. Neurite length, measured in each experimental condition, is indicated in **Supplementary Figure 9a**. Scale bar, 10 μm. (b) Neurons were transfected with control or 5-HT₆R siRNA and treated with vehicle or SB258585. Data represent mean ± s.e.m. of values obtained in at least three fields of cells from three independent cultures (at least 318 neurites analyzed per condition in the striatum and 297 in the hippocampus). ****P* < 0.001 versus control siRNA. (c) Hippocampal neurons expressing either GFP or HA-tagged wild type, 5-HT₆R^{S350A} or G_s-dead 5-HT₆Rs are illustrated. The magenta labeling corresponds to HA staining of 5-HT₆Rs. Neurite length, measured in each experimental condition, is indicated in **Supplementary Figure 9c**. Scale bar, 10 μm. (d) Neurite length was quantified from hippocampal neurons expressing GFP or GFP-Cdc42dn, alone or in combination with HA-tagged 5-HT₆Rs, using MAP2 immunostaining. Data represent mean ± s.e.m. of values obtained in at least three fields of cells from three independent cultures (at least 127 neurites analyzed per condition). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 versus GFP-transfected neurons.

ability of SB258585 to impair both the receptor-Cdk5 physical interaction and neurite growth suggests that this interaction might be essential for 5-HT₆R-elicited neuronal differentiation.

In an attempt to identify downstream substrates of Cdk5 associated with the 5-HT₆R and underlying its effect upon neuronal differentiation, we found that Cdk5 phosphorylated the receptor itself at Ser350 located in the receptor C-terminal domain and that this phosphorylation event was required for receptor-elicited neurite growth. These findings suggest a reciprocal interplay between 5-HT₆Rs and Cdk5, whereby the latter not only participates in receptor-operated signaling but also behaves as an upstream 5-HT₆R activator to promote neuronal differentiation. They also provide what is to our knowledge one of the first examples of modulation of GPCR constitutive activity by a GPCR-interacting protein, Cdk5. To our knowledge, the only other example is the modulation of agonist-independent activity of group I metabotropic glutamate receptors (mGluR1a and mGluR5) by the constitutively expressed Homer3 protein²⁶. In contrast to the effects of Cdk5 described here, association of Homer3 with the C-terminal domain of mGluR1a or

mGluR5 prevents agonist-independent activation of these receptors, whereas the activity-dependent short Homer1a isoform behaves as a dominant-negative regulator of the interaction between mGluR1a or mGluR5 and Homer3 and thereby promotes constitutive activity of these receptors²⁶. This particular form of constitutive activity is required for homeostatic scaling, a non-Hebbian form of neuronal plasticity that controls neuronal excitability and informational content of synaptic arrays during change in network activity²⁹. Notably, Cdk5 itself can reinforce interactions between mGluRs and Homer proteins through the phosphorylation of threonine and serine residues (Thr1164 and Ser1167) within the Homer-binding domain of the receptors³⁰. This suggests that Cdk5 might positively or negatively modulate mGluR1a or mGluR5 constitutive activity, depending of the nature of the Homer isoform predominantly associated with the receptor.

The mechanism underlying agonist-independent 5-HT₆R activation by Cdk5 was unexpected because GPCR phosphorylation is generally the initial event triggering receptor desensitization and internalization. Notably, the G_s-adenylyl cyclase pathway, classically activated by 5-HT₆Rs, did not require receptor phosphorylation at Ser350. Rather, several lines of evidence suggest that receptor-elicited Cdk5 and G_s signaling are independent events, associated to different receptor conformational states: the 5-HT₆R^{S350A} mutant fully activated adenylyl cyclase but did not increase neurite growth, whereas 5-HT₆R^{S350D} reproduced the morphogenetic effects of the wild-type receptor but was not capable of coupling to the G_s-adenylyl cyclase pathway. A considerable amount of pharmacological and functional studies, and more recently NMR studies, have shown that GPCRs can adopt many active states³¹. Some of them are stabilized in the presence of an agonist plus a particular G protein or arrestins or by mutations. The present study suggests that at least two active conformations of 5-HT₆Rs exist. One, which requires agonist stimulation, couples to G_s. The other is agonist independent yet requires receptor phosphorylation by Cdk5 to promote neurite growth. Such a phosphorylation-dependent activation of a non-ligand-bound GPCR has already been demonstrated for the pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide type 1 (PAC1) receptor³². However, the activation mode and impact upon receptor signaling are quite different: a receptor tyrosine kinase transactivates PAC1 receptors through their phosphorylation on tyrosine residues, whereas 5-HT₆R activation results from its phosphorylation at a unique serine by a serine/threonine kinase. Moreover, PAC1 receptor phosphorylation promotes G_s-dependent signaling, whereas 5-HT₆R phosphorylation induces G_s-independent signaling.

Phosphorylation of membrane receptors by Cdk5 resulting in modulation of their functional status has also been established for ionotropic receptors and receptor tyrosine kinases (RTKs). For instance, Cdk5 associates with and phosphorylates the NR2A subunit of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors at Ser1232. This phosphorylation event increases NMDA receptor conductance and promotes long-term potentiation induction in CA1 hippocampal pyramidal neurons³³. Cdk5 likewise phosphorylates the BDNF receptor TrkB at Ser478 located in the intracellular juxtamembrane region of TrkB²². Reminiscent of the effect of 5-HT₆R phosphorylation at Ser350, TrkB phosphorylation at Ser478 is a necessary step for BDNF-triggered dendritic growth in primary hippocampal neurons²². Collectively, these findings and the current study suggest that Cdk5 phosphorylates and activates both a RTK and a GPCR to promote neurite growth.

Small GTPases of the Rho family (RhoA, Rac1 and Cdc42) are key regulators of actin cytoskeleton remodeling, and each controls different aspects of neuronal morphogenesis. Rac1 and Cdc42 are positive regulators of neurite growth, whereas RhoA induces stress fiber formation, leading to growth cone collapse and neurite retraction⁸. Moreover, a recent study suggests that Cdc42 is more

specifically involved in early steps of dendrite development, whereas Rac1 is important for late steps of dendritic growth and spine maturation³⁴. Here, we identified Cdc42 as a downstream mediator of neurite growth elicited by the 5-HT₆R–Cdk5 complex, corroborating previous findings indicating involvement of Cdc42 in neurite growth elicited by BDNF (via the phosphorylation of TrkB by Cdk5)²² and activation of the 5-HT₇ receptor³⁵. Contrasting to the effects mediated by the TrkB and 5-HT₇ receptors, which require receptor activation by a ligand, 5-HT₆R-induced Cdc42 activation to promote neurite growth was agonist independent. Moreover, TrkB activation increased the number of primary dendrites and did not affect neurite length and branching²², whereas 5-HT₆Rs selectively increased neurite length. Therefore, activation of membrane receptors (either RTKs or GPCRs) through their phosphorylation by Cdk5 might confer specificity for the morphogenetic effects of Cdk5 and Cdc42.

The identification of WAVE1, another Cdk5 substrate controlling dendritic spine morphogenesis¹⁴, in the 5-HT₆R complex suggests that, beyond shaping neuronal morphology, 5-HT₆R-operated Cdk5 signaling might also function to modulate synaptogenesis¹². However, as outlined above, much remains to be deciphered regarding cellular events intervening between Cdk5-mediated phosphorylation of 5-HT₆Rs and modulation of developmental processes such as neurite growth, with even the intriguing possibility that Cdk5-mediated phosphorylation itself modifies the interaction of 5-HT₆Rs with its protein partners.

Finally, from a pathophysiological perspective, it would be of interest to further examine the functional significance of Cdk5-mediated phosphorylation of 5-HT₆Rs to developmental processes and to establish whether this mechanism is disrupted in CNS disorders such as schizophrenia. The precise functional and pathophysiological significance of Cdk5-mediated phosphorylation of 5-HT₆Rs and the cellular cascades ultimately leading to neurite growth and to other receptor-controlled processes perturbed in developmental disorders, such as neuronal migration⁷, will be of considerable interest to explore in future studies. Inasmuch as Cdk5 and 5-HT₆Rs are also both implicated in cellular events related to the pathogenesis and potentially the treatment of Alzheimer's disease^{36,37}, possible interactions between 5-HT₆Rs and Cdk5 at later stages of life also warrant exploration.

Received 14 November 2013; accepted 30 April 2014;
published online 1 June 2014

METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

References

- Gaspar, P., Cases, O. & Maroteaux, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 1002–1012 (2003).
- Lesch, K.P. & Waider, J. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron* **76**, 175–191 (2012).
- Mitchell, E.S. & Neumaier, J.F. 5-HT₆Rs: a novel target for cognitive enhancement. *Pharmacol. Ther.* **108**, 320–333 (2005).
- Millan, M.J. *et al.* Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 141–168 (2012).
- Marcos, B., Cabero, M., Solas, M., Aisa, B. & Ramirez, M.J. Signalling pathways associated with 5-HT₆Rs: relevance for cognitive effects. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **13**, 775–784 (2010).
- Millan, M.J., Marin, P., Bockaert, J. & Mannoury la Cour, C. Signaling at G protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 454–464 (2008).
- Riccio, O. *et al.* Excess of serotonin affects embryonic interneuron migration through activation of the serotonin receptor 6. *Mol. Psychiatry* **14**, 280–290 (2009).
- Chen, C., Wirth, A. & Ponimaskin, E. Cdc42: an important regulator of neuronal morphology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 447–451 (2012).
- Meffre, J. *et al.* 5-HT₆ receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. *EMBO Mol Med* **4**, 1043–1056 (2012).
- Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A. & Fagni, L. The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* **546**, 65–72 (2003).
- Jessberger, S., Gage, F.H., Eisch, A.J. & Lagace, D.C. Making a neuron: Cdk5 in embryonic and adult neurogenesis. *Trends Neurosci.* **32**, 575–582 (2009).
- Lalio, V., Pulido, D. & Sandoval, I.V. Cdk5, the multifunctional surveyor. *Cell Cycle* **9**, 284–311 (2010).
- Ceglia, L., Kim, Y., Nairn, A.C. & Greengard, P. Signaling pathways controlling the phosphorylation state of WAVE1, a regulator of actin polymerization. *J. Neurochem.* **114**, 182–190 (2010).
- Kim, Y. *et al.* Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature* **442**, 814–817 (2006).
- Ko, J. *et al.* p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J. Neurosci.* **21**, 6758–6771 (2001).
- Engmann, O. *et al.* Schizophrenia is associated with dysregulation of a Cdk5 activator that regulates synaptic protein expression and cognition. *Brain* **134**, 2408–2421 (2011).
- Dolezal, V., Lisa, V., Diebler, M.F., Kasparova, J. & Tucek, S. Differentiation of NG108-15 cells induced by the combined presence of dbcAMP and dexamethasone brings about the expression of N and P/Q types of calcium channels and the inhibitory influence of muscarinic receptors on calcium influx. *Brain Res.* **910**, 134–141 (2001).
- Zhang, J. *et al.* Effects of mutations at conserved TM II residues on ligand binding and activation of mouse 5-HT₆R. *Eur. J. Pharmacol.* **534**, 77–82 (2006).
- Clayson, S., Sebben, M., Becamel, C., Bockaert, J. & Dumuis, A. Novel brain-specific 5-HT₄ receptor splice variants show marked constitutive activity: role of the C-terminal intracellular domain. *Mol. Pharmacol.* **55**, 910–920 (1999).
- Nikolic, M., Dudek, H., Kwon, Y.T., Ramos, Y.F. & Tsai, L.H. The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev.* **10**, 816–825 (1996).
- Chemin, J., Nargeot, J. & Lory, P. Neuronal T-type $\alpha 1H$ calcium channels induce neuritegenesis and expression of high-voltage-activated calcium channels in the NG108-15 cell line. *J. Neurosci.* **22**, 6856–6862 (2002).
- Cheung, Z.H., Chin, W.H., Chen, Y., Ng, Y.P. & Ip, N.Y. Cdk5 is involved in BDNF-stimulated dendritic growth in hippocampal neurons. *PLoS Biol.* **5**, e63 (2007).
- Nakamura, T., Kurokawa, K., Kiyokawa, E. & Matsuda, M. Analysis of the spatiotemporal activation of rho GTPases using Raichu probes. *Methods Enzymol.* **406**, 315–332 (2006).
- Itoh, R.E. *et al.* Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6582–6591 (2002).
- Hamon, M. *et al.* Antibodies and antisense oligonucleotide for probing the distribution and putative functions of central 5-HT₆Rs. *Neuropsychopharmacology* **21**, 68S–76S (1999).
- Ango, F. *et al.* Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* **411**, 962–965 (2001).
- Takahashi, S., Saito, T., Hisanaga, S., Pant, H.C. & Kulkarni, A.B. Tau phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5/p39 during brain development reduces its affinity for microtubules. *J. Biol. Chem.* **278**, 10506–10515 (2003).
- Swiech, L., Perycz, M., Malik, A. & Jaworski, J. Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 116–132 (2008).
- Hu, J.H. *et al.* Homeostatic scaling requires group I mGluR activation mediated by Homer1a. *Neuron* **68**, 1128–1142 (2010).
- Orlando, L.R. *et al.* Phosphorylation of the homer-binding domain of group I metabotropic glutamate receptors by cyclin-dependent kinase 5. *J. Neurochem.* **110**, 557–569 (2009).
- Nygaard, R. *et al.* The dynamic process of β_2 -adrenergic receptor activation. *Cell* **152**, 532–542 (2013).
- Delcourt, N. *et al.* PACAP type I receptor transactivation is essential for IGF-1 receptor signalling and antiapoptotic activity in neurons. *EMBO J.* **26**, 1542–1551 (2007).
- Li, B.S. *et al.* Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12742–12747 (2001).
- Vadodaria, K.C., Brakebusch, C., Suter, U. & Jessberger, S. Stage-specific functions of the small Rho GTPases Cdc42 and Rac1 for adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* **33**, 1179–1189 (2013).
- Kvachina, E. *et al.* 5-HT₇ receptor is coupled to G α subunits of heterotrimeric G12-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology. *J. Neurosci.* **25**, 7821–7830 (2005).

36. Lopes, J.P. & Agostinho, P. Cdk5: multitasking between physiological and pathological conditions. *Prog. Neurobiol.* **94**, 49–63 (2011).
37. Upton, N., Chuang, T.T., Hunter, A.J. & Virley, D.J. 5-HT₆R antagonists as novel cognitive enhancing agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **5**, 458–469 (2008).

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (Contract Equipe FRM2009), Fondation FondaMental (fondation de coopération scientifique), ANR (contract no. ANR-11-BSV4-0008), CNRS, INSERM, University Montpellier 1 and la Région Languedoc-Roussillon. F.D. was a recipient of a fellowship from Fonds National de la Recherche (Luxembourg). MS analyses were performed using the facilities of the Functional Proteomic Platform of Montpellier Languedoc-Roussillon, and confocal microscopy was performed using the facilities of Montpellier RIO Imaging Platform. The BRET and 96-well FRET experiments were performed using the

ARPEGE Pharmacology Screening Interactome platform facility (Institut de Génétique Fonctionnelle de Montpellier).

Author contributions

C.M.I.C., M.J.M., J.B., P.M. and S.C.-D. designed experiments; M.S. performed MS experiments, F.D. and F.R. studied neurite growth in neuronal cultures and explants; F.D., S.M.-L. and S.C.-D. performed BRET and FRET experiments; S.C.-D. and P.M. performed calcium imaging experiments; F.D., P.D. and S.C.-D. performed biochemistry experiments; M.J.M., P.M. and S.C.-D. wrote the manuscript.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

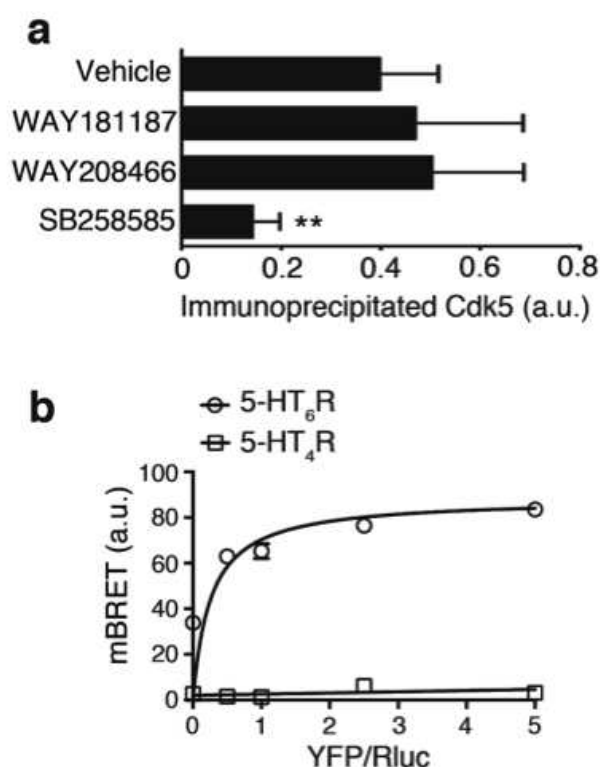
Additional information

Supplementary information is available in the [online version of the paper](#). Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.M. and S.C.-D.

Supplementary Results

Cdk5 induces constitutive activation of 5-HT₆ receptors to promote neurite growth

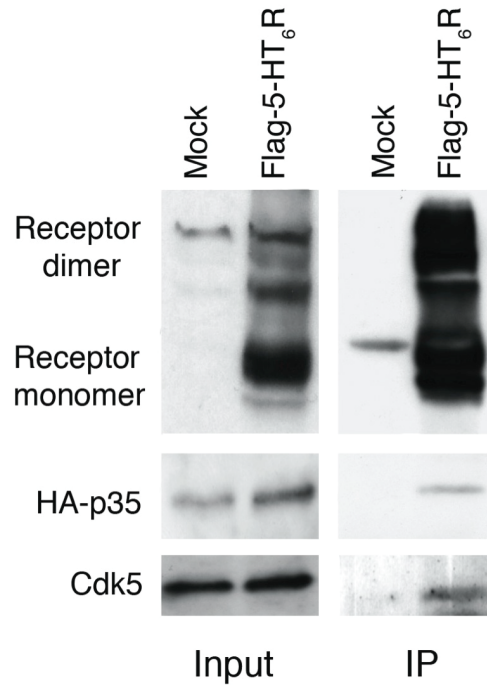
Fanny Duhr^{1,3}, Paul Délèris^{1,3}, Fabrice Raynaud^{1,3}, Martial Séveno^{1,3}, Séverine Morisset-Lopez⁴, Clotilde Mannoury la Cour⁵, Mark J. Millan⁵, Joël Bockaert^{1,3}, Philippe Marin^{1,3*}, Séverine Chaumont-Dubel^{1,3*}



Supplementary Figure 1. The 5-HT₆R/Cdk5 interaction is specific and modulated by SB258585

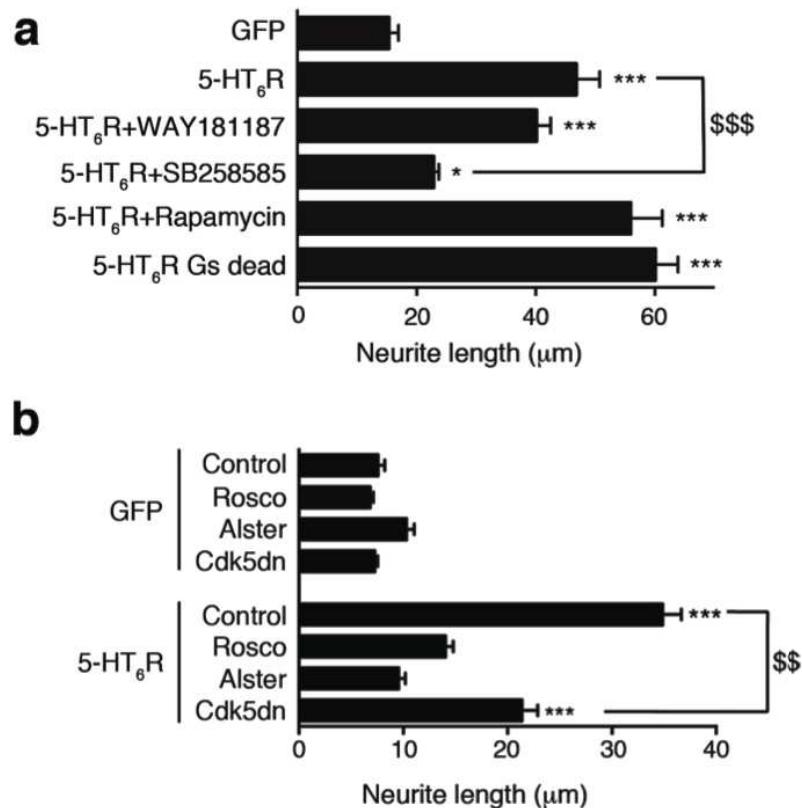
a. The histogram represents the results of densitometric analyses of Cdk5 co-immunoprecipitated with the 5-HT₆R, from cells treated with either vehicle or WAY 181187 (1 μ M) or WAY 208466 (1 μ M) or SB258585 (10 μ M). Data are means $\pm$ SEM, n = 3 independent experiments. ** p<0.01 vs. vehicle.

b. NG108-15 cells were co-transfected with plasmids encoding Cdk5-Rluc and either YFP-tagged 5-HT₆R or YFP-tagged 5-HT₄R. Titration curves of Cdk5-Rluc/5-HT₆-YFP and Cdk5-Rluc/5-HT₄-YFP interactions are illustrated. Data are means $\pm$ SEM of quadruplicate determinations performed in a representative experiment. Three other experiments performed on different sets of cultured cells yielded similar results.



Supplementary Figure 2. The 5-HT₆R recruits the Cdk5-p35 complex

Co-immunoprecipitation of Cdk5 and HA-tagged p35 with Flag-tagged 5HT₆ receptors expressed in NG 108-15 cells. The inputs represent 5% of the total protein amount used for immunoprecipitations. The 5-HT₆R and p35 were detected using anti-Flag and anti-HA antibodies respectively. A gel representative of three independent experiments performed on different sets of cultured cells is illustrated.



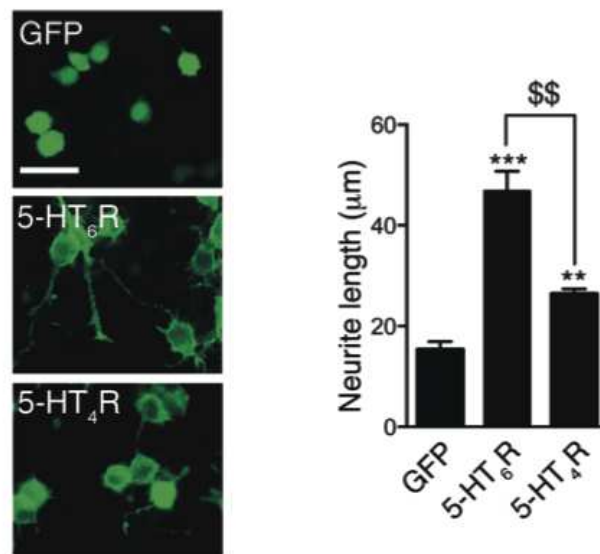
Supplementary Figure 3. 5-HT₆R expression induces neurite growth of NG105-15 cells through a Cdk5-dependent mechanism

a. NG108-15 cells were transfected with plasmids encoding either GFP alone or wild type YFP-tagged 5-HT₆R or YFP-tagged Gs dead mutant. When indicated, they were treated for 24 h with either WAY181187 (1 μM) or SB258585 (10 μM) or Rapamycin (100 nM). The histogram shows the quantification of neurite length, performed in at least three fields of cells originating from three independent cultures (at least 35 neurites analyzed per condition). Data are means ± SEM. **p*<0.05 and ****p*<0.001 vs. GFP, \$\$\$ *p*<0.001.

b. NG108-15 cells were co-transfected with a plasmid encoding either GFP alone or wild type YFP-tagged 5-HT₆R and either an empty vector or a plasmid encoding m-cherry-tagged Cdk5 dominant-negative mutant (Cdk5dn). Roscovitine (Rosco, 50 μM) and Asterpaullone (Alster, 25 μM) were added immediately after transfection for 24 h. The histogram shows the quantification of neurite length performed in at least three fields of cells from three

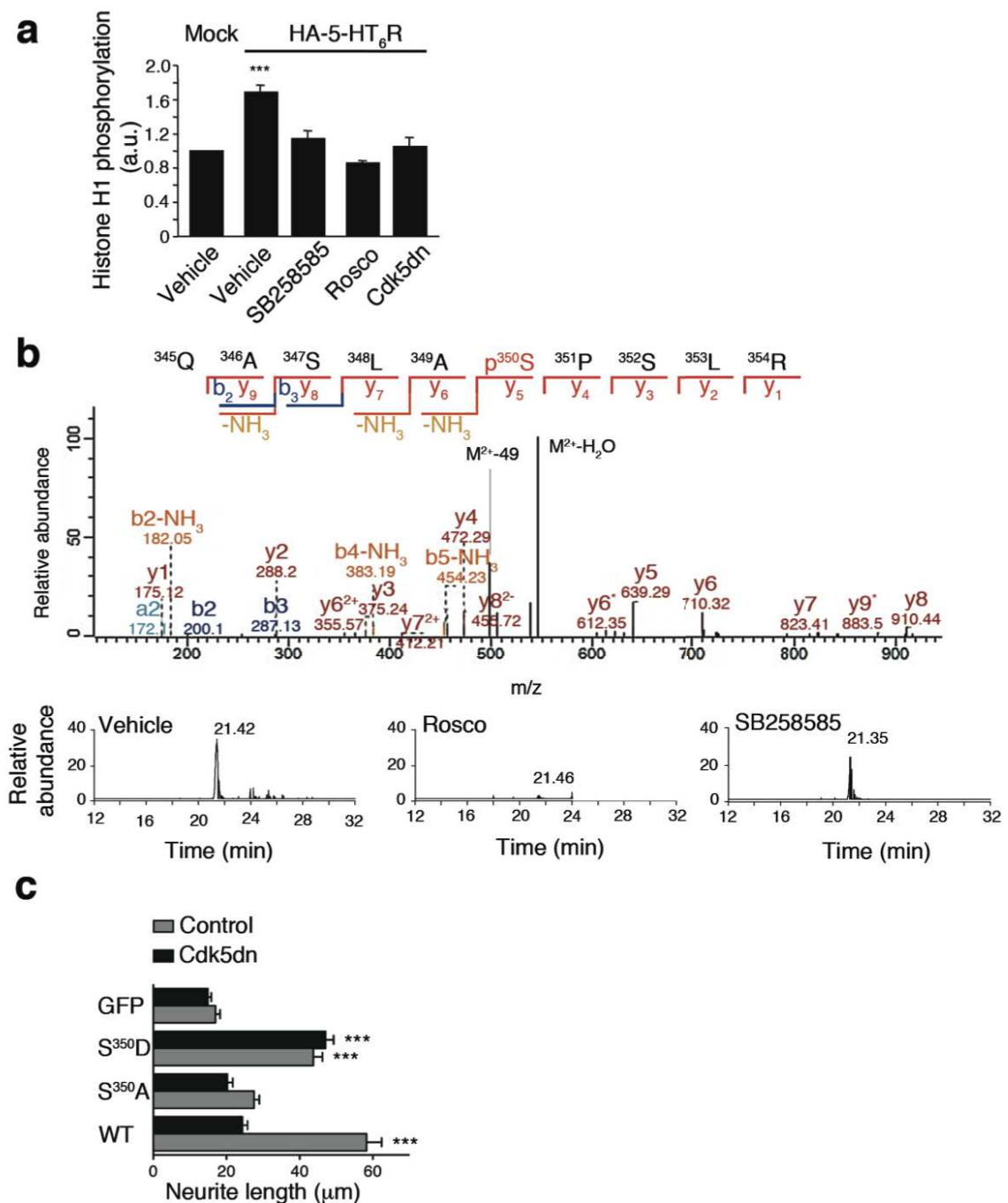
independent cultures (at least 70 neurites analyzed per condition). Data are means $\pm$ SEM.

*** $p < 0.001$ vs. cells expressing GFP alone and treated with vehicle (Control), \$\$ $p < 0.01$.



Supplementary Figure 4. Neurite growth is induced by 5-HT₆R but not 5-HT₄R

NG108-15 cells were transfected with plasmids encoding either GFP or YFP-tagged 5-HT₆R or 5-HT₄R. A field representative of three independent experiments performed on different cultures is illustrated. Scale bar = 10 μm. Neurite length was quantified in a minimum of three fields of cells originating from the three independent cultures (at least 60 cells analysed per condition) using the Image J software. Data are means ± SEM. **p<0.01 and ***p<0.001 vs. GFP, \$\$ p<0.01.

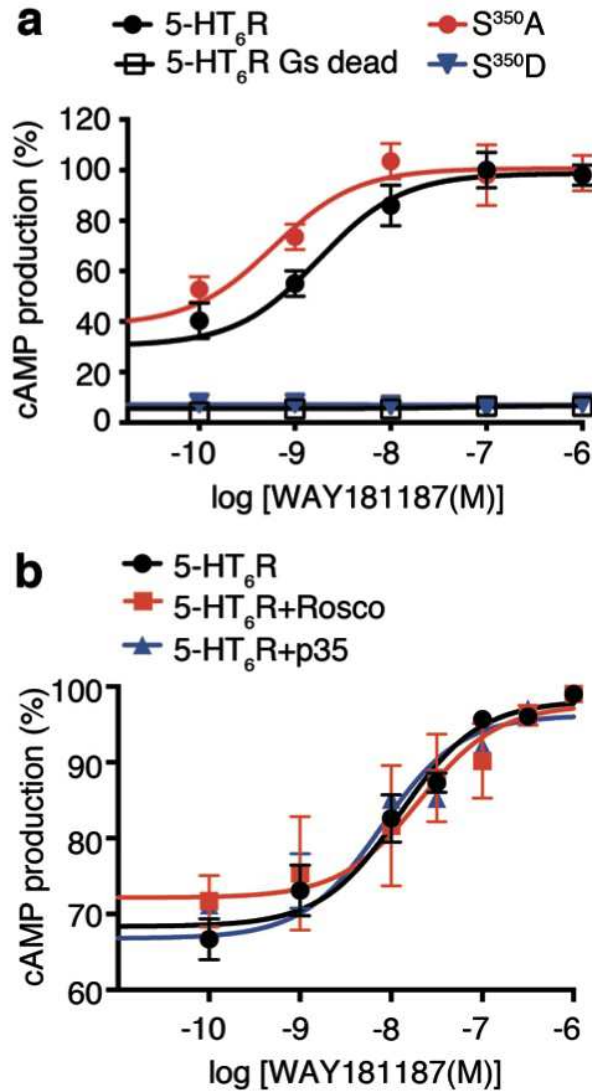


Supplementary Figure 5. Cdk5 phosphorylates the 5-HT₆R at Ser³⁵⁰: role in receptor-elicited neurite growth

a. Quantification of Histone H1 phosphorylation by 5-HT₆R-associated Cdk5. The histogram shows the quantification performed in three independent experiments. Data are means ± SEM. ***p<0.001 vs. vehicle in Mock cells.

b. MS/MS spectrum resulting from collision-induced dissociation fragmentation of the QASLAp³⁵⁰SPSLR peptide is depicted. The Maxquant score for this peptide was 133.81. Extracted ion chromatograms (XICs) of the QASLAp³⁵⁰SPSLR peptide ion originating from NG108-15 cells expressing 5-HT₆R and treated with either vehicle or roscovitine (50 μ M) or SB258585 (10 μ M) are represented.

c. NG108-15 cells were co-transfected with a plasmid encoding either GFP or YFP-tagged versions of wild type or S³⁵⁰A or S³⁵⁰D 5-HT₆R and either an empty vector (Control) or a plasmid encoding m-cherry-tagged Cdk5. The histogram represents the quantification of neurite length from at least three fields of cells from three independent cultures (at least 114 neurites analysed per condition). Data are means $\pm$ SEM. ***p<0.001 vs. cells expressing GFP alone.

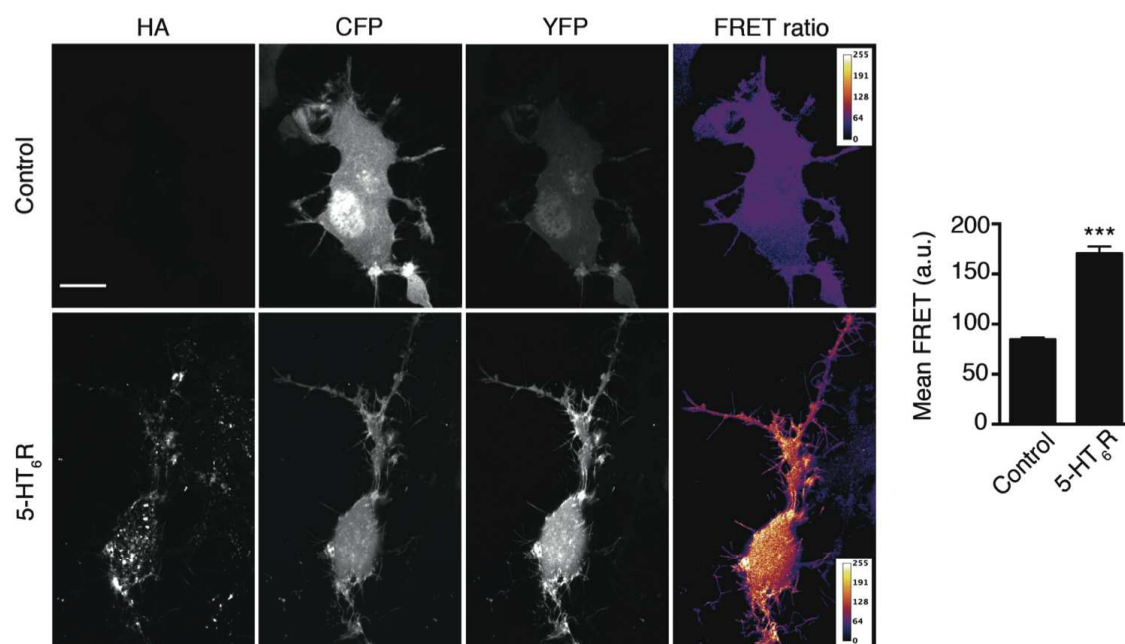


Supplementary Figure 6. Impact of Cdk5 activity and of Ser³⁵⁰ phosphorylation on 5-HT₆R-operated Gs signalling in NG108-15 cells

a. NG108-15 cells were transfected with plasmids encoding HA-tagged versions of either wild-type or S³⁵⁰A or S³⁵⁰D 5-HT₆R or with a plasmid encoding GFP-tagged receptor mutant not capable of activating Gs-adenylyl cyclase (5-HT₆R Gs dead). Forty eight hours after transfection, cells were exposed for 5 min to the indicated concentrations of WAY181187. cAMP production was analysed in a minimum of three independent cultures. Data, expressed

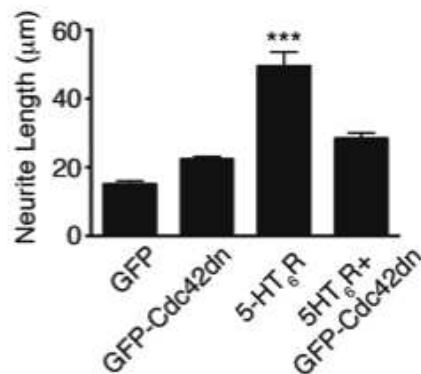
in % of maximal cAMP production elicited by WAY181187, are means $\pm$ SEM of values obtained in a representative experiment performed in triplicate.

b. NG108-15 cells were transfected with a plasmid encoding the wild-type receptor alone or in combination with a plasmid encoding the Cdk5 activator p35. Cells expressing the 5-HT₆R alone were also exposed to roscovitine (Rosco, 50 μ M). Data, expressed in % of maximal cAMP production elicited by WAY181187, are means $\pm$ SEM of values obtained in a representative experiment performed in triplicate. Two other experiments yielded similar results.



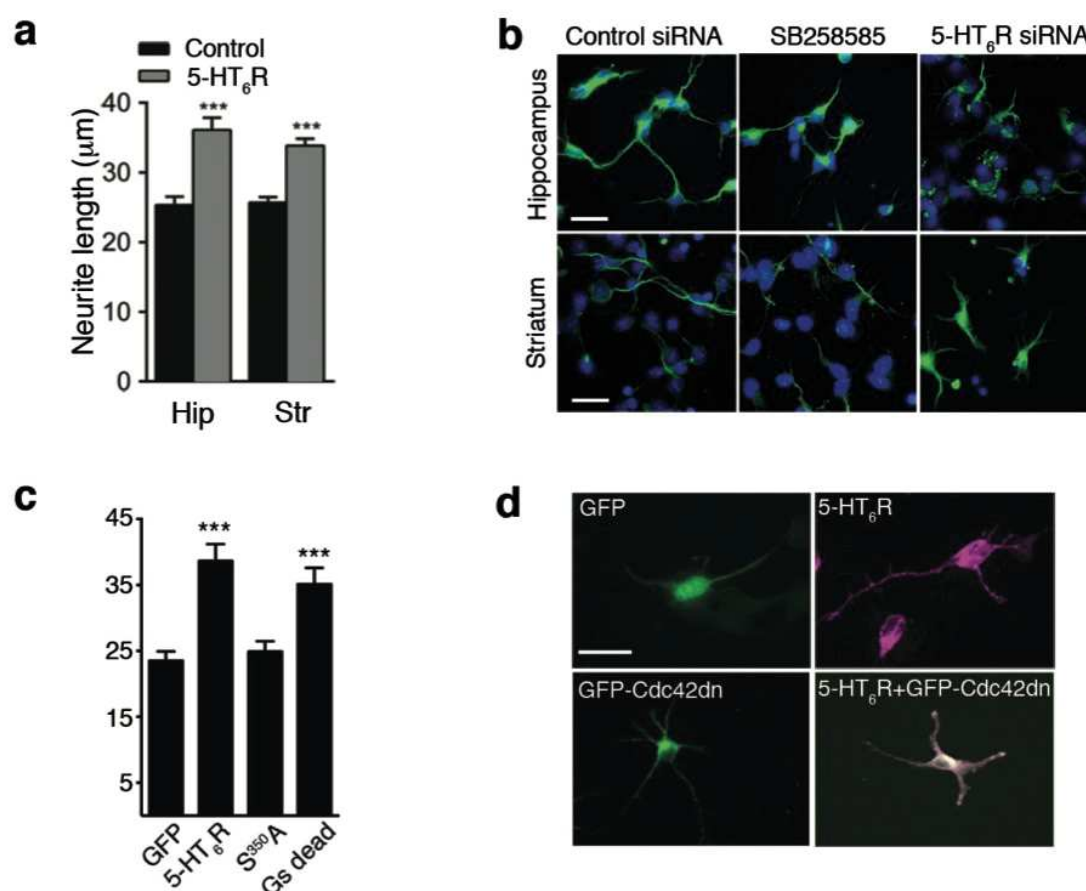
Supplementary Figure 7. Single cell FRET analysis of 5-HT₆R-operated Cdc42 signalling

FRET was measured in NG108-15 cells transfected with a plasmid encoding the Cdc42 Raichu probe alone or in combination with a plasmid coding for the HA-tagged 5-HT₆R. Receptor expression was assessed by HA immunostaining. Representative images of the CFP and YFP signal were obtained using spectral imaging and linear unmixing. The FRET image shows the ratio between YFP and CFP in false color. Scale bar = 10 μ m. Mean FRET values of at least 15 cells from three different transfection experiments are represented in the histogram as means $\pm$ SEM. *** p <0.001 *vs.* cells expressing the Raichu probe alone.



Supplementary Figure 8. Cdc42 dominant negative expression impairs 5-HT₆R-elicited neurite growth

NG108-15 cells were co-transfected with a plasmid encoding HA-5-HT₆R in combination with either GFP or a GFP-tagged Cdc42 dominant negative (GFP-Cdc42dn) construct. The histogram shows neurite length, measured using the GFP signal (at least 35 neurites analysed in each condition). Data are means $\pm$ SEM of values obtained in three fields of cells originating from three independent cultures. *** $p < 0.001$ vs. GFP condition.



Supplementary Figure 9. 5-HT₆Rs promote neurite growth of cultured hippocampal and striatal neurons

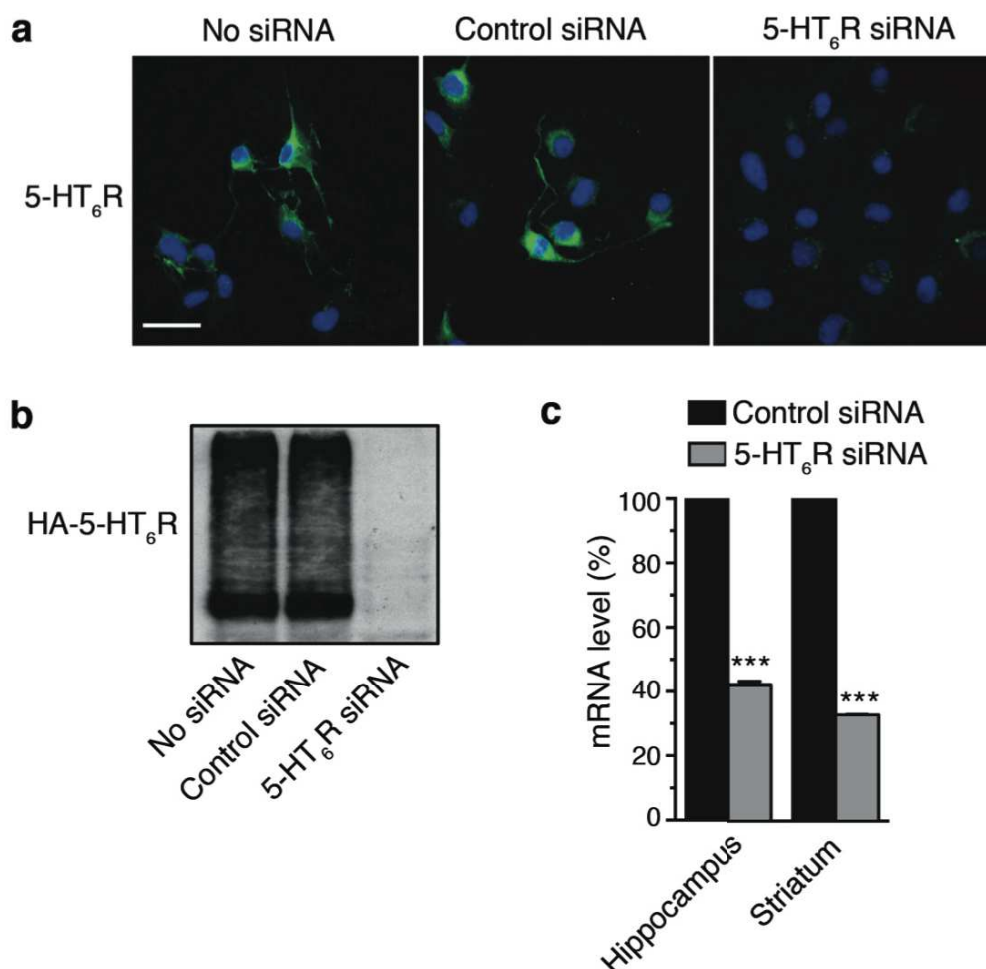
a. Striatal and hippocampal neurons were infected with viral constructs encoding either HA-tagged 5-HT₆-IRES-GFP or GFP. The histogram represents neurite length measured using the GFP signal. Data are means $\pm$ SEM of values obtained in at least three fields of cells originating from three independent cultures (at least 248 neurites analysed per condition in the hippocampus (Hip) and 410 in the striatum (Str)). *** $p < 0.001$ vs. neurons expressing GFP alone (Control).

b. Striatal and hippocampal neurons were transfected with control or 5-HT₆R siRNA 4 h after seeding and then grown for 20 h. Neurons were also treated for 24 h with vehicle or SB258585 (10 μ M). Cells were immunostained with an anti-MAP2 antibody to visualize neurites and nuclei were stained with Hoechst 33,342. Representative fields of three

independent experiments performed on different sets of cultured neurons are illustrated. Scale bar = 10 μ m.

c. Hippocampal neurons were transfected with plasmids encoding GFP or HA-tagged versions of either wild type or S³⁹⁰A or Gs dead 5-HT₆Rs. Neurite length values, estimated using MAP2 immunostaining, are means $\pm$ SEM of values obtained in at least three fields of cells from three independent cultures (at least 118 neurites analysed per condition) ***p<0.001 vs. GFP transfected neurons.

d. Hippocampal neurons expressing GFP or GFP-Cdc42dn, alone or in combination with HA-tagged 5-HT₆Rs, are shown. The magenta labelling corresponds to HA staining of 5-HT₆Rs. Scale bar = 10 μ m.

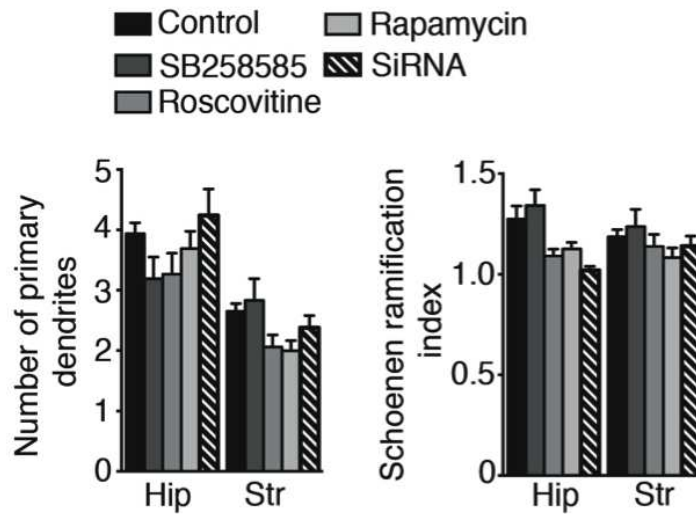


Supplementary Figure 10. Validation of 5-HT₆R siRNA

a and b. NG108-15 cells were co-transfected with a plasmid encoding YFP-tagged 5-HT₆R (**a**) or HA-tagged 5-HT₆R (**b**) and either a control siRNA or a siRNA targeting 5-HT₆R (5-HT₆R siRNA). In **a**, cells were fixed 24 h after transfection and 5-HT₆R expression was assessed by YFP staining. A field representative of three independent experiments performed on different cultures is illustrated. Scale bar = 10 μ m. In **b**, expression of 5-HT₆Rs was analysed by Western blotting using an anti-HA antibody. A gel representative of three independent experiments is illustrated (50 μ g of total cell lysate were used for each condition).

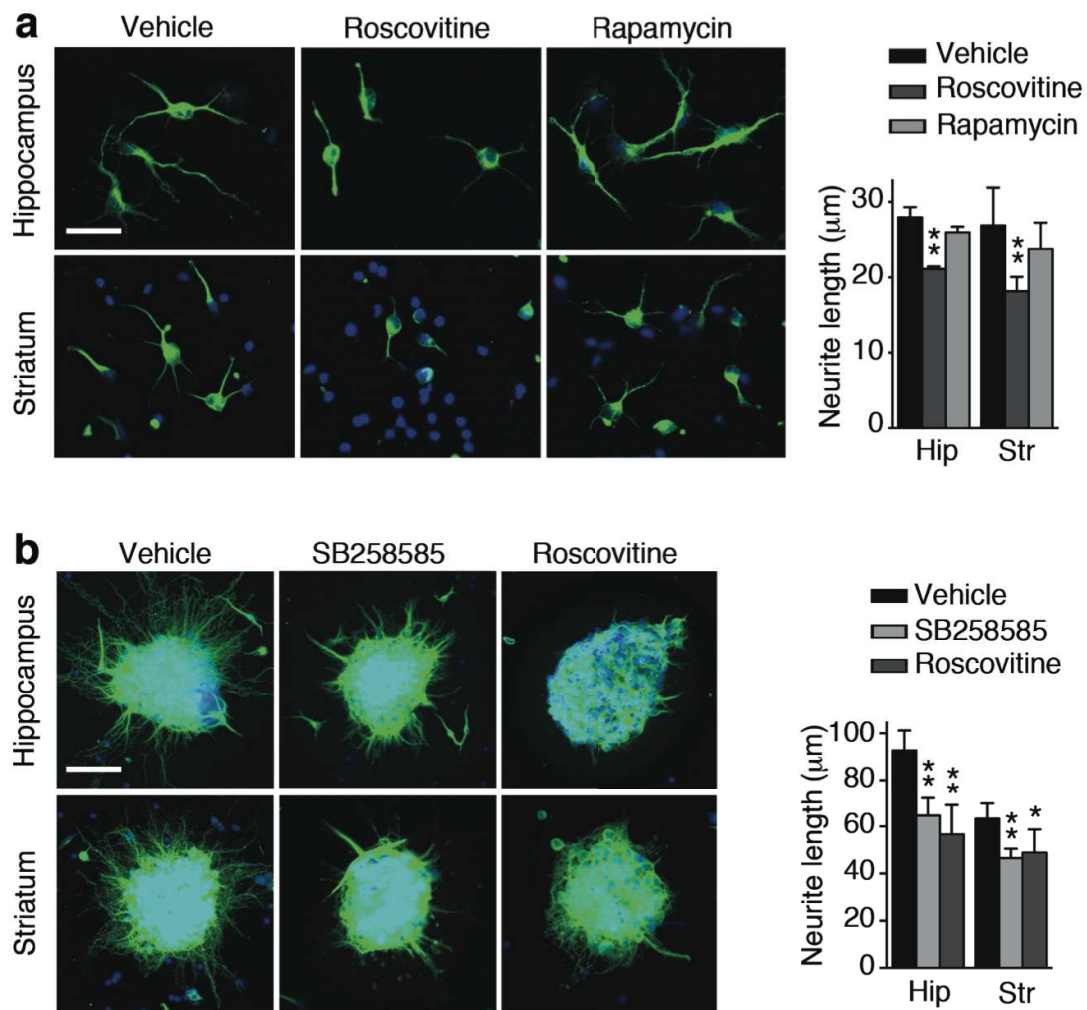
c. Primary cultures of striatal or hippocampal neurons were transfected with either control or 5-HT₆R siRNA 4 h after seeding and mRNAs were extracted 44 h after transfection.

Quantification of 5-HT₆R mRNA in neurons was performed by qPCR. Data are expressed as percentage of 5-HT₆R mRNA expression in neurons transfected with the control siRNA. ***p<0.001 *vs.* control siRNA-transfected neurons.



Supplementary Figure 11. The 5-HT₆R/Cdk5 pathway does not affect the number of primary neurites nor their complexity in cultured hippocampal or striatal neurons

Striatal and hippocampal neurons were treated for 24 h with either vehicle or SB258585 (10 μ M), or rocovitine (50 μ M) or rapamycin (100 nM). They were also transfected with 5-HT₆R siRNA 4 h after seeding and then grown for 20 h. They were then immunostained with an anti-MAP2 antibody to visualize neurites and nuclei were stained with Hoechst 33,342. The histograms show the number of primary dendrites and the Schoenen ramification index, as determined by Sholl analysis. Data are expressed as means $\pm$ SEM. A minimum of three different cultures was used for Sholl analysis.

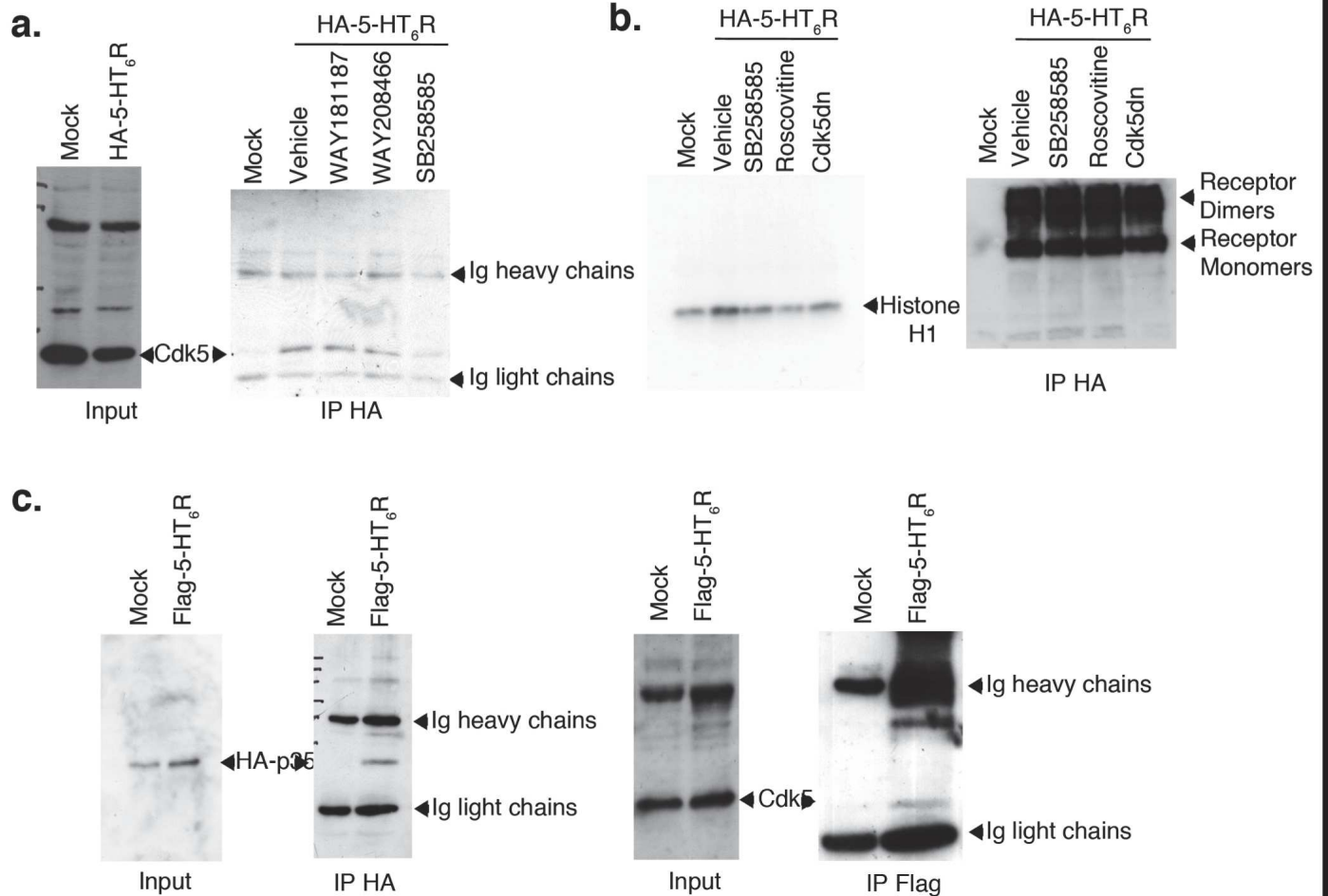


Supplementary Figure 12. Impact of the 5-HT₆R/Cdk5 pathway upon neurite growth in cultured dissociated neurons and explants from hippocampus and striatum

a. Primary cultures of striatal and hippocampal neurons were treated for 24 h with either vehicle or roscovitrine (50 μM) or rapamycin (100 nM). A field representative of three independent experiments performed on different sets of cultured neurons is illustrated. Scale bar = 10 μm . The histogram represents the quantification of neurite length in the corresponding experiments (at least 497 neurites analysed per condition) and data are expressed as means $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$ vs. vehicle.

b. Hippocampal and striatal explants were treated for 24 h with either vehicle or SB258585 (20 μM) or roscovitrine (50 μM). Representative images of the explants labeled with MAP2 (green) and Hoechst 33,342 (blue) are shown on the left panel. Scale bar = 50 μm . Neurite length was determined by Sholl analysis (see “Online Methods”) on a least 15 explants from

three different preparations, and quantification is shown in the histogram on the right panel. Data are expressed as means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ *vs.* vehicle-treated explants.



Supplementary Figure 13. Full blots corresponding to cut blots shown in the different figures

a. Full blots corresponding to Cdk5 cut blots presented in Fig. 1c

b. Full membrane corresponding to the histone H1 autoradiography and the HA-5HT₆R western-blot shown in Fig. 4a

c. Full blots corresponding to the p35 and Cdk5 cut blots shown in Supplementary Fig. 2

Supplementary Table 1: Proteins interacting with the 5-HT₆R C-terminus and identified by tandem mass spectrometry

Protein ID	UniProt Acc	Approved protein name	Peptides	Coverage (%)
5HT6R_MOUSE	Q9R1C8	5-hydroxytryptamine receptor 6	5	7.7
2AAA_MOUSE	Q76MZ3	Serine/threonine-protein phosphatase 2A	18	36.3
ACADL_MOUSE	P21174	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	11	26.7
AIFM1_MOUSE	Q9Z0X1	Apoptosis inducing factor 1	17	28.9
AL1B1_MOUSE	Q6UB35	Aldehyde dehydrogenase X	8	23.7
AP3M2_MOUSE	Q8R2R9	AP-3 complex subunit mu-2	8	30.4
CDK5_MOUSE	P49615	Cyclin-dependent kinase 5	7	23.6
DNJA1_MOUSE	P63037	DnaJ protein homolog 2	5	18.1
EFTU_MOUSE	Q8BFR5	Elongation Factor Tu	11	30.1
ERMIN_MOUSE	Q5EBJ4	Ermin	4	22.1
FLOT1_MOUSE	Q08917	Flotilin 1	6	17.1
GGT7_MOUSE	Q99JP7	Gamma glutamyl transferase 7	6	15.3
GNA11_MOUSE	P21278	G alpha 11	6	27.1
GRIN1_MOUSE	Q3UNH4	G protein Regulated Inducer of Neurite Outgrowth 1	14	21
IMPCT_MOUSE	O55091	Imprinted and ancient gene protein (IMPACT)	6	25.8
KAP0_MOUSE	Q9D8C7	cAMP dependant protein kinase type 1	6	18.6
KBTBB_MOUSE	Q8BNW9	Kelch repeat and BTB domain protein	8	14.5
MAON_MOUSE	Q8BMF3	NADP-dependant malic enzyme	13	32.9
MK01_MOUSE	P63085	Mitogen-activated protein kinase 1	11	37.2
OLA1_MOUSE	Q9CZ30	Obg-like ATPase 1	8	24
OPA1_MOUSE	P58281	Dynamin-like 120kDa protein	13	18.5
PADI2_MOUSE	Q08642	Protein-arginine deiminase type-2	14	26
PALM_MOUSE	Q9Z0P4	Paralemmin	13	42
PCBP1_MOUSE	P60335	Poly(Rc)-binding protein 1	8	36.5
PMM1_MOUSE	Q35621	Phosphomannomutase 1	5	24.4
PPM1A_MOUSE	P49443	Protein phosphatase 1A/PP2C alpha	7	20.7
PPTC7_MOUSE	Q6NVE9	Protein phosphatase PTC7 homolog/TA-PP2C	6	24.5
PRUNE_MOUSE	Q8BIW1	Protein prune homolog	8	25.6
RCN2_MOUSE	Q8BP92	Reticulocalbin-2	13	53.4
RHEB_MOUSE	Q540E6	Protein Rheb	7	33.7
SAHH2_MOUSE	Q80SW1	Putative adenosylhomocysteinase 2	6	12.5
SYNC_MOUSE	Q8BP47	Asparaginyl-tRNA synthetase	13	25.4
THIKA_MOUSE	Q921H8	3-ketoacyl-CoA thiolase A	9	36.3
THTM_MOUSE	Q99J99	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	14	54.9
TXNL1_MOUSE	Q8CDN6	Thioredoxin-like protein 1	8	40.1
VAT1_MOUSE	Q62465	Synaptic vesicle membrane protein 1	10	30.8
VP26B_MOUSE	Q8C0E2	Vesicle sortin protein 26B	8	25.9
WASF1_MOUSE	Q8R5H6	WASP family protein number 1	9	23.3

The list of proteins identified by MS/MS with two peptides or more in each of the four replicate experiments (and not detected in control pull-downs) is depicted. For each protein, the number of unique peptides identified in one replicate experiment (the one yielding the

maximal number of peptides identified) and the corresponding sequence coverage (in % of total amino acid number) are indicated.

Supplementary Table 2. Results of MS/MS analyses.

SHIRI: 11 peptides, Peptide coverage: 32.7 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	407	431	53.1	827.48	2778.42	2778.42	1	R.DPPPTTRAPTAVNFFVTDSEVEIR.Q
2	414	431	128.5	1010.52	2019.03	2019.03	0	R.APTVNVFFVTDSEVEIR.Q
3	414	440	45.1	994.5	2080.48	2080.48	1	R.APTVNVFFVTDSEVEIRCHPLGSPMN
4	414	440	42.9	999.83	2086.47	2086.47	1	R.APTVNVFFVTDSEVEIRCHPLGSPMN + Oxidation (M20)
5	432	440	25.4	498.73	995.45	995.45	0	R.GHPLGSPMN + Oxidation (M8)

ZAAA_MOUSE = ZP2A, subunit A, 16 peptides, Peptide coverage: 36.3 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	35	46	60.7	621.88	1241.74	1241.73	0	K.LSTALALQVER.T
2	114	133	48.5	738.30	2212.13	2212.13	0	R.AISHHEPSDLEAHFYPLVK.R
3	136	144	52.8	555.27	1108.53	1108.53	0	R.LAGGOWFTSR.T
4	199	202	28.8	485.37	928.52	928.52	0	K.VLELDNVK.S
5	203	221	95.9	1069.51	2137.00	2137.00	0	K.SERPMFNLASDEQDSVRL
6	261	272	90.2	736.88	1471.74	1471.74	1	K.VYVAKFTELOK.A
7	281	292	22.6	688.87	1375.72	1375.72	0	K.TDLVPAFQNLMD.D
8	359	374	23.4	622.36	1864.05	1864.05	0	K.DNTIEHLPLFLAQK.D
9	399	416	64.7	963.93	1924.05	1924.05	0	R.QLSGSLPANYELAEADK.W
10	473	485	38.7	749.41	1498.82	1498.81	1	K.FGKEWAHATIPK.V
11	486	498	47.2	736.87	1471.72	1471.72	0	K.VLAMSQDPNYLHR.M
12	486	498	37.9	744.87	1487.72	1487.72	0	K.VLAMSQDPNYLHR.M + Oxidation (M4)
13	520	527	18.3	483.78	965.55	965.55	0	K.HMLPTVLR.M
14	520	527	18.2	491.78	981.54	981.54	0	K.HMLPTVLR.M + Oxidation (M2)
15	528	537	48.7	515.26	1028.51	1028.51	0	R.MAGDPVAVR.F
16	547	566	83.8	1097.62	2193.23	2193.23	0	K.IGPLDNSTLQSEVPLEK.L
17	567	576	20.5	589.79	1159.57	1159.57	0	K.LTQDDVDVYK.Y
18	577	589	53.3	713.39	1424.76	1424.76	0	K.YFAQDALVLSLA

ACADL_MOUSE = LCAD, 11 peptides, Peptide coverage: 29.7 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	52	61	45.5	625.81	1249.61	1249.61	0	R.FSSECHDIR.E
2	66	81	15.8	521.76	2080.02	2080.02	1	R.KFFQEEVIPHTEWEK.A
3	96	108	25.9	578.34	1154.67	1154.67	0	K.GGLLQNAEK.H
4	191	201	33.5	582.29	1162.58	1162.58	0	R.SGSQWLNGSK.V
5	225	240	39.7	595.45	1608.88	1608.88	0	R.SPWHGSLFLVENGWK.Q
6	255	267	70.8	770.87	1539.72	1539.72	0	K.AGDTAELEFEDVRL
7	268	279	43.1	634.85	1267.68	1267.68	0	R.LPANALLGEENK.G
8	268	292	39.0	975.16	2522.46	2522.46	1	R.LPANALLGEENKGFYLMQELPQER.L
9	280	292	25.5	637.40	1672.79	1672.79	0	K.GFYVLMQELPQER.L
10	407	419	25	725.38	1448.74	1448.74	0	R.VQPIGGTNERMK.E
11	407	419	27.8	733.37	1464.73	1464.73	0	R.VQPIGGTNERMK.E + Oxidation (M12)

AFM_MOUSE = apoptosis inducing factor 1, 17 peptides, Peptide coverage: 25.9 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	98	108	46.3	585.30	1158.59	1158.59	0	R.VMGLGLSPEEK.Q
2	98	108	33.3	588.30	1174.59	1174.59	0	R.VMGLGLSPEEK.Q + Oxidation (M2)
3	111	126	17.5	538.30	1611.87	1611.87	1	R.AIASATEGGSPQIR.A
4	112	126	75.0	728.89	1455.77	1455.77	0	R.AIASATEGGSPQIR.A
5	127	147	40.7	679.38	2023.10	2023.10	0	R.APSHWFFLLGGGTAFAAAR.S
6	158	176	31.6	728.40	2182.17	2182.17	0	R.VLVSEDELPYMRPLSK.E
7	177	188	27.9	725.85	1449.68	1449.68	0	K.ELWFSQDPNVTK.T
8	244	254	44	626.32	1250.62	1250.61	0	K.LNDGSGITFEK.C
9	322	338	18.5	623.44	1844.87	1844.87	0	K.SQASQREVQLFPEK.Q
10	362	377	60.6	793.92	1589.82	1589.82	0	K.VMPNAVQSVQVGGRL + Oxidation (M2)
11	362	377	53.9	795.92	1589.83	1589.83	0	K.VMPNAVQSVQVGGRL
12	408	421	52.7	735.85	1469.68	1469.68	0	K.TGGLSDSFGGGR.V
13	422	429	36.0	495.75	899.48	899.48	0	R.VNAELGAR.S
14	516	528	39.4	583.77	1105.54	1105.54	0	K.SATEQSGTGR.S
15	590	605	18.0	613.32	1836.92	1836.92	1	K.IKDGEQHEDELNEAKL
16	593	605	34.5	495.23	1482.68	1482.68	0	K.DGEQHEDELNEAKL
17	606	612	33.2	444.22	886.42	886.42	0	K.LPNHED

ALTB1_MOUSE = aldehyde dehydrogenase X, 8 peptides, Peptide coverage: 21.7 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	118	146	28.9	1268.89	3197.64	3197.64	0	R.VYLASELTDNGK/FQESYVLDSEVK.V
2	198	211	90.1	593.39	1384.78	1384.77	0	K.LAPALATGNTVMK.V
3	212	228	45.7	509.03	1816.04	1816.03	0	K.WAGTPLSALYLAK.E
4	350	371	44	654.41	2580.22	2580.22	1	K.VGNPFELDTQGGPQVDRQER.I
5	397	413	46.3	567.48	1912.95	1912.95	0	R.GFFKPTVFQDQDGMRI
6	414	428	53.2	658.49	1714.97	1714.97	1	R.LAKESFGVQPLFK.F
7	417	428	31.5	702.36	1402.75	1402.75	0	K.EEFGPVQPLFK.F
8	444	453	52.3	634.80	1067.58	1067.58	0	R.YGLAAWFT.RD

APM2_MOUSE = Ap-3 complex subunit mu-2, 8 peptides, Peptide coverage: 30.4 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	142	168	19.0	947.17	2838.50	2838.49	0	R.TVNTITGSTNVGQQLTGLSVIPWR.R
2	174	193	101.6	1181.06	2360.11	2360.11	0	K.YTNNEAFQVVEIDAK.S
3	212	228	72.9	646.30	1691.84	1691.84	0	K.LTGMPLDLSFMNR.L
4	304	318	55.8	701.88	1401.75	1401.75	0	K.TIEGVVTSQMPK.G
5	304	318	47.3	709.88	1417.75	1417.75	0	K.TIEGVVTSQMPK.G + Oxidation (M11)
6	317	337	45.2	1115.06	2229.11	2229.11	0	K.GVLNMSLTPSGTHTFDPTVK.M
7	338	345	16.6	468.24	934.46	934.46	0	K.ALSWDVQK.I
8	358	379	18.2	575.75	2444.24	2444.24	0	K.GTMQLQVQASQDENPTINLQFK.I

CDK5_MOUSE = Cell division protein kinase 5, 7 peptides, Peptide coverage: 23.8 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	10	20	52.1	588.30	1170.59	1170.59	0	K.JGEGTYGVFK.A
2	36	50	43.0	672.43	1742.84	1742.84	1	R.VILQDDDEGVPSALR.E
3	105	112	21.4	498.30	994.59	994.59	0	K.SPLFQLK.G
4	126	136	21.8	441.93	1322.77	1322.77	0	R.LDKPQNLINR.N
5	218	232	38.1	801.43	1700.85	1700.84	0	R.LLSTPTEEGAPAMTK.L
6	218	232	30.7	859.43	1716.84	1716.84	0	R.LLSTPTEEGAPAMTK.L + Oxidation (M13)
7	261	288	28.8	478.79	955.57	955.57	0	R.DLLQNLK.C

DnaJ11 MOUSE=DnaJ protein homolog 2: 5 peptides, Peptide coverage: 18.1 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	47	59	32.2	726.37	1450.73	1450.73	0	K.GISQAYEVLADSK.K
2	74	97	35.1	1162.90	2321.80	2321.80	0	K.EGGAGDGGFGSPMDIFDMFFGGGGR.M
3	284	296	35.1	895.81	1391.81	1391.81	0	R.TMTSHPGQMK.H
4	351	372	26.2	989.38	2465.14	2465.14	0	K.EVEETDEMDDQVELVDFDPNGER.R
5	351	372	48.2	894.72	2681.13	2681.13	0	K.EVEETDEMDDQVELVDFDPNGER.R + Oxidation (M.8)

EFTU MOUSE=Elongation factor Tu: 11 peptides, Peptide coverage: 50.1 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	54	70	27.5	603.88	1808.93	1808.93	0	R.DKPHVNVGTIGHVDHGK.T
2	92	102	33.3	682.80	1363.59	1363.59	0	K.YEEDNAPEER.A
3	105	120	64.9	537.43	1672.85	1672.85	0	R.GITNAAHVEYSTAAR.H
4	201	209	20.1	550.29	1098.58	1098.58	0	R.ELLTEFGYK.G
5	239	252	53.0	788.94	1571.88	1571.88	0	K.LLDADVTYPVPTR.D
6	301	311	29.5	631.33	1260.65	1260.65	0	R.TVVTGIEMFHK.S
7	316	327	94.3	593.32	1184.62	1184.62	0	R.AEAGDNLGALVR.G
8	337	351	29.4	609.56	1817.90	1817.90	0	R.GLVNVPQSGIQPHQK.V
9	386	405	20.8	551.76	1101.54	1101.54	0	K.LAMPFGEDK.L
10	430	447	44.5	938.36	1875.91	1875.91	0	K.TIGTGLVTDVPMATEEDK.N
11	430	460	22.2	744.72	2231.14	2231.14	1	K.TIGTGLVTDVPMATEEDKNK.W

ERMIN MOUSE=Ermin: 4 peptides, Peptide coverage: 22.1 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	31	44	43.6	631.86	1661.71	1661.71	0	R.GETTDADETGAYYK.V
2	78	95	23.4	703.04	2106.11	2106.11	0	K.LNENPEENLFVHQAQK.D
3	221	243	33.8	1163.93	2325.86	2325.86	0	R.EDSPLGSPGSPGTPOEDPVFGK.K
4	255	261	25.7	456.73	915.45	915.45	0	R.YNTSYRK.K

FLOT1 MOUSE=Flotilin 1: 6 peptides, Peptide coverage: 17.1 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	127	133	23.1	442.73	883.44	883.44	0	K.FSEQVFK.V
2	134	162	39.7	681.89	1362.04	1362.04	0	K.VASSDLVNMGSVSYTLK.D
3	254	281	21.4	478.78	955.54	955.54	0	R.VQGVVER.A
4	282	274	77.5	735.39	1468.77	1468.76	0	R.AQGVWQGEIAR.R
5	378	382	29.8	698.36	1394.71	1394.71	0	K.TLVSSGSGTMGAQK.V + Oxidation (M.11)
6	393	403	45.5	601.34	1202.67	1202.67	0	K.VTGEVLDLSR.L

GGT7 MOUSE=Galectin-7: 6 peptides, Peptide coverage: 15.3 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	30	42	41.1	688.37	1374.72	1374.71	0	R.LPEDEPAPAPLR.G
2	70	85	77.0	867.50	1733.79	1733.79	0	R.LPSSSSSEMGSDGSLR.E
3	221	237	22.7	595.33	1190.67	1190.67	0	R.SWDTKPLGLVMPGMVK.G
4	288	306	26.9	697.40	2089.16	2089.17	0	R.FLDTRLPLGHPPLPGSLLR.R
5	414	421	37.3	407.76	813.51	813.51	0	K.IALALAR.L
6	596	622	17.1	1067.86	3200.58	3200.58	0	R.LHPDGLSNLLQVDSEFTTEEFLEAR.G

GNA11 MOUSE=G alpha-11: 6 peptides, Peptide coverage: 27.1 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	42	52	34.1	544.32	1088.63	1088.63	0	K.LLLGTGESQK.S
2	121	133	190	775.40	1548.79	1548.79	0	K.VTFEHQYVNAK.T
3	167	181	100	637.47	1272.92	1272.91	0	R.IATVGYLPTGGQVLR.V
4	184	202	90.5	1119.10	2236.18	2236.18	0	R.VPTTGHEVPEDENNFR.M
5	312	322	43.4	640.79	1279.58	1279.58	0	K.MPVDLNPDQSK.I
6	346	354	50	528.32	1056.62	1056.62	0	K.DTLGLNLEK.E

GRN1 MOUSE=G protein regulated inducer of neurite outgrowth 1: 14 peptides, Peptide coverage: 21 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	215	220	19.1	524.94	1571.79	1571.79	0	R.EKPGSTGEGLVSLR.E
2	312	325	41.8	880.82	1319.83	1319.83	0	K.EAWSSGEGGSVSLR.M
3	364	375	22.2	677.87	1353.73	1353.73	0	R.NSELVSPVNPRL.L
4	440	451	61.5	589.31	1176.61	1176.61	0	R.SLGTWGLSAK.A
5	491	500	32.5	802.90	1603.78	1603.78	0	K.AETVSPGEVDAMTLQK.T
6	491	506	25.2	810.89	1619.77	1619.77	0	K.AETVSPGEVDAMTLQK.T + Oxidation (M.12)
7	551	562	57.5	581.76	1161.55	1161.55	0	R.VDTGATGSTPK.S
8	587	579	28.2	634.87	1267.72	1267.71	0	K.VIQPGATSPQK.V
9	601	615	50	783.94	1565.87	1565.87	1	R.KVDPPTTVEPVSLGK.A
10	648	661	26.3	761.25	1520.89	1520.89	0	R.DSGGTTPYSACQGR.D
11	685	681	46.7	887.45	1772.89	1772.89	1	R.SGLPPEPEPSASTSQK.D
12	681	704	18.6	682.83	1303.65	1303.65	0	K.SPSAAEAAMPPQRL.T
13	774	787	64.4	694.36	1386.71	1386.71	0	R.DAGLVSLGAAETR.S
14	813	840	52.4	597.86	2990.55	2990.55	1	R.VRPGSVLAALAPQEAPEVROVSQEK.G

HPC7 MOUSE=H: 6 peptides, Peptide coverage: 25.6 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	117	127	40.9	514.81	1227.60	1227.60	0	K.SGTEPDPPVK.R
2	130	152	35.6	682.42	2644.24	2644.24	0	K.TEEVEVESEEDPLEHPENPVK.T
3	158	181	39.7	852.11	2643.31	2643.30	0	K.ISEETQPETEELPPVHGVPTDR.R
4	158	182	75.7	534.14	2790.41	2790.40	1	K.ISEETQPETEELPPVHGVPTDR.R
5	211	222	37.3	690.38	1378.70	1378.70	0	K.SATHNAYAR.I
6	247	257	45.1	661.90	1321.78	1321.78	0	R.LHLNLELVK.N

KAPD MOUSE=CaMK dependent protein kinase type 1: 6 peptides, Peptide coverage: 18.8 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	75	92	18.7	659.57	1975.99	1975.99	1	R.TGSEDESPPPNPVVK.G
2	135	145	51.0	729.85	1457.69	1457.69	0	K.NVLFSLDQNER.S
3	253	264	15.1	492.27	1473.78	1473.78	1	K.VSLESLEKWER.L
4	265	281	55.1	1035.47	1858.93	1858.93	0	R.LVADALEPVQFEDQK.I
5	306	317	20.1	725.85	1449.68	1449.68	1	R.SENEEFVEVGR.L
6	307	317	74.1	647.80	1293.58	1293.58	0	R.SENEEFVEVGR.L

KRTR8 MOUSE=Krch repeat and BTR domain containing protein: 8 peptides, Peptide coverage: 14.6 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	61	75	43.5	715.35	1428.69	1428.69	0	R.ASAREGSEASPPSLR.S
2	142	191	38.9	539.31	1076.60	1076.60	0	R.VQGVSTALR.L

3	192	201	45.8	539.60	1077.58	1077.58	0	RLLADAYSGRM
4	202	218	48	571.30	1710.88	1710.88	0	R MAGVRPQNAEYVAGAR R
5	202	218	21.8	576.63	1726.88	1726.88	0	R MAGVRPQNAEYVAGAR R + Oxidation (M1)
6	264	274	48.2	705.35	1408.68	1408.68	0	R FMSDHYLEVR E
7	438	449	18.3	451.59	1351.74	1351.74	1	R ADRAWAWPLPR G
8	518	534	31.8	774.89	1547.77	1547.77	0	R DGAQAAVGSQGGVSVPR Y

MACN_MOUSE= NADP-dependent male enzyme, 13 peptides, Peptide coverage: 32.9 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	62	70	45.0	527.25	1052.50	1052.50	0	K GNATLEER L
2	157	165	25.5	522.30	1042.58	1042.58	0	R GLRITHDK G
3	182	190	39.1	473.25	944.49	944.49	0	K AVVTDGER I
4	251	270	38.7	791.70	2372.09	2372.09	1	R VRGEEDDLDDEFMGAVTQ F
5	253	270	42.5	1059.47	2116.92	2116.91	0	R GEEYDLDDEFMGAVTQ F
6	387	404	54.2	1065.05	2127.99	2127.99	0	K EMFAQCHPEVNSLEEVN L
7	405	427	64.7	588.86	2351.40	2351.39	0	R LVKPTAIGVAAAGAFTEQLR D
8	428	447	48.0	749.71	2246.12	2246.12	0	R DMASFHERPFAFASNPFSK A
9	481	500	71.2	1289.69	2575.35	2575.35	0	R TFTPQGNHAYVFPQVAGVAGGR H
10	507	533	87.0	772.90	3067.57	3067.56	0	R HIPDEFLLTAEGIADEVSEGLSGGR L
11	552	568	18.7	438.23	875.45	875.45	0	K VLDYAK H
12	559	589	37.0	659.83	1317.64	1317.64	0	K HMLASYPEPK D
13	577	598	55.9	1189.58	2387.11	2387.11	0	K SLVTPQYDSFSLDTYSWPK E

MAPK_MOUSE= Mitogen-activated protein kinase 1, 11 peptides, Peptide coverage: 37.2 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	14	22	43.1	487.76	973.50	973.50	0	R GGVFDGPR Y
2	76	89	40.8	805.48	1708.94	1708.94	1	R FRHENGINDIR A
3	90	112	29.1	915.12	2742.35	2742.35	1	R APTIEGMKDVYVQDLMETOLYK L
4	98	112	94.8	822.95	1643.89	1643.89	0	K DVYVQDLMETOLYK L
5	137	148	27.0	805.33	1208.64	1208.64	0	K YHSANVLHR D
6	171	189	58	715.34	2143.00	2143.00	0	R VADPDHDTGFLTEYVATRW
7	193	201	25.9	501.77	1001.52	1001.52	0	R APEMLNSK G
8	250	268	16.4	542.81	1083.61	1083.61	0	R NYLLSLPHK N
9	300	328	46.8	1121.54	3361.61	3361.60	0	R IEVEGALAHPLYEYDPSDEPIAEAPFK F
10	341	351	41.0	674.88	1347.74	1347.74	1	K KELLFEETAR F
11	343	351	44.1	554.29	1108.58	1108.58	0	K ELFEETAR F

OLA1_MOUSE= Oligo-like ATPase1, 8 peptides, Peptide coverage: 24 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	5	15	21.8	468.95	1403.82	1403.82	1	K KGGGQKPPPR F
2	25	35	38.7	533.84	1065.68	1065.68	0	K IGVGLPNNVQK S
3	84	98	95.4	784.98	1567.94	1567.93	0	K IAPLVVQVAGLVK G
4	202	216	26.3	488.24	1548.93	1548.93	1	R FYHVDWQKEEVLNKH
5	271	279	41.8	507.77	1013.53	1013.54	0	K LQELSAEER Q
6	341	349	28.6	513.26	1024.51	1024.51	0	K GFMAEVMKY
7	350	363	40.1	675.87	1629.72	1629.72	1	K YEDPKDEGSENAVK A
8	387	394	16.9	489.25	958.49	958.49	0	K FNTPGQPK K

ORF1_MOUSE= Oryzantin-like 120kDa protein, 13 peptides, Peptide coverage: 18.5 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	215	229	79.7	569.98	1708.92	1708.92	0	R IDGLGEELLHTQLK Y
2	328	342	35.5	707.92	1533.83	1533.83	0	K VTLSEGHVHVALPK D
3	347	360	95.6	825.42	1648.83	1648.83	1	R EFDTKEEDLAALR H
4	446	460	48.5	552.28	1653.81	1653.81	0	R SVTDLVSQMDPHGR R
5	495	505	50	583.32	1124.62	1124.62	0	K ALGVFAVVTQK G
6	572	579	43.9	533.76	1065.51	1065.51	0	R FNLETEWKN
7	597	614	90.1	592.95	1983.09	1983.09	1	K AKNEILDEVISLQVTPK H
8	669	683	46.8	897.44	1792.87	1792.86	0	K AVEWAEVTLGEEFPR F
9	756	772	50.6	187.49	1972.96	1972.96	1	R LKDTENAEINMGQWAK K
10	801	818	10.4	677.33	2028.98	2028.98	0	K VNDHMYLASDEITVRL K
11	888	895	43.5	682.32	1102.62	1102.62	0	R LLAITANTLR Q
12	912	923	20.6	690.81	1379.61	1379.61	0	K EVELDFAEDEGKK
13	949	960	56.2	707.37	1412.73	1412.73	0	K LDNFIALHGEK

PAD2_MOUSE= Protein-Argetin deermass type-2.14 peptides, Peptide coverage: 26 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	23	45	44.2	837.11	2509.29	2509.29	0	R VEAVYVLTGLVTDVYSAAPAK T
2	77	85	24.2	559.30	1116.59	1116.59	0	R WALSPSTLR L
3	87	100	54.2	713.33	1424.65	1424.65	0	R LSMAGASTEASSDK V
4	184	195	48.2	739.36	1478.71	1478.71	0	K GQGLQMSQMLR T
5	324	330	21.8	456.75	911.48	911.48	0	K DNYLFLK E
6	356	371	53.6	997.99	1973.98	1973.98	0	R WQDEIEFGYEAPEK G
7	372	381	58.3	543.80	1085.59	1085.59	0	K GPPVLDSPR D
8	382	391	23.7	573.81	1145.61	1145.61	1	R DGNLKDPPK Q
9	392	403	51.0	683.36	1364.71	1364.71	0	K QLLGPDGYYVTR E
10	437	449	55.5	682.37	1302.73	1302.73	0	R LIGSSFPISGGR R
11	538	554	57.1	985.49	1968.98	1968.98	0	K LSNELTQENQYQFQ R
12	566	582	83.1	565.05	1829.09	1829.09	1	R ELALTEKDIDLPALFK M
13	573	582	23.9	572.83	1143.65	1143.65	0	K DIDLPAFK M
14	591	604	48.1	819.92	1637.83	1637.83	0	R AFFFVMMVMVLDK D

PALM_MOUSE= palmitin, 13 peptides, Peptide coverage: 42 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	54	72	71.2	1054.48	2108.98	2108.98	1	R ALLEGTPSSASEGDEEDWPK Q
2	83	90	48.9	452.74	903.47	903.47	0	R GLEESITR L
3	94	109	109	631.91	1261.82	1261.81	0	K EIDVLEFGESAPWAK E
4	110	127	24.5	594.63	1750.85	1750.85	0	K ENSAAPSPGRPGSAPAK E
5	110	131	19.6	758.94	2265.10	2265.10	1	K ENSAAPSPGRPGSAPAK E
6	132	147	95.5	642.45	1282.89	1282.88	0	K SETLVNAGQTPGLTPK E
7	186	195	17.3	536.82	1071.63	1071.63	0	R VLSSTVLPRL D
8	238	256	79.8	829.45	1658.88	1658.88	0	K ADEVTLSEAGSTAGRAEPR G
9	257	264	31.6	439.73	859.44	859.44	0	R GLAEDVTR T
10	315	324	23.9	557.85	1113.68	1113.68	1	K KVLGLQDTK A
11	316	324	41.4	493.89	985.58	985.58	0	K VLGQDTK A
12	325	337	45.2	692.38	1382.74	1382.74	0	K AELVVEDAATPR E
13	354	373	80.6	1104.48	2208.95	2208.95	0	K EENQGTPTTTPSDQLDNK K

PCBP1_MOUSE=Poly(R)-binding protein 1: 8 peptides, Peptide coverage: 35.5 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	58	70	44.9	594.01	1387.81	1387.81	0	R.IITLTGPTNAFK.A
2	71	101	62.2	845.43	1977.70	1977.70	1	K.AFAMIDKLEEDINSSMTNSTAASRPMPVTLALL
3	125	144	81.3	1045.59	2088.98	2088.97	0	R.ETGAGQVQVAGDMLPNSTER.A
4	125	144	79.0	1063.49	2104.97	2104.97	0	R.ETGAGQVQVAGDMLPNSTER.A + Oxidation (M+1)
5	244	269	30.7	669.40	2605.17	2605.17	0	R.QGSHFAMMHGCTGAGDSSSPK.K
6	298	306	19.2	507.77	1013.53	1013.53	0	R.DGANNERN.Q
7	315	325	27.1	543.78	1085.56	1085.56	0	K.IANPVEGSSGR.Q
8	328	346	72.9	1069.10	2178.19	2178.19	0	R.DVITITGSAASISLAQYLINAR.L

PMM1_MOUSE=Phosphomannomutase 1: 5 peptides, Peptide coverage: 34.4 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	31	41	15.5	623.64	1245.66	1245.66	0	K.IDPEVSAPLQK.L
2	46	58	44.4	654.84	1307.67	1307.67	0	R.VQGVVGGSDYK.K
3	59	72	62.5	765.39	1528.78	1528.78	0	K.IAEOLGEGDEVEK.F
4	133	143	43.7	579.31	1156.60	1156.60	0	R.NGMVNVSPGR.S
5	235	249	55.2	605.42	1208.82	1208.82	0	R.TVGHVVSPOGVQR.C

PPM1A_MOUSE=protein phosphatase 1A/PP2C alpha: 7 peptides, Peptide coverage: 20.7 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	24	33	34.5	592.70	1183.54	1183.54	0	R.YGLSSMQGWR.V
2	103	113	18.7	449.88	1346.63	1346.63	0	R.TGFLEDEHMR.V
3	175	189	62.5	617.34	1232.68	1232.68	0	R.IGNAGGSVMQR.V
2	175	189	26.4	645.34	1288.68	1288.68	0	R.IGNAGGSVMQR.V + Oxidation (M+1)
4	209	226	3.3	678.00	2030.99	2030.99	0	K.GPTEQLVSPPEVHDIER.S
5	336	364	36.0	941.00	1879.99	1879.99	0	R.TLASENPSPRPGELASK.R
6	356	364	31.0	639.29	1076.56	1076.56	0	R.NVIEAVNRL.L

PTC7_MOUSE=Protein phosphatase PTC7/nucleolar/TA-PP2C: 6 peptides, Peptide coverage: 24.5 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	14	25	44.6	607.33	1212.65	1212.65	0	R.AALGGLSGTDPR.A
2	36	90	89.4	729.87	1457.73	1457.73	0	R.SADVLQWAGQVGGWR.Q
3	91	105	72.7	636.89	1671.76	1671.76	0	R.DYGVDPSPGSGTLMLR.T
4	91	105	37.4	644.88	1687.75	1687.75	0	R.DYGVDPSPGSGTLMLR.T + Oxidation (M+1)
5	167	171	75.0	799.94	1597.88	1597.88	0	R.LHTANLQSGSGLVVR.G
6	292	310	42.2	1003.52	2005.03	2005.03	0	R.GSKPDITVLLSKEYTD

PRUNE_MOUSE=Protein prunin homolog: 8 peptides, Peptide coverage: 25.6 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	45	58	50.9	644.86	1667.91	1667.91	0	K.TSEADRFIPVLR.K
2	67	77	43.2	648.34	1294.66	1294.66	0	R.GDNVFFLQEVK.I
3	156	188	25.5	506.83	1211.65	1211.65	0	R.LDQAPETLDR.Q
4	197	210	32.7	631.94	1661.88	1661.88	0	K.YVEELALFPLPK.R
5	246	258	50.0	612.34	1222.66	1222.66	0	K.VASAHMLK.A
6	326	348	16.9	637.10	2508.27	2508.27	0	K.LTPPSTSPNLQAYHQGNTQVSR.K
7	351	367	77.7	611.01	1830.02	1830.01	0	K.LLPVLQALSAFLDSAK.M
8	368	381	96.4	705.33	1408.65	1408.64	0	K.MASGQSEWVGMSR.E

RCN2_MOUSE=Relcucosabin-2: 13 peptides, Peptide coverage: 53.4 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	45	59	65.1	653.50	1705.84	1705.84	0	R.EALLGVGEDVDEYVK.L
2	70	95	4.1	940.11	2817.32	2817.32	1	K.IDSDSDGFLTENELSQWQMSFK.H
3	76	95	81.5	1345.82	2689.23	2689.22	0	K.IDSDSDGFLTENELSQWQMSFK.H
4	107	114	24.5	528.75	1055.49	1055.49	0	K.GQFVEYDK.N
5	107	132	29.4	1072.14	3213.40	3213.40	1	K.GQFVEYDKNSDGA/TWDEYNQMYDR.V
6	115	132	71.0	1068.97	2175.92	2175.92	0	K.NSDQAVTWDEYNQMYDR.V
7	133	151	118.9	1069.98	2171.95	2171.95	0	R.VDFQENTLDDTEGSR.L
8	220	235	61.8	956.48	1910.94	1910.94	1	R.DPTANEDPEWLVEK.D
9	221	235	65.9	878.43	1754.84	1754.84	0	R.DPTANEDPEWLVEK.D
10	250	284	32.7	1325.32	3972.95	3972.94	0	R.LDPCLELLSWVVPNNOGAGESALHIDMDLNSDK.K
11	285	308	34.8	1034.12	2799.35	2799.34	1	K.KLSEELLENQDLFLTSEATDYGR.Q
12	288	308	118.8	1398.83	2871.25	2871.25	0	K.LSEELLENQDLFLTSEATDYGR.Q
13	308	320	20.6	797.85	1593.68	1593.67	0	R.QLHODYFYHDEL

RHEB_MOUSE=Protein Rheb: 7 peptides, Peptide coverage: 33.7 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	9	15	23.6	403.25	804.49	804.49	0	K.SALQYR.S
2	110	120	27.4	606.36	1210.71	1210.71	0	K.VQFMVGNKK.H
3	110	121	15.1	447.28	1338.81	1338.81	1	K.VQFMVGNKK.D
4	136	151	67.5	847.92	1693.83	1693.83	0	K.ALAESWNAAPLESSAK.E
5	152	161	42.8	575.79	1149.57	1149.57	0	K.ENQTAQVFK.R
6	152	162	15.1	653.84	1305.67	1305.67	1	K.ENQTAQVFK.R
7	163	179	35.1	648.30	1641.89	1641.89	1	R.ILEAKDGAASQSK.S

SAPHO_MOUSE=Putative adenine/nucleoside 2: 6 peptides, Peptide coverage: 12.5 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	28	36	15.4	524.26	1048.51	1048.51	0	K.YSRNATYTKA
2	40	53	90.3	964.82	1727.82	1727.82	1	K.KQGFADOMGEFTK.F
3	250	261	74.2	641.84	1281.67	1281.67	0	R.GVEESVTGVHRL
4	411	418	40.9	516.26	1030.51	1030.51	0	R.TPELTWER.V
5	421	433	43.8	768.00	1535.79	1535.78	1	R.SQVHWWPDGKRV
6	477	488	26.2	633.88	1265.70	1265.70	1	K.YKQDVYLLPK.K

SYN1_MOUSE=Asparagine-tRNA synthetase: 13 peptides, Peptide coverage: 35.4 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	50	61	47.3	712.36	1422.70	1422.70	0	K.EPFPPTIVDSQK.E
2	50	65	45.4	975.48	1950.94	1950.93	1	K.EPFPPTIVDSQKENER.W
3	128	135	26	454.75	907.48	907.48	0	K.SALESYR.G
4	141	147	31.4	459.75	899.48	899.48	0	K.VFGVWHR.L
5	154	161	27.8	511.30	1020.58	1020.58	0	K.NLMFLVLR.D + Oxidation (M+1)
6	154	161	22.7	503.30	1004.58	1004.58	0	K.NLMFLVLR.D
7	379	388	72.3	667.37	1330.08	1330.08	0	K.SPVASIVYELNPNFKPK.R
8	402	412	58.2	685.33	1369.64	1369.64	0	R.MNYSQAEWLK.E
9	419	430	36.8	1043.95	2085.88	2085.88	0	K.EDGTFYFEGDDPEAFER.L

10	499	489	44.3	1102.08	2202.11	2202.10	0	RLTESVQVLMFNVGEMGGMR.S
11	490	501	36.5	728.34	1454.66	1454.66	0	R.SWDSSEELEGYK.R
12	503	517	48.6	537.42	1072.83	1072.83	0	R.EGDPAPYVWYDQR.K
13	534	541	38.5	524.80	1047.59	1047.59	0	R.FLSWLNRY

THKA_MOUSE=3-ketoadipyl-CoA thioesterase A: 9 peptides, Peptide coverage: 35.3 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	30	44	75.0	784.91	1567.81	1567.81	0	R.FPGASASDVVVHGR.R
2	58	77	75.7	1078.09	2154.16	2154.16	0	K.NTTPDELLSAVLAVLDVRL
3	78	102	28.1	841.12	1682.24	1682.24	0	R.LRPQGLGDSVGNMLEPGAGAVMAR.I
4	103	121	33.9	1021.57	2041.13	2041.12	0	R.IAQFLSGIPETVPLSTVNR.Q
5	266	289	103.6	1103.04	2204.07	2204.07	0	K.DGSSTTAGNSQVSDGAAVLLAR.R
6	291	305	25.9	532.32	1063.95	1063.95	1	R.SKAELGPIGLVLR.S
7	293	305	57.7	695.42	1378.82	1378.82	0	K.AEELGLPLGLVLR.S
8	306	331	53.1	1292.75	2583.38	2583.38	0	R.SYAVGVPPDVMGIPYVPAALQK.A
9	386	395	38.6	578.65	1155.69	1155.69	0	R.DVVTLLNELK.R

THTM_MOUSE=3-mercaptopyruvate sulfolactonase: 14 peptides, Peptide coverage: 54.9 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	9	21	73.7	603.39	1204.77	1204.77	0	R.ALVSAQWVAEALK.A
2	9	24	22	570.56	1140.98	1140.98	1	R.ALVSAQWVAEALKAPK.S
3	31	40	55.0	603.33	1204.65	1204.65	0	R.LLDASWVLPK.L
4	53	64	21.2	453.57	907.13	907.13	0	R.HIPGAFFDIDR.C
5	113	118	15.9	462.73	923.45	923.45	0	R.VVWVFR.A
6	119	133	41.5	533.94	1067.88	1067.88	0	R.AFGHHSVSLDGGFR.H
7	134	146	67.2	747.40	1492.78	1492.78	0	R.HVLDNLPSSGK.S
8	147	164	82.5	895.48	1788.95	1788.95	0	K.SHSEPAEFSAQLDPSPIK.T
9	165	176	32.1	475.90	950.80	950.80	0	K.THEDELDAR.R
10	178	184	31.2	417.73	833.44	833.44	0	R.FQVVDAR.A
11	198	224	56.1	975.62	1950.45	1950.44	0	R.DGIEPQHPSVNIPTFTLNEGLEK.S
12	267	282	89	894.95	1787.88	1787.88	0	K.SDVVYDGSWVWVYMR.A
13	267	282	44	1002.94	2003.87	2003.87	0	K.SDVVYDGSWVWVYMR.A + Oxidation (M15)
14	283	293	20.6	618.82	1235.63	1235.63	0	R.AQPEHISEGR.G

TXN1_MOUSE=Thioredoxin-like protein 1: 8 peptides, Peptide coverage: 40.1 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	2	23	49.1	733.71	1467.40	1467.40	0	M.VGVKVPVGSDFQPELQAGSR.L
2	88	102	65.9	618.40	1234.78	1234.78	0	R.IDQYGGDAVGLLEK.I
3	103	121	55.6	707.35	1412.69	1412.69	1	K.KGLENDPQSNEDADIPK.G
4	105	121	51.8	508.33	1017.64	1017.64	0	K.KGLENDPQSNEDADIPK.G
5	198	202	17.8	436.77	871.53	871.53	0	K.FNLPR.S
6	203	211	31.6	557.23	1112.45	1112.44	0	R.SMDFEER.S
7	212	234	28.1	856.77	1711.30	1711.30	1	R.SEPTGALELTEDKEDGNPLR.Y
8	280	280	35.7	517.41	1034.21	1034.21	1	R.LSYFTFGTPVQATNWDKRL.Y

VAT1_MOUSE=Synaptic vesicle membrane protein 1: 10 peptides, Peptide coverage: 30.8 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	77	95	22.4	652.38	1304.76	1304.76	0	K.LQSRPWFPPAPGGQLTR.V
2	224	238	68.8	755.89	1509.77	1509.77	0	R.TVENVTVFQASASK.H
3	244	264	33.2	825.40	1649.78	1649.78	1	K.LNGVTHPIQVHTTGYVDEK.I
4	269	284	58.1	787.89	1573.77	1573.77	0	K.QVDVMDPLGGSDAK.G
5	269	284	25.1	785.89	1569.76	1569.76	0	K.QVDVMDPLGGSDAK.G + Oxidation (M6)
6	295	308	51.5	732.40	1462.78	1462.78	0	K.VVTVGMANLTGPK.R
7	295	308	48.0	740.40	1478.78	1478.78	0	K.VVTVGMANLTGPK.R + Oxidation (M6)
8	317	334	44.3	728.55	1455.10	1455.10	0	R.TAWNQPSVTALQLQANR.A
9	358	370	22.4	754.94	1507.86	1507.86	0	R.LVALYNDGHIKPR.I
10	371	379	33.5	590.78	1181.56	1181.56	0	R.DGVWPFK.V

VP26B_MOUSE=Vesicle sorting protein 26B: 8 peptides, Peptide coverage: 25.3 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	57	69	22.8	783.37	1564.71	1564.71	0	K.YFLPYDGETVSGK.V
2	193	199	22.4	402.29	802.56	802.56	0	K.YFLLR.I
3	213	230	63.8	573.96	1145.90	1145.90	0	R.ETTGTPNVYHENDIAK.Y
4	231	240	30.9	575.78	1149.55	1149.55	0	K.YEIMDGAPVRLG
5	231	247	19.0	635.00	1267.97	1267.97	1	K.YEIMDGAPVRLGSPK.L
6	248	280	51.8	756.40	1510.79	1510.79	0	R.LFLAGYELTPMR.D
7	287	294	15.8	529.29	1056.57	1056.57	0	K.QGEVLMR.K
8	314	324	49.8	595.30	1189.59	1189.59	0	R.FESTTSLGEVLT

WASP1_MOUSE=WASP family protein number 1: 9 peptides, Peptide coverage: 23.3 %

Peptide	Start	End	Score	M/z (Obs)	Mr (Exp)	Mr (Calc)	Miss	Sequence
1	47	65	21.1	790.35	1579.69	1579.69	0	K.YAEDIFGELFNEAHSFGR.V
2	76	98	27.2	877.79	1753.35	1753.35	1	R.LSVSVTLQDPKEELSLQDITMR.K
3	103	114	42.5	719.35	1436.69	1436.69	0	R.SSTIGDGLFDR.K
4	103	115	31.3	783.40	1564.78	1564.78	1	R.SSTIGDGLFDRK.T
5	150	162	64.1	684.41	1366.80	1366.80	0	K.FYTNPSYFBLWK.E
6	207	223	55.5	917.96	1833.91	1833.91	0	K.LADGPELAEDDADLHK.H
7	316	341	16.6	680.49	1360.44	1360.44	0	R.TPVFVSPTPPPPPLPSALSTSLR.A
8	490	508	32.0	455.78	909.54	909.54	0	R.SVLEAK.R
9	527	537	47.9	615.84	1229.68	1229.68	0	R.IENDVILSR.R

For each peptide identified, the position in protein sequence, mascot score, experimental and calculated masses, number of trypsin missed cleavage and sequence are indicated.

C. Résumé et perspectives

1. 5-HT₆/Cdk5, une nouvelle voie de signalisation impliquée dans le développement neuronal

J'ai donc pu montrer que le recrutement du complexe p35/Cdk5 par le récepteur 5-HT₆ induisait une augmentation de la longueur des neurites sur une lignée de neuroblastomes (NG108-15). Ce processus est inhibé par un agoniste inverse du récepteur, le SB258585. Comme j'ai pu le mettre en évidence, par une approche de colP et de BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*), cette interaction est modulée par le SB258585. De plus, j'ai aussi montré que Cdk5 phosphorylait la Ser³⁵⁰ localisée au niveau du domaine C-terminal du récepteur 5-HT₆. Cette phosphorylation est associée à une augmentation de l'activité de la Rho GTPase Cdc42, permettant ainsi un allongement des neurites. L'interaction entre le récepteur et Cdk5 est donc non seulement dynamique mais est aussi importante pour l'induction de la pousse neuritique dépendant du récepteur 5-HT₆ (*Figure 15*). J'ai, par ailleurs, validé l'implication de la voie 5-HT₆/Cdk5 dans la pousse neuritique sur des cultures primaires de striatum et d'hippocampe ainsi que sur un modèle d'explants obtenus à partir de ces deux mêmes structures.

Ce travail a permis de mettre en évidence une nouvelle voie de signalisation associée au récepteur 5-HT₆ via son interaction avec la protéine Cdk5, acteur clé du développement neuronal. Cette étude confirme donc l'importance de ce récepteur sérotoninergique dans les processus neurodéveloppementaux. J'ai également pu montrer la nature constitutive de ce processus, contrôlé par la phosphorylation du récepteur 5-HT₆ au niveau de la Ser³⁵⁰, induite par son couplage avec le complexe p35/Cdk5.

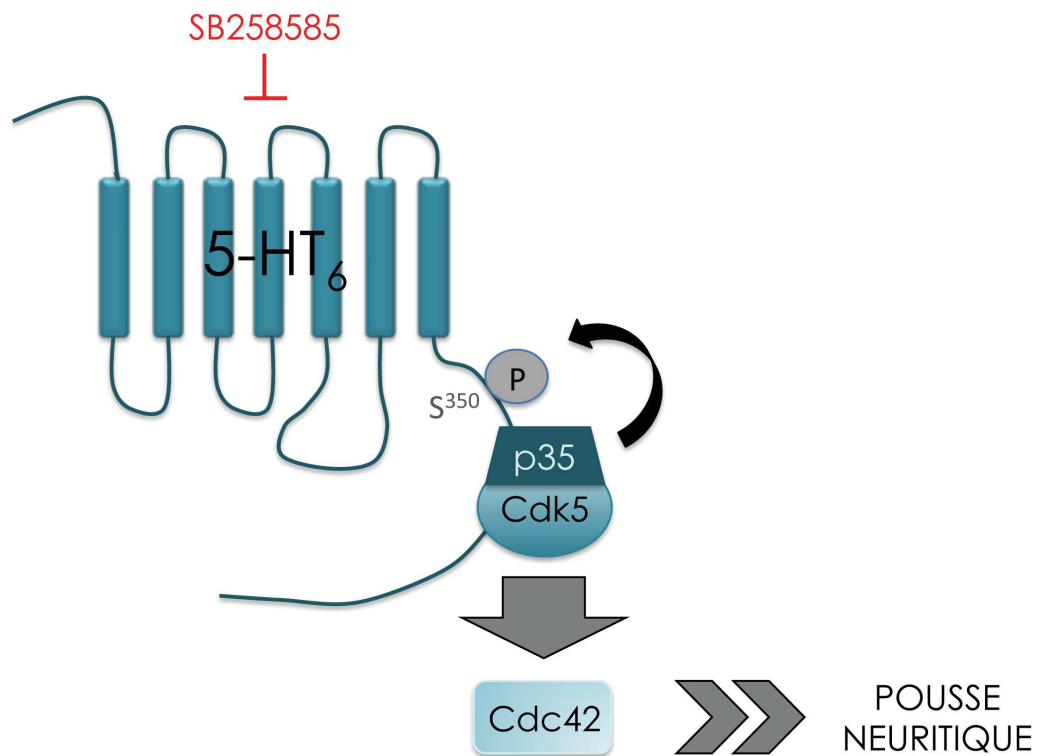


FIGURE 15 : MECANISMES DE LA POUSSE NEURITIQUE 5-HT₆ DEPENDANTE

L'interaction entre le récepteur 5-HT₆ et le complexe Cdk5/p35 provoque la phosphorylation du récepteur par Cdk5 au niveau de la Ser³⁵⁰, située dans le domaine C-terminal du récepteur. Cette phosphorylation est associée à une augmentation de l'activité de la Rho GTPase Cdc42 et à l'élongation des neurites dans des neuroblastomes et dans des neurones d'hippocampe et de striatum en culture.

2. Régulation de la voie 5-HT₆/Cdk5

Le fait que la voie 5-HT₆/Cdk5 soit agoniste-indépendante ne signifie pas pour autant qu'elle soit dépourvue de système de régulation. J'ai pu mettre en évidence un mode de régulation exogène de cette voie de signalisation. En effet, comme je l'ai précédemment évoqué, la liaison d'un agoniste inverse au récepteur 5-HT₆ a pour conséquence de rompre l'interaction entre le récepteur et Cdk5, empêchant ainsi la phosphorylation de la Ser³⁵⁰. Ce phénomène se traduit par une diminution de l'activité Cdc42, inhibant l'élongation des neurites. Ces résultats suggèrent donc que la liaison de Cdk5 au récepteur est un mécanisme important dans la signalisation 5-HT₆/Cdk5-Cdc42, ainsi que dans l'induction de la pousse neuritique par le récepteur. Ces observations

suggèrent que tout ce qui pourra rompre l'interaction entre 5-HT₆ et Cdk5 de manière endogène, sera en mesure d'inhiber la pousse neuritique 5-HT₆-dépendante.

D'autre part, même si la liaison de Cdk5 au récepteur 5-HT₆ semble constitutive, l'activité de Cdk5 ne l'est pas forcément. En effet, pour être active Cdk5 nécessite la liaison de l'un de ses co-activateurs p35 ou p39. Pour cette raison j'ai cherché à savoir si p35 était associée à Cdk5 au niveau du récepteur 5-HT₆. Grâce à une approche de co-immunoprécipitation, j'ai pu identifier p35 dans le complexe 5-HT₆/Cdk5. De plus, la protéine Cdk5 interagissant avec le récepteur 5-HT₆ est active, comme cela a été confirmé par un test d'activité kinase. Comme je l'ai évoqué en introduction, le niveau d'expression de p35 est régulé au cours du développement embryonnaire. L'activité de Cdk5 associée au récepteur 5-HT₆ serait donc modulable, notamment au cours du développement, en fonction du niveau d'expression de p35. De ce fait, p35 serait un acteur majeur dans le contrôle de l'activité Cdc42 liée à la phosphorylation du récepteur 5-HT₆ par Cdk5, et de la pousse neuritique en résultant.

L'expression du récepteur 5-HT₆ dans les cellules NG108-15 active Cdk5, permettant ainsi la phosphorylation de la Ser³⁵⁰ du récepteur, et l'activation de la voie Cdc42. On peut se demander qui du récepteur, ou de Cdk5, initie ce cycle d'activations. L'interaction entre le récepteur et Cdk5 semble importante pour la pousse neuritique déclenchée par le récepteur. Comme je l'ai suggéré dans le paragraphe précédent, une hypothèse serait que l'activité de Cdk5 associée au récepteur 5-HT₆ soit régulée par la l'expression de p35. Ainsi, la liaison de p35 à Cdk5 permet l'activation de cette kinase qui phosphoryle le récepteur 5-HT₆ activant, en conséquence, la voie Cdc42. La liaison de Cdk5 au récepteur 5-HT₆ pourrait favoriser son interaction avec p35 en rapprochant Cdk5 de la membrane plasmique.

3. Mécanisme d'activation de Cdc42

Dans la voie de signalisation liant le récepteur 5-HT₆ à la pousse neuritique, un acteur reste encore à déterminer. En effet, si la phosphorylation du récepteur par Cdk5 induit une augmentation de l'activité de la Rho GTPase Cdc42, je n'ai pas pu mettre en évidence le mécanisme reliant ces deux événements. Comme je l'ai décrit dans l'introduction, les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₇, eux aussi connus pour activer la protéine G_s,

sont également capables d'activer, respectivement, les protéines G_{13} et G_{12} . L'activation de ces protéines G induit une augmentation de l'activité des Rho GTPases RhoA et Cdc42 (Ponimaskin et al., 2002; Kvachnina et al., 2005). Ainsi, une hypothèse permettant d'expliquer l'augmentation de l'activité Cdc42 suite à la phosphorylation du récepteur 5-HT₆ par Cdk5, est que cette phosphorylation permettrait un couplage entre le récepteur et la protéine G_{12} , activant ainsi Cdc42. Nous avons, par ailleurs, pu observer que le fait de stimuler, ou de bloquer l'activité de Cdk5, et donc respectivement de favoriser ou d'inhiber la phosphorylation de la Ser³⁵⁰ du récepteur 5-HT₆, n'impactait pas l'activité liée à la protéine G_s . Ceci implique donc qu'une activation des protéines G_s et G_{12} par le récepteur 5-HT₆ serait compatible.

4. La voie 5-HT₆/Cdk5 dans d'autres processus neurodéveloppementaux

Parallèlement à ce travail, l'implication de la voie 5-HT₆/Cdk5 a été observée dans la migration neuronale. En effet, Jacobshagen *et coll.* ont mis en évidence le rôle du récepteur 5-HT₆ et de son partenaire Cdk5 dans la migration des neurones pyramidaux du cortex (Jacobshagen et al., 2014). Alors qu'un excès de sérotonine au cours du développement altère la migration de ces neurones, par l'intermédiaire du récepteur 5-HT₆, une invalidation du récepteur affecte également la migration de ces neurones pyramidaux. De manière cohérente avec nos résultats, c'est par un processus agoniste-indépendant, engageant la voie Cdk5, que le récepteur 5-HT₆ contrôle la migration des neurones pyramidaux du cortex. En effet, alors qu'une invalidation du récepteur 5-HT₆ au cours de la migration des neurones pyramidaux ralentit leur migration, ces déficits sont réversés par la surexpression de Cdk5 et de son co-activateur p35. De la même façon, ces altérations sont réversées par la surexpression de mutants du récepteur 5-HT₆ incapables d'activer la voie G_s de manière constitutive (5-HT₆ G_s Dead) ou de manière 5-HT-dépendante (5-HT₆ D¹⁰⁶A), excluant l'implication de la voie G_s dans ce processus. Dans ce cas, deux cibles de Cdk5, Dcx et FAK, connues pour jouer un rôle dans la migration neuronale, seraient impliquées. En effet, alors que l'expression du récepteur 5-HT₆ dans les cellules NG108-15 augmente la phosphorylation Cdk5-dépendante de ces deux protéines, ce processus est diminué dans des neurones primaires de cortex dans lesquels l'expression du récepteur est inhibée (Jacobshagen et al., 2014). Ces résultats

confirment donc l'importance de la voie 5-HT₆/Cdk5 agoniste-indépendante dans le développement neuronal.

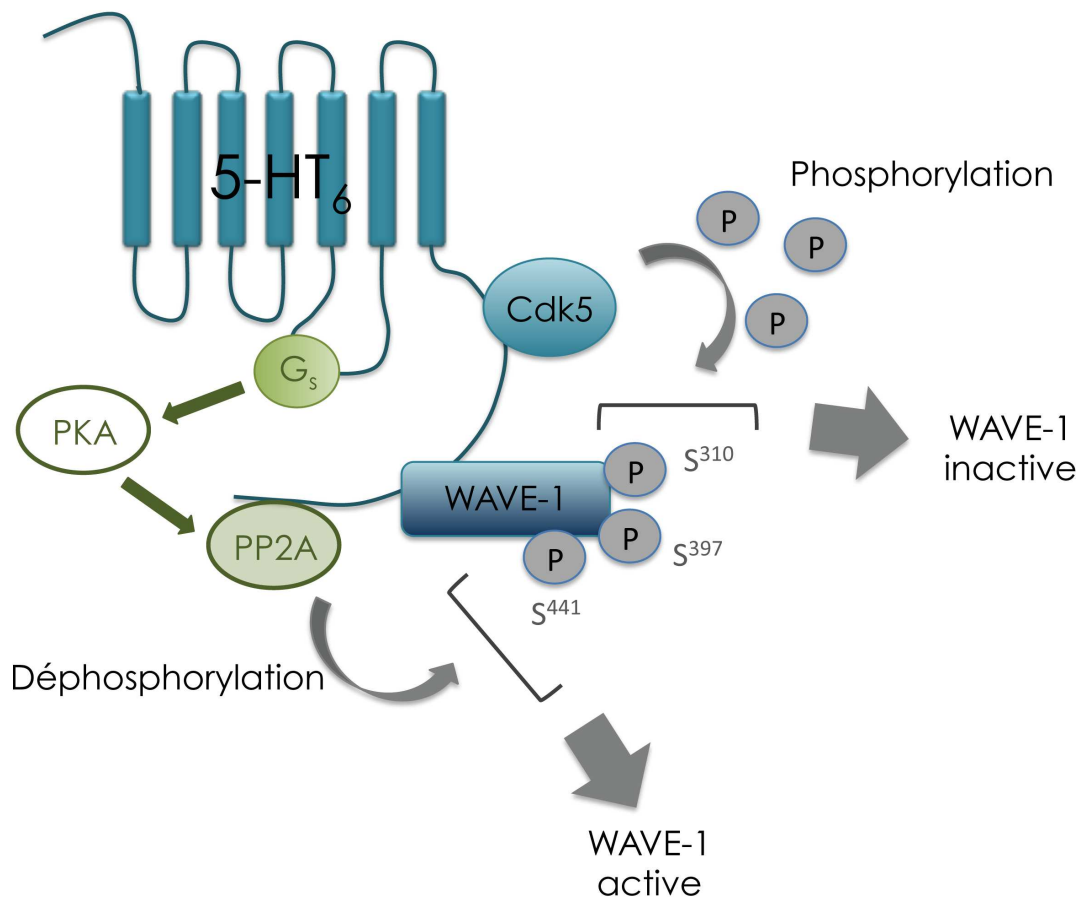
Comme je l'ai évoqué, le récepteur 5-HT₆ interagit avec d'autres protéines également impliquées dans le développement neuronal, comme WAVE-1, GPRIN1 ou PALM. Le rôle neurodéveloppemental de ces protéines sera décrit dans la discussion générale. Toutefois, l'interaction entre le récepteur et ces différentes protéines suggère que celui-ci régule différents mécanismes neurodéveloppementaux. Dans la suite de mon travail je me suis donc intéressée à une autre protéine identifiée dans le crible protéomique précédemment décrit, la protéine WAVE-1.

II. Implication du récepteur 5-HT₆ dans la morphogenèse des épines dendritiques

A. Contexte

L'approche protéomique visant à identifier les protéines interagissant avec le récepteur 5-HT₆ a également permis de mettre en évidence une interaction entre le récepteur et WAVE-1, protéine clé dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. Comme je l'ai décrit en introduction, WAVE-1 est une cible de Cdk5 et la phosphorylation de cette protéine est fortement impliquée dans le contrôle de la morphogenèse des épines dendritiques. En effet, Cdk5 phosphoryle la protéine WAVE-1 au niveau de trois sérines (Ser³¹⁰, Ser³⁹⁷, Ser⁴⁴¹) et la phosphorylation de ces sérines, plus particulièrement des Ser³¹⁰ et Ser³⁹⁷, diminue l'activité de WAVE-1 et est associée à une augmentation de la proportion d'épines dendritiques morphologiquement immatures (Kim et al., 2006). La déphosphorylation de ces sérines est catalysée par la phosphatase PP2A, dont l'activité dépend de la PKA (Ceglia et al., 2010; Ahn et al., 2007). Cette phosphatase a également été identifiée comme partenaire intracellulaire du récepteur 5-HT₆. Ainsi, les différents acteurs de cette voie de signalisation, contrôlant la morphogenèse des épines dendritiques, sont physiquement associés au récepteur 5-HT₆. Cette observation a motivé la seconde partie de mon travail de thèse. J'ai, dans un premier temps, étudié **l'implication du récepteur 5-HT₆ dans la formation des épines dendritiques**, et dans un second temps de entrepris l'analyse du **rôle de la voie Cdk5/WAVE-1 dans ce processus**.

Comme je l'ai décrit en introduction, la phosphorylation de WAVE-1 par Cdk5 contrôle son activité de *Nucleation Promoting Factor* et inhibe la polymérisation de l'actine induite par Arp2/3, également identifiée dans le complexe associé au récepteur 5-HT₆. Dans cette seconde partie j'ai donc émis l'hypothèse selon laquelle le récepteur 5-HT₆ pourrait contrôler la morphogenèse des épines dendritiques en modulant l'activité de WAVE-1 via son interaction avec Cdk5 et/ou PP2A (*Figure 16*).



**FIGURE 16 : HYPOTHESE SUR LA MODULATION DE LA PHOSPHORYLATION DE WAVE-1
PAR LE RECEPTEUR 5-HT₆**

Le récepteur 5-HT₆ interagit avec les protéines G_s, Cdk5, WAVE-1, PP2A et Arp2/3. Le récepteur serait donc en mesure de moduler l'activité de WAVE-1 par l'intermédiaire de sa phosphorylation par Cdk5 au niveau des sérines 310, 397 et 441. La déphosphorylation de WAVE-1 pourrait être médiée par la phosphatase PP2A, elle-même activée par la PKA, à la suite d'une activation du récepteur et de la voie G_s. WAVE-1 activée pourrait ainsi se lier à Arp2/3 catalysant la polymérisation de l'actine. La modulation de l'activité de WAVE-1 par le récepteur pourrait participer à son implication dans la morphogenèse des épines dendritiques.

B. Matériel & Méthodes

1. Rôle du récepteur 5-HT₆ dans la morphogenèse des épines dendritiques

a) Cultures primaires de neurones d'hippocampe

Les cultures primaires de neurones d'hippocampe ont été réalisées à partir d'embryons de souris Swiss à E17.5. Les neurones sont dissociés par un traitement de 5 minutes avec de la trypsine-EDTA 0,05% diluée au 1 :10 (*Life Technologies*), suivi par une dissociation mécanique à l'aide de trois pipettes pasteur rodées, de diamètre décroissant. Environ 1 million de neurones d'hippocampe sontensemencés par boîte de Pétri de 35mm de diamètre. Le milieu utilisé pour la culture est le Neurobasal (*Life Technologies*) supplémenté avec du B27 (50X, *Life Technologies*), du glutamax (100X, *Life Technologies*) et des antibiotiques. Afin d'optimiser l'adhésion des neurones au plastique ou aux lamelles de verre, celles-ci sont recouvertes de Poly-L-Ornithine (28,5 mg/L) pendant une nuit à 37°C. J'ai ensuite réalisé une deuxième phase de coating dans du milieu de culture supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) dialysé et 1µg/ml de laminine pendant 3 heures à 37°C. J'ai choisi d'utiliser du SVF dialysé afin d'éviter une contamination par la sérotonine contenue dans le sérum standard. La moitié du milieu de culture est remplacée par du milieu frais à 4, 7 et 10 DIV.

b) Transfection et traitements

Les neurones sont transfectés à 7DIV avec la lipofectamine 2000 (*Life Technologies*). On transfecte 2µg d'ADN plasmidique codant l'eGFP par boîte de 35mm. L'utilisation d'une protéine telle que l'eGFP permet d'observer la structure et la morphologie des épines dendritiques. L'agoniste du récepteur 5-HT₆ utilisé est le WAY181187 (2-(1-(6-chloroimidazo[2,1-b]thiazol-5-ylsulfonyl)-1*H*-indole-3-yl)ethanamine), synthétisé par le laboratoire Servier (Croissy-sur-Seine). L'antagoniste du récepteur est le SB271046 (5-chloro-N-(4-methoxy-3-piperazin-1-ylphenyl)-3-methyl-1-benzothiophene-2-sulfonamide) (*Tocris*). Les traitements avec le DMSO (véhicule, *vhcl*), le WAY181187 (WAY) ou le SB271046 (SB) sont effectués à 7DIV et les neurones sont ensuite fixés à 12DIV.

c) Immunocytochimie, microscopie et analyse

Les neurones sont fixés 10 min dans 4% de paraformaldéhyde (PFA). Les lamelles sont ensuite montées sur lame avec du Prolonggold (*Life Technologies*). Les images sont prises au grossissement 63X (objectif à immersion) sur un microscope à épifluorescence AxioImager Z1 équipé du système Apotome permettant une acquisition en mode pseudo-confocal (*Zeiss*). L'analyse des images est effectuée avec le logiciel ImageJ (*NIH*). L'aire de la tête des épines, la longueur du cou et le nombre d'épines par segment de 10 µm sont quantifiés manuellement. 10 neurones sont analysés par condition. Le segment quantifié mesure entre 10 et 30 µm et est choisi sur une dendrite secondaire ou tertiaire. Ce segment est le plus représentatif de la population d'épines dendritiques observée sur l'ensemble des dendrites d'un même neurone. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism (*GraphPad*), en utilisant une analyse de variance (ANOVA) simple suivie d'un test de Dunnett.

2. Etude de la phosphorylation de WAVE-1

a) Transfection et traitements

Les neuroblastomes NG108-15 sont cultivés dans du DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal standard (SVF), 2% d'un mélange d'hypoxanthine, d'aminoptérine et de thymidine (HAT, *Life Technologies*) et des antibiotiques (penicilline 5 IU/ml- streptomycine 5 mg/ml). Les cellules sont transfectées avec la lipofectamine 2000 (*Life technologies*) sur une période de 24 ou 48h. On transfecte 1µg d'ADN plasmidique par million de cellules. Les plasmides utilisés codent le récepteur 5-HT₆ humain avec une étiquette HA N-terminale (HA-5-HT₆), ou la protéine WAVE-1 humaine avec une étiquette GFP C-terminale (WAVE-1-GFP). Après la transfection, les cellules sont placées dans un milieu comprenant 2% de SVF dialysé, afin d'éviter une contamination par la sérotonine. Les traitements sont réalisés sur la durée indiquée.

b) Lyse et co-immunoprécipitations

Les cellules NG108-15, ou les neurones d'hippocampe, sont lysées dans un tampon contenant 20mM d'HEPES pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1% de NP40, 10% de glycérol, 4 mg/ml de dodecylmaltoside, des inhibiteurs de phosphatases (NaF, 10mM; Na⁺-vanadate, 2 mM; Na⁺-pyrophosphate, 1 mM et du β-glycerophosphate, 50 mM), et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Roche*), pendant 1h à 4°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 15 000 x g pendant 15 min à 4°C. Pour les immunoprécipitations, 3 mg de protéines sont incubées avec des billes d'agarose couplées à un anticorps anti-HA (*Sigma-Aldrich*) ou à un nanobody anti-GFP (*ChromoTek*) pendant 2h à 4°C. Après incubation, les protéines immunoprécipitées sont éluées avec une solution de Laemmli et chauffées 10 min à 70°C.

c) Western Blots

Les protéines lysées ou éluées sont déposées sur un gel SDS-PAGE. Après le transfert, les membranes sont saturées dans une solution de TBS-Tween 0.1% contenant 5% de lait ou de BSA, pendant 3h. Les anticorps primaires utilisés pour la révélation sont les suivants : anti WAVE-1 de lapin 1:1500 (*Sigma-Aldrich*), anti WAVE-1 (pSer³⁹⁷) de lapin 1:750 (*Sigma-Aldrich*), anti HA de souris 1:1000 (*Covance*). Les anticorps secondaires anti souris ou anti lapin sont couplés à la peroxydase de raifort (HRP, *GE Healthcare*) et utilisés au 1 :4000. La révélation est obtenue par une méthode de chimioluminescence (ECL plus detection reagent, *GE Healthcare*). L'intensité des bandes est quantifiée grâce au logiciel ImageJ (*NIH*).

C. Résultats

1. WAVE-1 interagit avec le récepteur 5-HT₆

La chromatographie d'affinité à partir du domaine C-terminal du récepteur 5-HT₆, décrite dans la première partie des résultats, a permis d'identifier une interaction entre le récepteur et Cdk5, sa cible WAVE-1, Arp2/3 et la phosphatase PP2A. Afin de confirmer l'interaction entre le récepteur 5-HT₆ entier et la protéine WAVE-1 j'ai utilisé une approche de co-immunoprécipitation. Les plasmides codant une version étiquetée HA en N-terminal du récepteur 5-HT₆ (HA-5-HT₆) et/ou une version étiquetée GFP en C-terminal de WAVE-1, sont surexprimés dans les cellules NG108-15. J'ai ensuite co-immunoprécipité la protéine WAVE-1 endogène avec le récepteur HA-5-HT₆ (*figure 1 Résultats, A*). D'autre part, j'ai co-immunoprécipité le récepteur HA-5-HT₆ avec la protéine WAVE-1-GFP (*figure 1 Résultats, B*). Cette première expérience m'a donc permis de confirmer l'interaction entre le récepteur 5-HT₆ dans sa conformation entière et la protéine WAVE-1 dans des cellules NG108-15. Sachant que la protéine WAVE-1 module la morphogenèse des épines dendritiques, je me suis donc ensuite intéressée au rôle de cette interaction dans la morphogenèse des épines dendritiques.

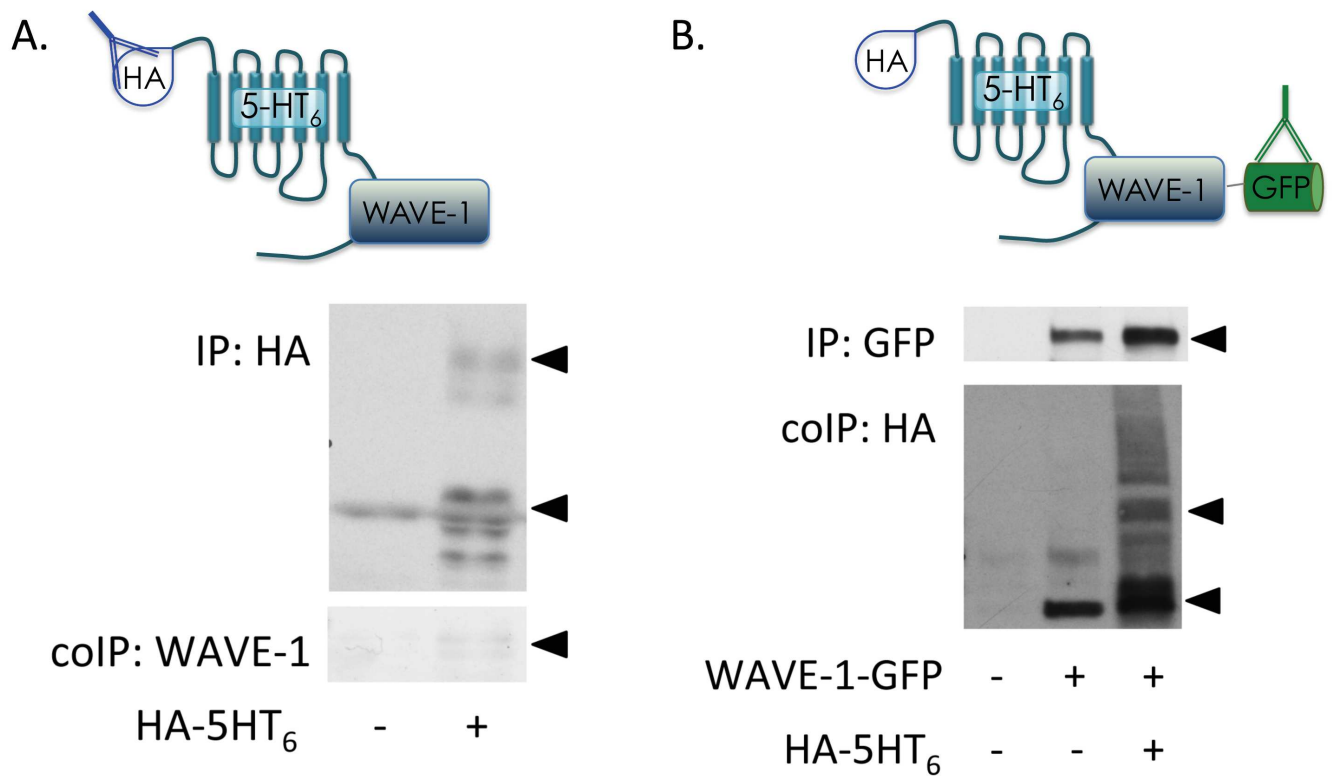


FIGURE 1 RESULTATS : LE RECEPTEUR 5-HT₆ INTERAGIT AVEC WAVE-1

(A) Le récepteur 5-HT₆ tagué HA en N-terminal (HA-5-HT₆) est surexprimé dans des cellules NG108-15 et immunoprécipité, l'interaction avec la protéine WAVE-1 endogène est révélée ici. (B) La protéine WAVE-1 taguée GFP en C-terminal (WAVE-1-GFP) ainsi que le récepteur (HA-5-HT₆) sont surexprimés dans des cellules NG108-15. La protéine WAVE-1-GFP est immunoprécipitée, on révèle son interaction avec le récepteur HA-5-HT₆.

2. Le récepteur 5-HT₆ module la morphogenèse des épines dendritiques

J'ai, dans un premier temps, déterminé le rôle du récepteur 5-HT₆ dans la morphogenèse des épines dendritiques. Pour cela, j'ai utilisé un modèle de culture primaire d'hippocampe. Dans ce modèle, les épines dendritiques se développent à partir de 7 DIV. Afin d'observer le rôle du récepteur 5-HT₆ dans la période précoce de développement des épines dendritiques j'ai choisi de réaliser mes expériences entre 7 et 12 DIV. Etant donné le rôle du récepteur 5-HT₆ endogène dans la pousse neuritique, j'ai d'abord choisi de ne pas surexprimer le récepteur dans les neurones en culture. Les cultures primaires utilisées dans la première partie de mes résultats étaient réalisées à partir d'embryons de rats. Cependant, même si son expression est moins importante que chez le rat, le récepteur 5-HT₆ est aussi exprimé dans l'hippocampe de souris. Suite au traitement des neurones avec un agoniste (WAY181187, 1μM) ou un antagoniste (SB271046, 1μM), trois paramètres ont été quantifiés : le nombre d'épines dendritiques par segment de 10 μm, la longueur du cou des épines dendritiques ainsi que la surface de leur tête. Les résultats obtenus sont présentés en *figure 2 Résultats*.

J'ai, pour ces expériences, choisi d'utiliser le SB271046 pour plusieurs raisons. D'abord parce que les traitements sont réalisés sur plusieurs jours (de 7 à 12DIV). Le SB271046 étant une molécule plus stable comparé au SB258585, l'utilisation de cet antagoniste m'a semblée plus adaptée dans le cas d'un traitement prolongé. D'autre part, cette molécule possède des propriétés pharmacologiques proches de celles du SB258585. En effet, le SB271046 est aussi un antagoniste sélectif du récepteur 5-HT₆ qui possède un pKi de 8.91 (contre 7.95 pour le SB258585) pour le récepteur de souris (Hirst et al., 2003).

Comme on peut le voir dans la *figure 2 Résultats*, le traitement des neurones avec un agoniste du récepteur 5-HT₆ diminue la taille de la tête et augmente en parallèle la longueur du cou de l'épine. A l'inverse, le traitement avec un antagoniste du récepteur 5-HT₆ est associé à des épines dont la tête est plus large et le cou plus court. Ces résultats suggèrent donc qu'une stimulation du récepteur 5-HT₆ augmente la proportion de structures de type filopodes à 12 DIV. A l'inverse, une inhibition du récepteur semble augmenter la proportion d'épines « mushroom ». Cette tendance devra toutefois être

approfondie par différentes approches développées dans la discussion. Le fait que l'antagoniste du récepteur ait un effet sur la morphogenèse des épines dendritiques 5-HT₆-dépendante indique que le récepteur exerce un contrôle constitutif sur ce processus neurodéveloppemental. De ce fait, je qualifierai le SB271046 d'agoniste inverse. Il sera toutefois intéressant de déterminer si le SB271046 est en mesure de réverser l'effet du WAY181187 sur la morphogenèse des épines dendritiques. Enfin, ce paradigme expérimental ne nous permet pas de trancher sur l'implication de la voie G_s et/ou de Cdk5. Pour cela, l'utilisation du mutant 5-HT₆-GsDead et du mutant dominant négatif de Cdk5 devrait apporter des éléments de réponses.

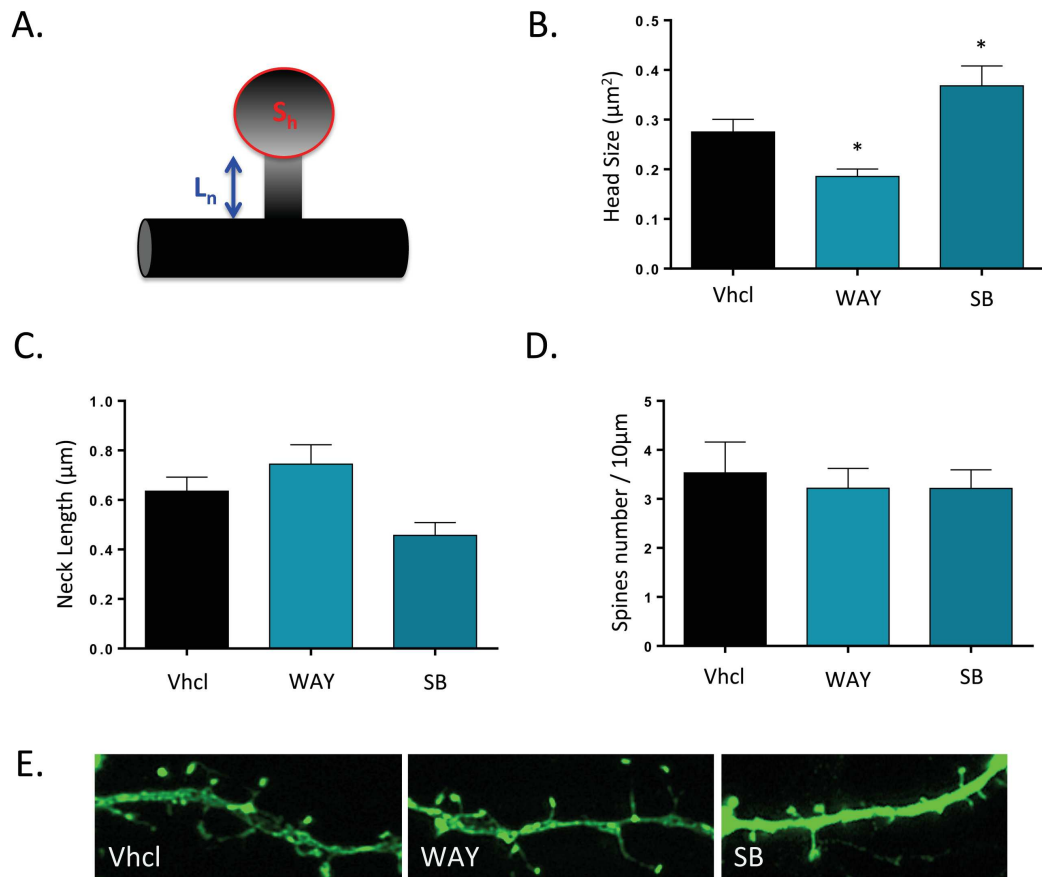


FIGURE 2 RESULTATS : LE RECEPTEUR 5-HT₆ MODULE LA MORPHOGENESE DES EPINES DENDRITIQUES

(A) Schéma d'une épine dendritique et des paramètres quantifiés avec en bleu la longueur du cou (L_n) et en rouge la surface de la tête (S_n). **(B)** Quantification de la surface de la tête des épines dendritiques. L'ANOVA simple suivie d'un test de Dunnett montre que ces résultats sont significatifs par rapport au contrôle (*: $p < 0.05$, $n=2$). **(C)** Quantification de la longueur du cou des épines dendritiques. **(D)** Quantification du nombre d'épines dendritiques par segment de 10 μm . Les données sont exprimées comme étant la moyenne de chaque condition $\pm$ SEM. **(E)** Segments de dendrites de neurones d'hippocampe en culture à 12 DIV représentant les différentes conditions analysées. Vhcl : contrôle DMSO, WAY : WAY18187, SB : SB271046.

Etant donné que le récepteur 5-HT₆ module la morphogenèse des épines dendritiques de façon agoniste-dépendante et indépendante, je me suis ensuite demandé dans quelle mesure l'agoniste ou l'agoniste inverse du récepteur affectaient la phosphorylation Cdk5-dépendante de WAVE-1.

3. Modulation de la phosphorylation de WAVE-1 par le récepteur 5-HT₆

La phosphorylation des sérines 310 et 397 par Cdk5, inhibe la polymérisation de l'actine dépendant de WAVE-1 (Kim et al., 2006). J'ai donc, dans un premier temps, validé la phosphorylation de WAVE-1 par Cdk5, au niveau de la Ser³⁹⁷, dans des cellules NG108-15 (*figure 3 Résultats, A*). J'ai, pour cela, utilisé une approche de Western blot avec un anticorps dirigé contre WAVE-1 et un anticorps dirigé spécifiquement contre la forme phosphorylée de WAVE-1, au niveau de la Ser³⁹⁷. Comme cela est illustré dans la *figure 3 Résultats (A)*, en l'absence de récepteur 5-HT₆, WAVE-1 est phosphorylée au niveau de la Ser³⁹⁷ dans les cellules NG108-15. Les expériences préliminaires réalisées dans les neurones d'hippocampe montrent que WAVE-1(Ser³⁹⁷) est aussi phosphorylée dans ce modèle (*figure 3 Résultats, B*). De plus, on peut voir que cette phosphorylation est bloquée par un traitement à la roscovitine (un inhibiteur de Cdk5), confirmant l'implication de Cdk5 dans ce processus.

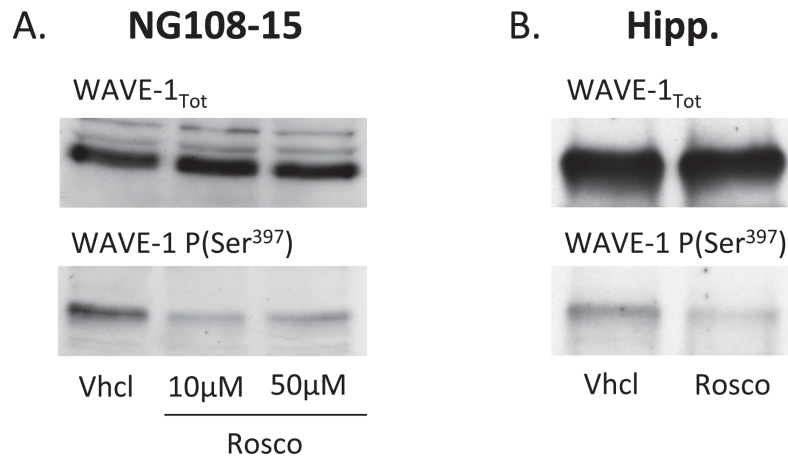


FIGURE 3 RESULTATS : CDK5 PHOSPHORYLE WAVE-1 (SER³⁹⁷) DANS LES NG108-15 ET LES NEURONES D'HIPPOCAMPES

(A) Les NG108-15 sont traitées avec 10 ou 50 μ M de roscovitine (rosco) ou de DMSO (vhcl) pendant 1h. Les cellules sont ensuite lysées et déposées sur gel SDS-PAGE. L'image représente ces différentes conditions révélées avec les anticorps reconnaissant WAVE-1 ou sa forme phosphorylée au niveau de la Ser³⁹⁷. **(B)** A 7 DIV, les neurones d'hippocampes sont traités avec 50 μ M de roscovitine (rosco) ou de DMSO (vhcl). Les neurones sont ensuite lysés et déposés sur gel SDS-PAGE. L'image représente ces différentes conditions révélées avec les anticorps reconnaissant WAVE-1 ou sa forme phosphorylée au niveau de la Ser³⁹⁷.

Suite à ces observations, j'ai souhaité savoir si le récepteur 5-HT₆ modulait la phosphorylation de WAVE-1 sur la Ser³⁹⁷. Pour cela, j'ai surexprimé une version étiquetée en N-terminal du récepteur 5-HT₆ dans les cellules NG108-15 et ai traité les cellules avec le WAY181187 ou le SB271046. Dans l'ensemble des expériences réalisées sur du lysat total, les variations de la phosphorylation de WAVE-1 en fonction de l'activité du récepteur 5-HT₆ n'étaient pas claires, quel que soit le temps de traitement utilisé (de 24h à 5 min). Ainsi, dans le but d'avoir une idée plus précise de l'état de phosphorylation de la protéine WAVE-1, directement associée au récepteur 5-HT₆, j'ai réalisé la même expérience mais en immunoprécipitant le récepteur. Etant donné le faible signal de co-immunoprécipitation de WAVE-1, cette approche ne m'a pas permis de trancher sur le niveau de phosphorylation de la Ser³⁹⁷. De plus, j'ai utilisé une approche protéomique afin de pouvoir répondre à cette question. J'ai, pour cela, immunoprécipité, grâce à une étiquette GFP C-terminale, la protéine WAVE-1 surexprimée dans les cellules NG108-15,

en présence ou en absence du récepteur 5-HT₆, dans le but d'identifier, par spectrométrie de masse, les peptides phosphorylés de manière différentielle dans ces conditions. Les phosphorylations Cdk5-dépendantes sont situées dans la région riche en proline de WAVE-1. De ce fait, l'obtention de peptides identifiables par spectrométrie de masse, à partir de cette région, est difficile et cette approche ne m'a donc pas permis d'observer les phosphorylations de WAVE-1 associées au récepteur. Il conviendra donc d'adapter le protocole de digestion de cette protéine afin de pouvoir générer les peptides contenant les différentes sérines phosphorylées par Cdk5. Enfin, cela pourrait être plus adapté d'observer les variations de phosphorylation de WAVE-1 directement dans les neurones d'hippocampe.

D. Discussion

Les résultats obtenus jusqu'à maintenant montrent que l'activité du récepteur 5-HT₆ a un impact sur la morphogenèse des épines dendritiques. Alors qu'une stimulation de neurones d'hippocampe en culture avec un agoniste du récepteur provoque la formation d'épines plus longues dont la tête est plus petite qu'en condition contrôle, l'exposition des neurones à un agoniste inverse induit la formation d'épines plus courtes avec une tête plus large. Afin de mieux comprendre l'implication du récepteur dans ce processus il sera nécessaire de préciser les différences observées dans la morphologie des épines dendritiques. Dans un premier temps, il faudra classer les épines observées dans ces expériences afin de pouvoir déterminer si les observations préliminaires reflètent un changement de proportion dans les différentes classes d'épines. De plus, avec l'approche utilisée ici, les épines « stubby » possédant un cou court et une tête large peuvent être confondues avec les épines « mushroom ». Il sera donc, par la suite, nécessaire d'ajouter le paramètre « diamètre du cou » à la quantification afin d'affiner cette classification. Entre 7 et 28 jours de culture la morphologie des épines dendritiques continue à évoluer (Papa et al., 1995). Il serait donc intéressant d'analyser le développement des épines dendritiques tout au long de la fenêtre de différenciation *in vitro* choisie (7-12 DIV). De même, on pourra effectuer un traitement chronique pour évaluer l'impact d'une stimulation prolongée du récepteur 5-HT₆ sur ce processus. D'autre part, afin de visualiser l'implication du récepteur 5-HT₆ dans la maturation des épines dendritiques, je pourrai utiliser une approche d'immunocytochimie afin de pouvoir quantifier les synapses avec

des anticorps marquant la synapse mature, comme PSD-95 par exemple. Des expériences d'électrophysiologie, visant à quantifier les courants excitateurs, permettront d'évaluer la fonctionnalité des épines dendritiques en culture après une stimulation ou une inhibition du récepteur 5-HT₆.

Une fois ces altérations caractérisées, je déterminerai l'implication respective des voies G_s et Cdk5 dans ce processus. Pour cela, l'utilisation des mutants 5-HT₆-G_sdead et Cdk5 dominant négatif me permettra de disséquer l'implication de ces deux protéines dans la morphogenèse des épines dendritiques dépendant du récepteur 5-HT₆. De plus, utiliser un modèle de culture primaire d'hippocampe afin de comprendre l'implication du complexe formé par le récepteur 5-HT₆ et son partenaire Cdk5 dans la phosphorylation de WAVE-1, me semble plus adapté que les cellules NG108-15. En effet, bien que ces cellules semblent former des structures semblables à des épines dendritiques, ceci n'a pas été clairement caractérisé, contrairement aux cultures primaires d'hippocampe. L'utilisation de neurones primaires permettra donc d'étudier ces événements de phosphorylation dans un contexte natif. Si le récepteur 5-HT₆ module la phosphorylation de WAVE-1 par l'intermédiaire de Cdk5, il serait intéressant de déterminer si cette activité est observable préférentiellement au niveau de l'épine dendritique. Une approche d'immunocytochimie ne m'a, pour l'instant, pas permis de répondre à cette question. Toutefois, la production de synaptosomes à partir d'hippocampes de souris pourrait permettre d'identifier les événements de phosphorylation de WAVE-1 dépendant du récepteur 5-HT₆, spécifiquement au niveau de la synapse. Cette approche pourra également être utilisée à partir d'autres structures comme le cortex ou le striatum.

Les résultats obtenus à l'issue de ces expériences, devraient me permettre de préciser l'impact du récepteur 5-HT₆ sur le développement des épines dendritiques et de déterminer si Cdk5 est impliquée dans ce processus par l'intermédiaire de la phosphorylation de WAVE-1. Une altération des épines dendritiques étant observées dans un certain nombre de pathologies neurodéveloppementales, comme par exemple la schizophrénie ou le syndrome du X fragile (Kulkarni and Firestein, 2012) ces résultats permettraient d'apporter de nouveaux éléments quant au développement des épines dendritiques et à la physiopathologie de ces désordres. Il sera, par ailleurs, intéressant de déterminer si le récepteur 5-HT₆ est impliqué dans la plasticité structurale des épines

dendritiques à l'âge adulte. Ceci pourrait apporter de nouveaux éléments quant au contrôle des processus cognitifs par le récepteur.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I. Le récepteur 5-HT₆ au cours du développement neuronal

A. Autres partenaires du récepteur 5-HT₆ potentiellement impliqués dans le développement neuronal

Alors que l'implication du récepteur 5-HT₆ et de la voie Cdk5 associée a été décrite dans les étapes de migration neuronale et de pousse neuritique, il est probable que le récepteur soit impliqué dans le contrôle d'autres aspects du développement neuronal en activant différentes voies de signalisation. En effet, plusieurs des partenaires intracellulaires du récepteur 5-HT₆ sont connus pour moduler le développement cérébral, comme je le décrirai dans ce chapitre.

1. 5-HT₆/G_s

La voie G_s, bien qu'elle ne soit pas impliquée dans l'élongation des neurites contrôlée par le récepteur 5-HT₆, pourrait médier d'autres effets neurodéveloppementaux mis en jeu par le récepteur. L'activation du facteur de transcription CREB est associée à une augmentation de la synthèse de facteurs de croissance comme le BDNF. Une stimulation du récepteur 5-HT₆ et l'activation de la voie G_s pourrait donc avoir des effets sur la survie et la maturation neuronale grâce à la production de ce facteur de croissance. De plus, l'AMPC intracellulaire participe au guidage du cône de croissance axonal médié par le BDNF dans les neurones spinaux de xénope. Ainsi, un inhibiteur de la PKA dans le milieu « transforme » le BDNF en facteur répulsif vis-à-vis du cône de croissance axonal (Song et al., 1997). Ces éléments suggèrent donc que ce second messager est un modulateur clé dans le guidage axonal. On peut donc imaginer que l'activation du récepteur contribue à la différenciation neuronale par l'intermédiaire de la voie G_s.

2. 5-HT₆/Fyn

La kinase Fyn est impliquée dans le contrôle de la migration par la reelin. La reelin se fixe sur ses récepteurs ApoER2 et VLDLR présents à la membrane des neurones en migration, et induit la phosphorylation de Dab1, protéine adaptatrice interagissant avec

le domaine intracellulaire de ces récepteurs, par les kinases Src et Fyn. Cette phosphorylation inhibe la phosphorylation de Tau activant la voie PI3K-Akt-GSK3 β . Ceci aura pour effet de stabiliser les microtubules au niveau des prolongements de tête des neurones et contrôle ainsi leur orientation et leur progression. On retrouve, chez les souris déficientes en Fyn et Src, un phénotype « reeler-like » confirmant l'implication de ces kinases dans la signalisation reelin-dépendante (Kuo et al., 2005). L'interaction entre le récepteur 5-HT₆ et Fyn pourrait, par exemple, favoriser l'activité membranaire de Fyn et faciliter son accès à Dab1. Fyn a également été impliquée dans la signalisation associée au cône de croissance axonal. La fixation de la Netrin-1, facteur chimiotactique, sur son récepteur DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*), exprimé au niveau du cône de croissance axonal, induit la phosphorylation de la RhoGEF Trio, par Fyn, au niveau de la Tyr²⁶²². Cette phosphorylation favorise l'association entre DCC et Trio, l'expression de ce complexe au niveau du cône de croissance axonal, et l'élongation axonale Netrin-1 dépendante (DeGeer et al., 2013). Il serait donc intéressant de déterminer dans quelle mesure le complexe 5-HT₆/Fyn contrôle les processus neurodéveloppementaux.

3. 5-HT₆/mTOR

La protéine mTOR semble impliquée dans la physiopathologies de troubles neurodéveloppementaux. Dans un modèle pré-clinique du syndrome de Rett, Ricciardi et coll. ont observé une diminution de la signalisation mTOR dans le cortex sensoriel primaire et l'hippocampe, associée à une diminution de la synthèse protéique dans ces régions (Ricciardi et al., 2011). De plus, une dérégulation de la signalisation mTOR est associée aux déficits cognitifs observés dans un modèle du syndrome du X fragile (Sharma et al., 2010). D'autre part, la voie PI3K-Akt-mTOR a également été impliquée dans le développement dendritique. En effet, dans un modèle de culture primaire d'hippocampe, une activation de cette voie est impliquée dans la complexification de l'arbre dendritique, ainsi que dans la maturation des épines dendritiques, en aval d'une stimulation au BDNF (Kumar et al., 2005). Alors que cette voie semble importante dans la maturation de l'arborisation dendritique, son contrôle par le récepteur 5-HT₆ pourrait donc être impliqué dans le développement neuronal. La phase précoce d'élongation des neurites contrôlée par le récepteur 5-HT₆ est indépendante de la voie mTOR. On ne peut cependant pas exclure que cette voie intervienne dans des étapes plus tardives de complexification de l'arbre dendritique.

4. 5-HT₆/NF1

Une mutation dans le gène codant la neurofibromine (NF1) est associée à la Neurofibromatose de type 1. Une altération des fonctions neuronales et astrocytaires est observée dans cette pathologie. De plus, les patients atteints de la Neurofibromatose de type 1 présentent des déficits cognitifs caractérisés par des difficultés d'apprentissage. Notre équipe a récemment identifié une interaction entre le récepteur 5-HT₆ et la neurofibromine (Meffre et al., 2012). Du point de vue fonctionnel, la neurofibromine est une GTPase régulant l'activité de la protéine Ras et qui participe à l'activation de l'adénylate cyclase par la protéine G_s, ainsi qu'au contrôle de l'activité de mTOR, deux voies impliquées dans le développement neuronal (Tong et al., 2002). Au cours des phases précoces du développement cérébral, NF1 est impliquée dans le développement de la dendrite apicale des neurones pyramidaux du cortex ainsi que dans le développement des astrocytes et des oligodendrocytes dans le cerveau (Hegedus et al., 2007). L'interaction entre NF1 et le récepteur 5-HT₆ pourrait donc participer au contrôle du développement neuronal par le récepteur.

5. 5-HT₆/MAP1b

Une interaction entre le récepteur 5-HT₆ et la protéine MAP1b vient d'être d'identifiée. MAP1b interagit avec le récepteur par l'intermédiaire de sa sous-unité LC1 (*Light Chain 1*) et contrôle son activité ainsi que son expression membranaire (Kim et al., 2014). MAP1b pourrait donc réguler le trafic et l'adressage du récepteur 5-HT₆. MAP1b joue également un rôle dans l'activité des Rho GTPases. En effet, MAP1b module l'activité de Rac1 par l'intermédiaire de la Rho GEF Tiam1. Un déficit en MAP1b est, par ailleurs, associé à une augmentation de l'activité de RhoA et à une diminution de l'activité de Cdc42 et de Rac1. L'interaction entre MAP1b et Tiam1 induit donc une augmentation de l'activité Rac1, associée à la morphogenèse du cône de croissance axonal dans des neurones d'hippocampe de rat (Henríquez et al., 2012). L'interaction entre MAP1b et Tiam1 se fait au niveau de la sous-unité légère (*LC1*) de la protéine MAP1b, soit le même domaine que celui impliqué dans l'interaction entre MAP1b et le récepteur 5-HT₆ (Henríquez et al., 2012). Alors que l'activation de Rac1 par le complexe MAP1b/Tiam1 est associée au développement du cône de croissance axonal, on pourrait donc imaginer que le récepteur 5-HT₆ puisse séquestrer MAP1b via son interaction avec la sous-unité LC1

l'empêchant ainsi d'interagir avec Tiam1. Ceci pourrait permettre de basculer d'une voie favorisant la croissance axonale, par l'intermédiaire de l'interaction MAP1b/Tiam1, vers une voie en faveur d'autres étapes développementales médiées par le complexe 5-HT₆/MAP1b. Dans le cas inverse, si l'interaction de MAP1b avec Tiam1 et avec le récepteur 5-HT₆, via la sous-unité LC1, est possible, cela suggère l'existence d'une voie alternative dans la modulation de l'activité des Rho GTPases par le récepteur 5-HT₆.

6. 5-HT₆/GPRIN1

Le domaine C-terminal du récepteur 5-HT₆ interagit également avec la protéine GPRIN1 (*G-Protein Regulated Inducer of Neurite outgrowth 1*). Cette protéine est impliquée dans la pousse neuritique en réponse à l'activation la protéine G_{i/o}. GPRIN1, spécifiquement exprimée dans le cerveau et particulièrement enrichie au niveau des cônes de croissance neuritiques, se lie à la conformation active de la protéine G_{i/o}. L'activation de GPRIN1 par G_{i/o} conduit à une activation de la Rho GTPase Cdc42, associée à la pousse neuritique observée dans des cellules Neuro2A (Nakata and Kozasa, 2005). L'ARNm de GPRIN1 est exprimé tout au long du développement du système nerveux central chez la souris. Son apparition au niveau du télencéphale est détectée dès le jour embryonnaire 9.5 (E9.5). L'expression de GPRIN1 augmente à E14.5, et on en observe notamment dans l'hippocampe, le cortex, le bulbe olfactif ou le striatum. L'expression de GPRIN1 à l'âge adulte est limitée au cerveau. On en retrouve essentiellement dans le bulbe olfactif et l'hippocampe, soit dans des régions où de nouveaux neurones sont formés, suggérant une implication de GPRIN1 dans la neurogenèse adulte (Masuho et al., 2008). Le récepteur 5-HT₆ pourrait donc également contrôler le développement neuritique ainsi que le développement des neurones adultes, par l'intermédiaire de son interaction avec GPRIN1.

7. 5-HT₆/Paralemmin

La paralemmin est une protéine fortement exprimée dans le cerveau. Elle est impliquée dans la dynamique de la membrane plasmique et notamment dans la formation de filopodes grâce à un groupement C-terminal de cystéines palmitoylées permettant son insertion membranaire (Kutzleb et al., 1998). Une interaction entre la paralemmin et le domaine C-terminal du récepteur 5-HT₆ a aussi été identifiée dans le crible protéomique décrit en première partie des résultats. D'un point de vue fonctionnel

il a été montré que la paralemmin participait à la ramification des neurones d'hippocampe en culture et qu'elle était impliquée dans la formation des précurseurs d'épines dendritiques ainsi que dans la maturation de ces dernières (Arstikaitis et al., 2008). L'interaction entre le récepteur 5-HT₆ et la paralemmin pourrait donc participer au contrôle de la dynamique de la membrane plasmique neuronale et à la maturation de l'arborisation dendritique.

8. Perspectives

Le récepteur 5-HT₆ est donc associé à plusieurs effecteurs impliqués dans le contrôle du développement neuronal. Ceux-ci sont schématisés dans la *figure 17*. Alors que le récepteur 5-HT₆ contrôle plusieurs processus clé du développement neuronal (Dayer et al., 2015), on ne sait pas encore dans quelle mesure le récepteur met en jeu toutes ces voies au cours du développement. Il sera donc intéressant d'élucider la fonction neurodéveloppementale de ces interactions afin de préciser le rôle du récepteur 5-HT₆ dans le développement neuronal. On peut, par ailleurs, imaginer que l'activation sélective de ces différentes voies de signalisation puisse être régulée, dans l'espace et dans le temps pendant le développement cérébral, par l'expression du récepteur, mais aussi de ses partenaires intracellulaires. Plusieurs de ces partenaires modulent également l'expression membranaire du récepteur. Ceci suggère que l'expression du récepteur 5-HT₆ à la membrane des neurones pourrait être régulée au cours du développement par son interaction avec des protéines comme Jab-1 ou MAP1b.

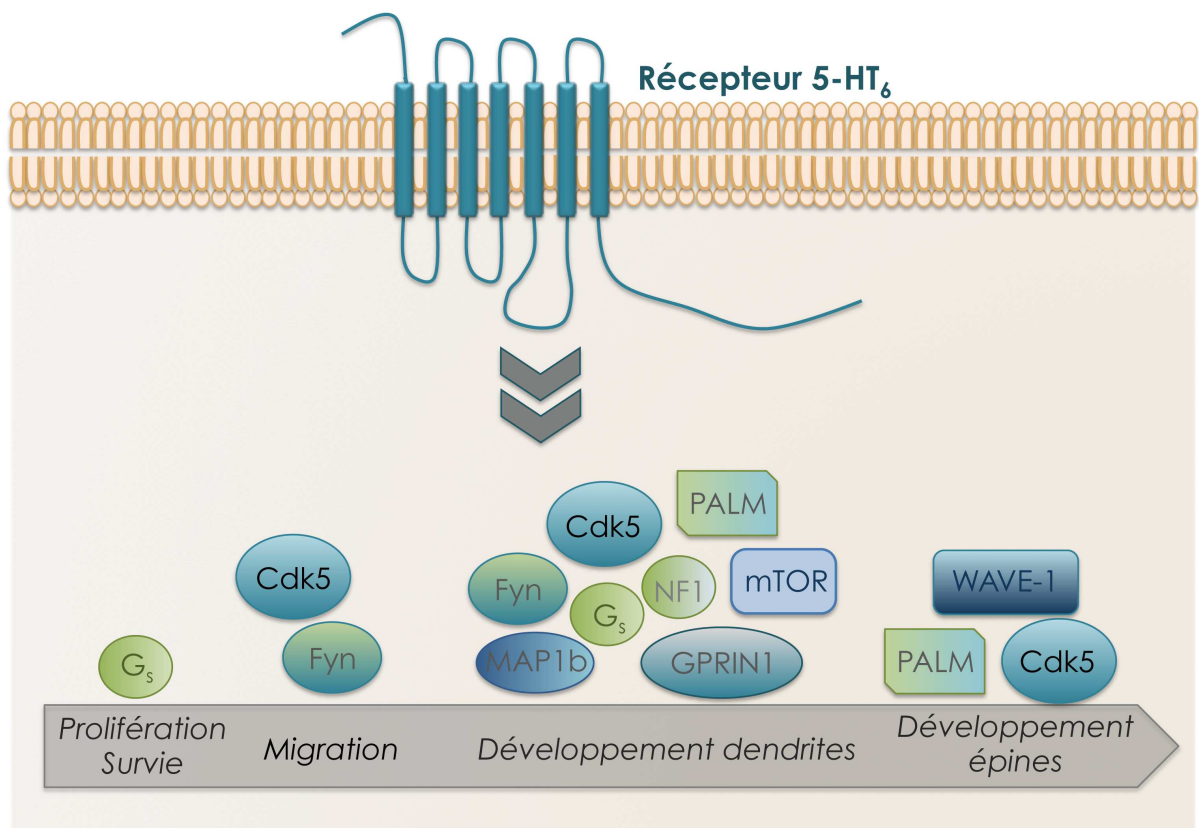


FIGURE 17 : LE RECEPTEUR 5-HT₆ ET SES EFFECTEURS DANS LE DEVELOPPEMENT NEURONAL

Le récepteur 5-HT₆ régule différentes étapes du développement neuronal, notamment par l'intermédiaire de son interaction avec Cdk5. Cependant, plusieurs partenaires intracellulaires du récepteur jouent également un rôle dans le développement neuronal. Le récepteur 5-HT₆ pourrait donc contrôler différents processus tout au long du développement neuronal via ces interactions.

B. Régulation de la signalisation associée au récepteur 5-HT₆ au cours du développement neuronal

La régulation dans l'espace et dans le temps des voies de signalisation mises en jeu par un même récepteur est une notion intéressante permettant de mettre en perspective les multiples couplages associés à un même RCPG.

1. Régulation temporelle

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, le développement cérébral est le fruit du déroulement progressif de différentes étapes. L'ordre de ces étapes est donc important. L'émergence de concepts, comme par exemple les « neurones corridor », illustre la nécessité d'une mise en place progressive des circuits cérébraux et l'imbrication des différentes phases développementales. Le positionnement de certains neurones est essentiel à l'établissement de voies de projection provenant d'autres groupes neuronaux. C'est par exemple le cas des projections thalamo-corticales, dont le guidage nécessite la migration préalable d'un groupe de neurones issus du sous-pallium (López-Bendito et al., 2006). Alors que les neurones provenant de l'éminence ganglionnaire médiane sont répulsifs pour les axones thalamo-corticaux, les neurones issus de l'éminence ganglionnaire latérale (EGL) sont eux permissifs pour ces mêmes axones. Le positionnement de neurones migrant à partir de l'EGL, appelés « neurones corridors », sur le chemin des axones thalamocorticaux va donc permettre à ces derniers de traverser l'éminence ganglionnaire médiane pour atteindre le cortex et établir leurs connections (López-Bendito et al., 2006). De même, au cours de la migration neuronale, le cheminement de certains groupes de neurones, comme les interneurons corticaux provenant de l'éminence ganglionnaire, est dicté par l'existence de voies permissives ou répulsives, notamment imposées par le positionnement d'autres neurones, comme les interneurons striataux (Marín et al., 2001). Ces résultats illustrent donc comment différentes étapes neurodéveloppementales peuvent être complémentaires. On imagine facilement qu'un défaut développemental plus ou moins précoce pourra avoir des conséquences importantes.

Le profil temporel d'expression des différents récepteurs impliqués dans le développement neuronal est un premier niveau de contrôle de ce processus. Le récepteur

5-HT₆ apparaît de manière assez précoce au cours du développement et est impliqué dans les premières phases du développement neuronal par l'intermédiaire de son interaction avec Cdk5 (migration neuronale, pousse neuritique précoce). De même, le récepteur 5-HT₇ joue un rôle dans la pousse neuritique et dans la formation des épines dendritiques et cette fonction est liée à son profil d'expression. En effet, ce récepteur est fortement exprimé au cours de la phase précoce de développement post-natal, durant laquelle on assiste à la complexification de l'arborisation dendritique et à la formation des épines. Son expression diminue ensuite au cours des phases plus tardives (Kobe et al., 2012).

Les différentes voies de signalisation associées aux RCPG peuvent également être régulées au cours du temps par les variations d'expression de leurs partenaires intracellulaires. C'est le cas de la signalisation G₁₂ associée au récepteur 5-HT₇. L'activation de la voie G₁₂ par ce dernier est restreinte aux étapes de développement dendritique et de formation des épines car l'expression de G₁₂ est également diminuée à l'âge adulte (Kobe et al., 2012). Dans le cas du récepteur 5-HT₆, l'expression du co-activateur de Cdk5, nécessaire à son activité, est régulée au cours du développement. Le rôle du complexe 5-HT₆/Cdk5 dans le développement neuronal serait donc limité à la période d'expression de p35. Le récepteur 5-HT₆ étant couplé à différentes voies de signalisation neurodéveloppementales, ces voies pourraient intervenir plus ou moins successivement au cours du développement. Étant donné les rôles variés de ces partenaires intracellulaires au cours du développement neuronal, chacun pourra être impliqué dans différentes étapes neurodéveloppementales (migration, développement de l'arborisation dendritique, croissance axonale, formation des épines dendritiques). Ceci suggère que le récepteur 5-HT₆ serait en mesure de moduler tous les aspects du développement neuronal. Il serait, par ailleurs, intéressant de déterminer si le récepteur 5-HT₆ intervient aussi dans le contrôle de la neurogenèse adulte.

L'implication d'un RCPG dans le développement neuronal dépend donc, non seulement du profil d'expression du récepteur, mais également du profil d'expression de ses partenaires intracellulaires, impliqués dans la signalisation neurodéveloppementale. Alors que la disponibilité en ligand au cours du développement pourra moduler l'activation de ces différentes voies, certains partenaires intracellulaires régulent directement l'activité

du récepteur auquel ils s'associent. Ainsi, l'activité du récepteur 5-HT₆ peut être contrôlée par Cdk5. En effet, c'est la phosphorylation de la Ser³⁵⁰ du récepteur 5-HT₆, par p35/Cdk5, qui provoque la pousse neuritique dépendant du récepteur 5-HT₆, de manière agoniste-indépendante. La migration neuronale contrôlée par le récepteur 5-HT₆ est, de la même façon, un processus agoniste-indépendant faisant intervenir l'activité de Cdk5 (Jacobshagen et al., 2014). Ceci s'avère intéressant dans le contexte neurodéveloppemental et supporte l'existence de mécanismes de régulation intrinsèques au cours des phases précoces du développement neuronal, indépendants de la 5-HT, mais impliquant le complexe 5-HT₆/Cdk5. D'un point de vue physiologique, alors qu'un excès de sérotonine a des effets délétères sur la migration neuronale, ce mécanisme agoniste-indépendant pourrait être intéressant dans les cas de déprivation en sérotonine. Une déprivation en 5-HT ne devrait, en effet, pas avoir d'impact majeur sur la migration neuronale et la pousse neuritique médiées par le récepteur 5-HT₆. Le contrôle de l'activité d'autres RCPG par une GIP a également été mis en évidence. L'activité constitutive des récepteurs glutamatergiques mGluR1a et mGluR5 est inhibée par leur interaction intracellulaire avec la protéine Homer3. La protéine Homer1a, dont l'expression augmente à la suite d'une activité neuronale soutenue, constitue un dominant négatif vis-à-vis de cette interaction. La dissociation de Homer3 des récepteurs mGluR1a/5, provoquée par Homer1a, révèle ainsi l'activité constitutive de ces récepteurs (Ango et al., 2001).

Alors que la régulation temporelle des voies de signalisation neurodéveloppementales engagées par un RCPG serait importante pour la mise en place des circuits cérébraux, ces voies pourront également être régulées en fonction de leur localisation sub-cellulaire.

2. Régulation spatiale

a) Polarisation de la signalisation

Certains récepteurs membranaires sont exprimés en pré- et post-synapse. Les voies de signalisation engagées par le même récepteur dans les compartiments pré- et postsynaptique peuvent être différentes. C'est par exemple le cas des récepteurs des neurotrophines. Les récepteurs Trk pré-synaptiques sont impliqués dans la croissance axonale via une signalisation locale, ou sont internalisés et transportés par voie

rétrograde, en association aux microtubules, vers le corps cellulaire, où ils activent les voies de signalisation promouvant la survie cellulaire (Heerssen and Segal, 2002).

Le récepteur CB1 des endocannabinoïdes, un RCPG couplé à la protéine $G_{i/o}$, participe également au développement neuronal (Gaffuri et al., 2012). L'activité de ce récepteur est différente en fonction de sa localisation sub-cellulaire (Ladarre et al., 2014). Ce récepteur, normalement présent au niveau axonal, est transitoirement exprimé à la membrane du compartiment somato-dendritique. Alors que le récepteur CB1 est activé localement dans ce compartiment et induit une diminution de la production d'AMPc somato-dendritique, au niveau axonal, cette activation de la voie $G_{i/o}$ n'est pas observée. Ces différences s'expliquent notamment par la composition du microenvironnement du récepteur CB1. En effet, l'enzyme impliquée dans la synthèse de l'endocannabinoïde majoritaire, le 2-arachidonoylglycérol (2-AG), est exprimée dans le compartiment somato-dendritique et permet la synthèse locale de 2-AG, associée à l'activation du récepteur CB1 dans ce compartiment (Ladarre et al., 2014). Dans cette étude, Ladarre *et coll.* suggèrent également que la modulation de l'environnement membranaire du récepteur CB1, par la synthèse locale de 2-AG, modifie la réponse du récepteur vis-à-vis de différents agonistes (Ladarre et al., 2014). Cet exemple illustre comment l'activité d'un RCPG peut être modulée par sa localisation sub-cellulaire et notamment par son microenvironnement.

Le cil primaire polarise aussi l'expression de certains RCPG et joue un rôle important dans la neurogenèse. Le cil primaire neuronal concentre, en effet, différents récepteurs impliqués dans le développement comme le récepteur des neurotrophines p75NTR, le récepteur 5-HT₆ et le récepteur Smoothened (Guadiana et al., 2013). Les mécanismes de transport intraflagellaire (IFT) permettent la formation et la stabilisation du cil primaire (Guadiana et al., 2013). Une invalidation du gène codant une protéine impliquée dans le transport intraflagellaire (Ift20) dans les progéniteurs neuronaux adultes, provoque une ablation du cil primaire neuronal. Cette ablation est associée à une diminution de la prolifération des progéniteurs neuronaux confirmant l'importance du cil primaire dans le développement neuronal (Amador-Arjona et al., 2011). D'autre part, la surexpression de récepteurs ciliaires au cours du développement cortical chez la souris (E15.5) par électroporation *in utero*, comme par exemple le récepteur 5-HT₆, provoque une croissance aberrante du cil primaire et une augmentation de l'expression de protéines

impliquées dans le transport intraflagellaire, dans les neurones du cortex. Cette modification de la structure du cil primaire est associée à une diminution de la complexité de l'arborisation dendritique de ces neurones corticaux (Guadiana et al., 2013). Ces résultats montrent donc que la régulation de la signalisation au niveau du cil primaire est importante pour la structure du cil lui-même, mais aussi pour le développement neuronal. De plus, ces résultats suggèrent que le récepteur 5-HT₆ pourrait avoir un rôle dans la formation et/ou la stabilisation du cil primaire.

En plus de contrôler leur activité, les GIP peuvent également contrôler l'adressage des RCPG. C'est, par exemple, le cas du récepteur ciliaire Smoothened (Smo). Le récepteur Smo est impliqué dans la signalisation Sonic Hedgehog (Shh) au cours du développement. Comme je l'ai précisé dans le paragraphe précédent, Smo fait partie des RCPG enrichis au niveau du cil primaire. Il a été montré que les β -arrestines 1 et 2 étaient co-localisées, dans le cil primaire, avec le récepteur Smo et la protéine de transport intraflagellaire Kif3A (Kovacs et al., 2008). Cette étude a, par la suite, montré qu'une fois activé, le récepteur Smo interagit avec Kif3A par l'intermédiaire des β -arrestines 1 et 2. Cette interaction est nécessaire à l'adressage du complexe au niveau du cil primaire et à l'activation subséquente des facteurs de transcription Gli, médiant la signalisation Shh (Kovacs et al., 2008). Les mécanismes impliquant les β -arrestines et le récepteur 5-HT₆ ne sont pas connus. Cependant, on peut imaginer que l'adressage du récepteur 5-HT₆ soit également médiée par son interaction avec l'un de ses partenaires intracellulaires.

Ces exemples montrent donc que l'activité des RCPG peut varier en fonction de leur localisation sub-cellulaire et de leur microenvironnement et suggèrent un rôle de leurs partenaires intracellulaires dans leur compartimentalisation. Tous ces éléments suggèrent également qu'un même RCPG pourrait activer des voies de signalisation différentes en fonction de sa localisation sub-cellulaire. Ils soulèvent toutefois quelques questions concernant l'activité du récepteur 5-HT₆. On peut par exemple se demander si la localisation ciliaire du récepteur 5-HT₆ pourrait être directement associée à son rôle neurodéveloppemental ; ou encore si son expression dans le cil primaire pourrait simplement être impliquée dans la formation du cil primaire lui-même. De manière plus

générale, il serait aussi intéressant de déterminer si l'activation des différentes voies de signalisation engagées par le récepteur 5-HT₆ dépend de sa localisation sub-cellulaire. Certaines voies pourraient être spécifiquement activées dans les épines dendritiques, par exemple ; de même, la voie impliquant Cdk5 pourrait être concentrée au niveau du cil primaire neuronal, peut-être de façon temporaire.

Alors que l'activité d'un RCPG peut varier en fonction de sa localisation sub-cellulaire, cette activité peut également être le moteur direct de sa re-localisation, comme cela a été montré avec le récepteur Smo.

b) Localisation dépendante de l'activité

Leterrier *et coll.* ont montré que l'activation du récepteur CB1 médiait sa localisation sub-cellulaire et participait à la distribution polarisée du récepteur dans les neurones (Leterrier et al., 2006). En effet, alors que le microenvironnement du récepteur CB1 module localement son activité, comme je l'ai décrit dans le sous-chapitre précédent, l'activité somato-dendritique de ce récepteur provoque rapidement son internalisation. Ainsi, alors qu'un traitement avec un agoniste du récepteur CB1 augmente son internalisation somato-dendritique, avec un effet moindre sur l'internalisation du récepteur axonal, le traitement avec un agoniste inverse maintient le récepteur à la surface somato-dendritique. Le blocage du mécanisme d'endocytose, médiant l'internalisation du récepteur CB1, induit une augmentation de l'expression membranaire somato-dendritique du récepteur, associée à une diminution subséquente de son expression à la membrane axonale (Leterrier et al., 2006). Ces résultats suggèrent donc que l'activité localisée du récepteur CB1 est associée à son internalisation rapide dans le compartiment somato-dendritique et que ce processus est nécessaire à la polarisation de l'expression membranaire du récepteur. Le même type d'observations a été réalisé pour le récepteur 5-HT_{1B}. Comme je l'ai évoqué en introduction, plusieurs RCPG possèdent une activité constitutive, or l'activité constitutive du récepteur 5-HT_{1B} est nécessaire à son endocytose permettant son adressage axonal. A l'inverse, le récepteur 5-HT_{1A} possédant une activité constitutive moindre, est exprimé à la membrane du compartiment somato-dendritique (Carrel et al., 2011).

L'activité constitutive du récepteur 5-HT₆ vis-à-vis de la voie G_s a été observée dans la lignée de neuroblastomes NG108-15 mais également dans des neurones de striatum en culture (Dayer et al., 2015). Cependant, cette activité constitutive ne semble pas associée à une endocytose massive. En effet, l'expression membranaire du récepteur, surexprimé dans les cellules NG108-15, est plutôt stable et le traitement avec l'agoniste ou l'agoniste inverse du récepteur n'induit pas de relocalisation observable de ce dernier. Dans les neurones, l'effet d'un traitement sur la localisation du récepteur endogène n'a pas pu être observé étant donné l'absence d'anticorps reconnaissant spécifiquement le récepteur 5-HT₆. Toutefois, aucune différence n'a été remarquée entre la localisation de l'expression du récepteur sauvage et celle du récepteur muté G_sdead, qui ne possède plus d'activité constitutive, lorsque ceux-ci ont été surexprimés dans des neurones en culture. L'implication de l'activité constitutive du récepteur 5-HT₆ dans son adressage reste donc une question ouverte.

En conclusion, bien que l'implication des différents partenaires intracellulaires du récepteur 5-HT₆ dans son rôle neurodéveloppemental reste à déterminer, l'activation successive de ces différentes voies de signalisation pourrait être contrôlée par la régulation dans le temps de l'expression des partenaires du récepteur 5-HT₆. De plus, il est possible que l'activation différentielle de ces voies de signalisation par le récepteur soit associée à sa localisation sub-cellulaire.

II. Potentiel thérapeutique du récepteur 5-HT₆ dans les pathologies psychiatriques neurodéveloppementales

Alors que la sérotonine est un acteur majeur dans l'établissement des circuits cérébraux, le récepteur 5-HT₆ de la sérotonine apparaît comme une cible thérapeutique de choix dans le traitement des altérations cognitives observées dans les pathologies neurodéveloppementales, comme la schizophrénie. Etant donné le rôle central du récepteur dans le développement neuronal, la compréhension des mécanismes physiopathologiques associés au récepteur 5-HT₆ dans les désordres neurodéveloppementaux pourrait permettre le développement de stratégies thérapeutiques adaptées pour traiter les symptômes cognitifs associés aux pathologies comme la schizophrénie ou les troubles du spectre autistique, comme je l'aborderai dans la troisième partie de ce chapitre.

A. Indices cliniques d'un lien entre le récepteur 5-HT₆ et les pathologies neurodéveloppementales

Comme je l'ai mentionné en introduction, un seul polymorphisme a été identifié sur le gène codant le récepteur 5-HT₆. Les études qui ont suivi n'ont pas permis d'établir clairement de lien entre la présence de ce polymorphisme et le développement de pathologies psychiatriques (Woolley et al., 2004).

D'autres études ont, cependant, permis d'identifier une altération de l'expression du récepteur 5-HT₆ chez des patients schizophrènes. Le récepteur 5-HT₆ est exprimé dans plusieurs régions impliquées dans la physiopathologie de la schizophrénie, comme le cortex préfrontal, le striatum ou l'hippocampe. Une approche de RT-PCR sur des extraits de cerveaux humains a permis de constater une diminution bilatérale du niveau d'ARNm codant le récepteur 5-HT₆ dans l'hippocampe de sujets schizophrènes comparé à des sujets contrôles (East et al., 2002). Un dysfonctionnement de l'hippocampe est associé aux symptômes cognitifs de la schizophrénie (Ragland et al., 2007). Une diminution de l'expression du récepteur 5-HT₆ dans cette structure pourrait donc être à l'origine d'une

altération de la neurotransmission hippocampique sous-tendant les dysfonctionnements observés. Cette approche ne permet pas de déterminer si l'expression du récepteur est altérée dans la période neurodéveloppementale. Une altération de l'expression du récepteur 5-HT₆ au cours du développement neuronal pourrait également impacter la neurotransmission hippocampique à l'âge adulte et ainsi constituer un facteur de risque pour la schizophrénie.

B. Implication du récepteur 5-HT₆ dans la physiopathologie des troubles psychiatriques neurodéveloppementaux

Comme l'illustre la *figure 18*, quelle que soit sa nature (génétique ou environnementale) un élément perturbateur survenant au cours du développement cérébral aura des conséquences sur la mise en place des circuits cérébraux et très probablement sur le comportement.

La sérotonine étant un acteur central dans le développement neuronal, une altération de la transmission sérotoninergique induira des défauts dans la mise en place précoce des circuits cérébraux, conduisant à une connectivité défectueuse, associée à une vulnérabilité face aux troubles comportementaux. Le récepteur 5-HT₆ pourrait donc médier certaines de ces altérations, à la fois par des mécanismes dépendant de la sérotonine, mais également par des mécanismes agoniste-indépendants.

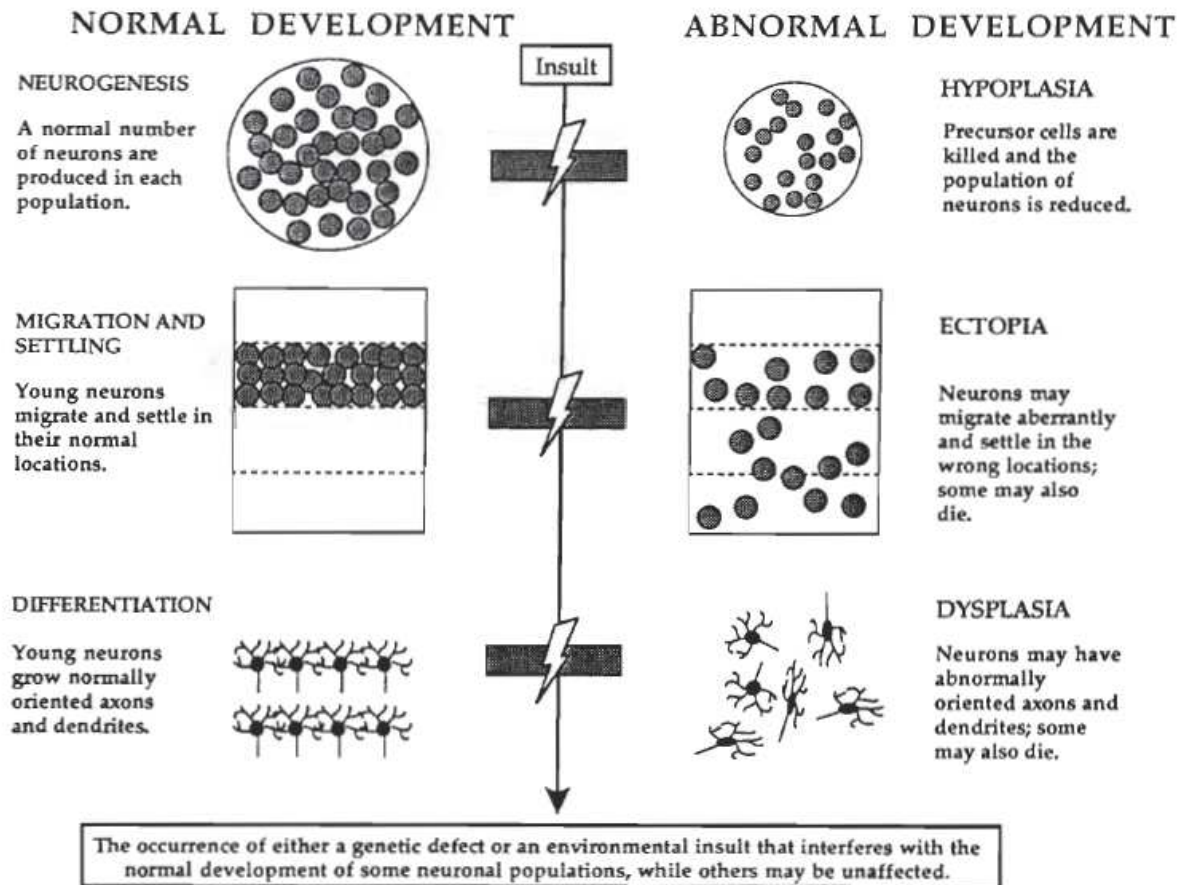


FIGURE 18 : IMPACT SUR LE DEVELOPPEMENT CEREBRAL D'UNE PERTURBATION SURVENANT A DIFFERENTES ETAPES

Au cours du développement cérébral un élément perturbateur pourra avoir différentes conséquences en fonction de la période neurodéveloppementale au cours de laquelle il intervient. Toutefois, il en résultera une altération de la connectivité cérébrale. (Bayer et al., 1993).

1. Schizophrénie

La schizophrénie se caractérise par trois types de symptômes: les symptômes positifs (délires, hallucinations), négatifs (démotivation, repli sur soi) et cognitifs. Les déficits cognitifs dans la schizophrénie touchent des processus comme la mémorisation (mémoire de travail, mémoire sémantique) ou les fonctions exécutives (planification, organisation) (Simpson et al., 2010). Alors que les premières hypothèses sur la physiopathologie de la schizophrénie évoquent une diminution de l'activité du lobe frontal, ou « hypofrontalité », des études plus récentes d'imagerie fonctionnelle révèlent

un dysfonctionnement au niveau du cortex préfrontal dorsolatéral (dlPFC) et de l'hippocampe chez les sujets schizophrènes, sous-tendant les altérations cognitives impliquées dans cette pathologie (Ragland et al., 2007). De plus, une altération de la transmission GABAergique a été observée dans le dlPFC de sujets schizophrènes (Lewis et al., 2005). Ce dysfonctionnement est associé à une perte de la synchronie des neurones pyramidaux du cortex, favorisant l'émergence de troubles cognitifs (Lewis et al., 2005). Enfin, l'hypofrontalité observée dans cette pathologie est associée à un dysfonctionnement de l'activité du striatum, probablement dû à une altération de la transmission dopaminergique (Simpson et al., 2010).

Ainsi, même si les mécanismes physiopathologiques précis impliqués dans l'émergence des symptômes cognitifs de la schizophrénie ne sont pas totalement compris, les différentes études s'accordent sur l'existence d'un dysfonctionnement des réseaux neuronaux impliqués dans les fonctions cognitives, dû à une altération de la neurotransmission au sein de ces réseaux. Un défaut dans la mise en place de ces circuits au cours du développement serait à l'origine de l'altération de la connectivité neuronale observée dans cette pathologie. Le récepteur 5-HT₆ est fortement exprimé dans les régions impliquées dans les déficits cognitifs observés dans la schizophrénie. Une altération de l'activité du récepteur au cours du développement de ces circuits neuronaux pourrait donc sous-tendre l'émergence des symptômes cognitifs de la schizophrénie. En conclusion, la localisation cellulaire du récepteur 5-HT₆ dans les réseaux neuronaux associés aux processus cognitifs affectés dans la schizophrénie, ainsi que son rôle neurodéveloppemental majeur, suggèrent que ce récepteur pourrait participer aux altérations de la circuiterie neuronale et de la neurotransmission impliqués dans les symptômes cognitifs observés dans cette pathologie.

2. Troubles du spectre autistique

Les troubles du spectre autistique se caractérisent par un défaut dans les processus de communication, d'interaction sociale, une inflexibilité cognitive ainsi que par l'expression de comportements stéréotypés. Une rupture de l'homéostasie sérotoninergique, notamment caractérisée par une augmentation du taux de sérotonine sanguin, est un facteur de risque pour les TSA chez l'Homme. Cette « hypersérotoninémie », observée chez 30% des patients atteints de TSA, pourrait avoir

un impact sur le développement cérébral durant la période pendant laquelle la barrière hémato-encéphalique n'est pas fermée. Un excès de sérotonine au cours du développement provoque une élimination des terminaisons sérotoninergiques dans le cerveau par un mécanisme de rétrocontrôle négatif, altérant, en conséquence, la formation des circuits cérébraux. Ces altérations pourraient sous-tendre les dysfonctionnements comportementaux observés dans les TSA (Whitaker-Azmitia, 2005). Comme je l'ai précédemment mentionné, un excès de sérotonine au cours du développement cérébral impacte également la migration des neurones corticaux par l'intermédiaire du récepteur 5-HT₆. On peut donc émettre l'hypothèse selon laquelle une altération de la signalisation associée au récepteur 5-HT₆, provoquée par un excès de sérotonine au cours du développement, participerait à l'altération de la circuiterie corticale, affectant en conséquence certains comportements complexes chez les patients TSA, comme le comportement social par exemple.

Les pathologies psychiatriques neurodéveloppementales, comme la schizophrénie ou les TSA, sont généralement associées à des déficits cognitifs affectant particulièrement la vie quotidienne des patients. Les thérapies développées jusqu'à maintenant ne s'avèrent pas efficaces dans le traitement de ces symptômes. C'est la raison pour laquelle il y a, à l'heure actuelle, un réel besoin de développer de nouveaux traitements, ou de nouvelles approches thérapeutiques, visant à restaurer les fonctions cognitives de ces patients (Millan et al., 2012). Alors que le récepteur 5-HT₆ pourrait participer à la pathogenèse de ces désordres, les antagonistes sélectifs du récepteur ont des effets très encourageants sur le traitement des altérations cognitives notamment observées dans la schizophrénie. Toutefois, comme je le présenterai dans le chapitre suivant, d'autres stratégies thérapeutiques médiées par le récepteur 5-HT₆ pourraient être envisagées.

C. Le récepteur 5-HT₆ comme cible thérapeutique dans les pathologies psychiatriques neurodéveloppementales

L'une des particularités du récepteur 5-HT₆ est son enrichissement dans le système nerveux central. Etant donné l'éventail de processus contrôlés par la sérotonine au niveau périphérique, cette localisation centrale est un atout majeur dans l'utilisation du récepteur comme cible thérapeutique. D'autre part, son expression dans les régions contrôlant les fonctions cognitives contribue à l'action pro-cognitive des antagonistes de ce récepteur.

Le récepteur 5-HT₆ est une cible thérapeutique actuellement exploitée dans le traitement des déficits cognitifs associés à la schizophrénie (Codony et al., 2011). L'effet des drogues ciblant le récepteur 5-HT₆ peut, cependant, être variable en fonction de la concentration utilisée. C'est notamment le cas des agonistes du récepteur. Le WAY181187, par exemple, bloque le processus de LTP induit dans l'aire CA1 de l'hippocampe de manière dose-dépendante et biphasique chez le rat. En effet, alors qu'une concentration en WAY181187 comprise entre 100 et 300nM altère la LTP, une dose de 1 µM n'a pas d'effet. Ces observations soulèvent la possibilité que d'autres mécanismes de signalisation, associés au récepteur 5-HT₆, entrent en jeu lors de l'utilisation de doses plus élevées d'agoniste (West et al., 2009). D'autre part, l'effet des agonistes du récepteur 5-HT₆ sur la production de BDNF dépend de la fréquence de traitement. Une administration sub-chronique de LY-586713 à des rats, pendant 4 jours, augmente le niveau d'ARNm codant le BDNF dans l'hippocampe, alors qu'aucun changement dans l'expression de cet ARNm n'est constaté après 14 jours de traitement (de Foubert et al., 2013). Même si ces observations concernent les agonistes du récepteur 5-HT₆, qui ont pour la plupart un effet délétère sur la cognition, elles suggèrent qu'en fonction de la dose de ligand et de la fréquence de traitement, la signalisation engagée par le récepteur 5-HT₆ pourra varier. Le récepteur 5-HT₆ pourrait, par exemple, avoir un effet « dose-dépendant » sur la cognition, positif d'une part, en activant le facteur de transcription CREB et négatif d'autre part, en recrutant la protéine mTOR (Millan et al., 2012). Dans l'optique de développer des stratégies pharmacologiques toujours plus efficaces, il sera donc important de comprendre l'impact de la dose et de la fréquence de traitement, sur la signalisation induite par le récepteur 5-HT₆. De même, l'étude de la sélectivité

fonctionnelle de ces différents ligands, soit leur capacité à stabiliser préférentiellement l'une des conformations actives du récepteur, pourra participer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques associées au récepteur 5-HT₆. Ceci pourrait notamment permettre le développement de ligands biaisés activant de manière sélective une voie de transduction associée au récepteur.

Alors que certains antagonistes sélectifs du récepteur 5-HT₆ sont déjà en phase de développement clinique dans le traitement des symptômes cognitifs de la schizophrénie, cela ne semble pas être le cas pour les troubles du spectre autistique. Il serait donc intéressant d'approfondir ces études et d'évaluer l'efficacité de telles molécules sur des modèles pré-cliniques de la pathologie, dans des paradigmes d'interaction sociale par exemple.

Enfin, le rôle neurodéveloppemental du récepteur 5-HT₆ pourrait être exploité dans le développement d'une stratégie thérapeutique basée sur le processus de neurogenèse adulte. L'utilisation des précurseurs neuraux adultes dans le développement de thérapies « cellulaires » est envisagée depuis quelques années (Lim et al., 2002). Contrairement à l'utilisation de cellules souches embryonnaires, l'utilisation de ces précurseurs neuraux adultes semble plus envisageable d'un point de vue éthique mais aussi pratique. Cependant, le succès d'une telle approche dépendra du niveau de compréhension des processus neurodéveloppementaux impliqués dans la différenciation et dans l'intégration des neurones « néo-formés ». De ce fait, il serait intéressant d'évaluer le rôle du récepteur 5-HT₆ dans le développement de ces neurones. Si le récepteur 5-HT₆ joue un rôle dans ce processus, il serait également intéressant de développer des ligands spécifiquement associés à la fonction neurodéveloppementale du récepteur afin de promouvoir pharmacologiquement la neurogenèse adulte. Il a été montré qu'une infusion ventriculaire de BDNF augmentait la neurogenèse au niveau de la zone sous-ventriculaire chez le rat, stimulant l'apparition de nouveaux neurones (Pencea et al., 2001). Ainsi, une augmentation de la synthèse de BDNF induite par le récepteur 5-HT₆ dans cette région pourrait promouvoir la survie et le développement de précurseurs neuraux. Une restauration de la neurogenèse adulte par des ligands du récepteur 5-HT₆ pourrait ainsi participer à l'amélioration des performances cognitives dans des pathologies psychiatriques neurodéveloppementales comme les TSA ou la schizophrénie.

III. Conclusion Générale

Depuis sa découverte, le récepteur 5-HT₆ a fait l'objet de nombreuses études. Du fait de sa localisation, mais également du caractère pro-cognitif de ses antagonistes, ce récepteur constitue un intérêt thérapeutique prometteur dans le traitement des affections cognitives observées dans diverses pathologies neurologiques ou psychiatriques, comme la maladie d'Alzheimer ou la schizophrénie.

Comme j'ai pu le montrer au cours de ma thèse, le récepteur 5-HT₆ joue un rôle central dans la différenciation neuronale, notamment par l'intermédiaire de son interaction avec Cdk5. Ce récepteur est impliqué de manière constitutive dans la migration des neurones du cortex ainsi que dans le mécanisme d'élongation neuritique. De plus, bien que les mécanismes impliqués restent à démontrer, le récepteur 5-HT₆ semble également contrôler le développement des épines dendritiques. Ces résultats, ainsi que l'interaction entre le récepteur et différentes protéines impliquées dans le développement neuronal, suggèrent fortement que le récepteur 5-HT₆ régule de nombreuses étapes clés de la formation des circuits cérébraux. La caractérisation des mécanismes sous-tendant l'implication neurodéveloppementale du récepteur 5-HT₆, à laquelle mon travail de thèse a participé, pourrait permettre d'élucider certains aspects de la pathogenèse des troubles cognitifs observés dans un certain nombre de pathologies neurodéveloppementales. Il serait, de ce fait, intéressant d'évaluer dans quelle mesure une altération de l'activité du récepteur 5-HT₆, au cours du développement cérébral, favorise l'émergence de troubles cognitifs. La compréhension des voies de signalisation associées au récepteur 5-HT₆, ainsi que de leurs mécanismes de régulation précis, dans l'espace et dans le temps, pourrait contribuer à développer de nouvelles approches thérapeutiques visant à rétablir les fonctions cognitives. Ainsi, l'étude des mécanismes de signalisation associés au récepteur 5-HT₆ et de la sélectivité fonctionnelle des ligands spécifiques du récepteur, apparaît comme une voie très prometteuse afin d'améliorer les fonctions cognitives, notamment dans le contexte des pathologies neurodéveloppementales, comme la schizophrénie ou les troubles du spectre autistique.

BIBLIOGRAPHIE

Van Aelst, L., and Cline, H.T. (2004). Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr. Opin. Neurobiol.* *14*, 297–304.

Ahern, G.P. (2011). 5-HT and the immune system. *Curr. Opin. Pharmacol.* *11*, 29–33.

Ahn, J.-H., McAvoy, T., Rakhilin, S.V., Nishi, A., Greengard, P., and Nairn, A.C. (2007). Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 2979–2984.

Aimone, J.B., Li, Y., Lee, S.W., Clemenson, G.D., Deng, W., and Gage, F.H. (2014). Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol. Rev.* *94*, 991–1026.

Amador-Arjona, A., Elliott, J., Miller, A., Ginbey, A., Pazour, G.J., Enikolopov, G., Roberts, A.J., and Terskikh, A.V. (2011). Primary cilia regulate proliferation of amplifying progenitors in adult hippocampus: implications for learning and memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 9933–9944.

Ango, F., Prézeau, L., Muller, T., Tu, J.C., Xiao, B., Worley, P.F., Pin, J.P., Bockaert, J., and Fagni, L. (2001). Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer. *Nature* *411*, 962–965.

Ansorge, M.S., Zhou, M., Lira, A., Hen, R., and Gingrich, J.A. (2004). Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science* *306*, 879–881.

Aoki, K., Nakamura, T., and Matsuda, M. (2004). Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 713–719.

Arnt, J., Bang-Andersen, B., Grayson, B., Bymaster, F.P., Cohen, M.P., DeLapp, N.W., Giethlen, B., Kreilgaard, M., McKinzie, D.L., Neill, J.C., et al. (2010). Lu AE58054, a 5-HT₆ antagonist, reverses cognitive impairment induced by subchronic phencyclidine in a novel object recognition test in rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol. Off. Sci. J. Coll. Int. Neuropsychopharmacol. CINP* *13*, 1021–1033.

Arstikaitis, P., Gauthier-Campbell, C., Carolina Gutierrez Herrera, R., Huang, K., Levinson, J.N., Murphy, T.H., Kilimann, M.W., Sala, C., Colicos, M.A., and El-Husseini, A. (2008). Paralemmin-1, a modulator of filopodia induction is required for spine maturation. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2026–2038.

Asada, A., Yamamoto, N., Gohda, M., Saito, T., Hayashi, N., and Hisanaga, S.-I. (2008). Myristoylation of p39 and p35 is a determinant of cytoplasmic or nuclear localization of active cyclin-dependent kinase 5 complexes. *J. Neurochem.* *106*, 1325–1336.

- Barnes, N.M., and Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083–1152.
- Barnes, A.P., Solecki, D., and Polleux, F. (2008). New insights into the molecular mechanisms specifying neuronal polarity in vivo. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 44–52.
- Bayer, S.A., Altman, J., Russo, R.J., and Zhang, X. (1993). Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 14, 83–144.
- Beffert, U., Weeber, E.J., Morfini, G., Ko, J., Brady, S.T., Tsai, L.-H., Sweatt, J.D., and Herz, J. (2004). Reelin and cyclin-dependent kinase 5-dependent signals cooperate in regulating neuronal migration and synaptic transmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 1897–1906.
- Benhamú, B., Martín-Fontecha, M., Vázquez-Villa, H., Pardo, L., and López-Rodríguez, M.L. (2014). Serotonin 5-HT₆ receptor antagonists for the treatment of cognitive deficiency in Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 57, 7160–7181.
- Bockaert, J., and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723–1729.
- Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A., and Fagni, L. (2003). The “magic tail” of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* 546, 65–72.
- Bockaert, J., Fagni, L., Dumuis, A., and Marin, P. (2004). GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol. Ther.* 103, 203–221.
- Boess, F.G., Monsma, F.J., and Sleight, A.J. (1998). Identification of residues in transmembrane regions III and VI that contribute to the ligand binding site of the serotonin 5-HT₆ receptor. *J. Neurochem.* 71, 2169–2177.
- Bonnin, A., Goeden, N., Chen, K., Wilson, M.L., King, J., Shih, J.C., Blakely, R.D., Deneris, E.S., and Levitt, P. (2011). A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature* 472, 347–350.
- Boylan, C.B., Blue, M.E., and Hohmann, C.F. (2007). Modeling early cortical serotonergic deficits in autism. *Behav. Brain Res.* 176, 94–108.
- Burianek, L.E., and Soderling, S.H. (2013). Under lock and key: spatiotemporal regulation of WASP family proteins coordinates separate dynamic cellular processes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 258–266.

- Canli, T., and Lesch, K.-P. (2007). Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nat. Neurosci.* *10*, 1103–1109.
- Carrel, D., Simon, A., Emerit, M.B., Rivals, I., Leterrier, C., Biard, M., Hamon, M., Darmon, M., and Lenkei, Z. (2011). Axonal targeting of the 5-HT_{1B} serotonin receptor relies on structure-specific constitutive activation. *Traffic Cph. Den.* *12*, 1501–1520.
- Ceglia, I., Kim, Y., Nairn, A.C., and Greengard, P. (2010). Signaling pathways controlling the phosphorylation state of WAVE1, a regulator of actin polymerization. *J. Neurochem.* *114*, 182–190.
- Chameau, P., Inta, D., Vitalis, T., Monyer, H., Wadman, W.J., and van Hooft, J.A. (2009). The N-terminal region of reelin regulates postnatal dendritic maturation of cortical pyramidal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 7227–7232.
- Chen, Z., Borek, D., Padrick, S.B., Gomez, T.S., Metlagel, Z., Ismail, A.M., Umetani, J., Billadeau, D.D., Otwinowski, Z., and Rosen, M.K. (2010). Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* *468*, 533–538.
- Cheng, L., Chen, C.-L., Luo, P., Tan, M., Qiu, M., Johnson, R., and Ma, Q. (2003). Lmx1b, Pet-1, and Nkx2.2 coordinately specify serotonergic neurotransmitter phenotype. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 9961–9967.
- Cheung, Z.H., Chin, W.H., Chen, Y., Ng, Y.P., and Ip, N.Y. (2007). Cdk5 is involved in BDNF-stimulated dendritic growth in hippocampal neurons. *PLoS Biol.* *5*, e63.
- Cobos, I., Borello, U., and Rubenstein, J.L.R. (2007). Dlx transcription factors promote migration through repression of axon and dendrite growth. *Neuron* *54*, 873–888.
- Codony, X., Vela, J.M., and Ramírez, M.J. (2011). 5-HT(6) receptor and cognition. *Curr. Opin. Pharmacol.* *11*, 94–100.
- Côté, F., Fligny, C., Fromes, Y., Mallet, J., and Vodjdani, G. (2004). Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. *Trends Mol. Med.* *10*, 232–238.
- Cruz, J.C., and Tsai, L.-H. (2004). A Jekyll and Hyde kinase: roles for Cdk5 in brain development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* *14*, 390–394.
- Cruz, J.C., Tseng, H.-C., Goldman, J.A., Shih, H., and Tsai, L.-H. (2003). Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* *40*, 471–483.

D

Dahl, J.P., Wang-Dunlop, J., Gonzales, C., Goad, M.E.P., Mark, R.J., and Kwak, S.P. (2003). Characterization of the WAVE1 knock-out mouse: implications for CNS development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 3343–3352.

Dawson, L.A., Nguyen, H.Q., and Li, P. (2000). In vivo effects of the 5-HT(6) antagonist SB-271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate. *Br. J. Pharmacol.* *130*, 23–26.

Dawson, L.A., Nguyen, H.Q., and Li, P. (2001). The 5-HT(6) receptor antagonist SB-271046 selectively enhances excitatory neurotransmission in the rat frontal cortex and hippocampus. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *25*, 662–668.

Dayer, A.G., Jacobshagen, M., Chaumont-Dubel, S., and Marin, P. (2015). 5-HT6 Receptor: A New Player Controlling the Development of Neural Circuits. *ACS Chem. Neurosci.*

DeGeer, J., Boudeau, J., Schmidt, S., Bedford, F., Lamarche-Vane, N., and Debant, A. (2013). Tyrosine phosphorylation of the Rho guanine nucleotide exchange factor Trio regulates netrin-1/DCC-mediated cortical axon outgrowth. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 739–751.

Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *8*, 1454–1468.

Duan, X., Chang, J.H., Ge, S., Faulkner, R.L., Kim, J.Y., Kitabatake, Y., Liu, X., Yang, C.-H., Jordan, J.D., Ma, D.K., et al. (2007). Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* *130*, 1146–1158.

Durand, C.M., Perroy, J., Loll, F., Perrais, D., Fagni, L., Bourgeron, T., Montcouquiol, M., and Sans, N. (2012). SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Mol. Psychiatry* *17*, 71–84.

E

East, S.Z., Burnet, P.W.J., Kerwin, R.W., and Harrison, P.J. (2002). An RT-PCR study of 5-HT(6) and 5-HT(7) receptor mRNAs in the hippocampal formation and prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr. Res.* *57*, 15–26.

Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Kirschner, M.W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* *418*, 790–793.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* *4*, 1313–1317.

Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., and Frisé, J. (2014). Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156, 1072–1083.

F

La Fata, G., Gärtner, A., Domínguez-Iturza, N., Dresselaers, T., Dawitz, J., Poorthuis, R.B., Avena, M., Himmelreich, U., Meredith, R.M., Achsel, T., et al. (2014). FMRP regulates multipolar to bipolar transition affecting neuronal migration and cortical circuitry. *Nat. Neurosci.* 17, 1693–1700.

De Foubert, G., Khundakar, A.A., and Zetterström, T.S. (2013). Effects of repeated 5-HT₆ receptor stimulation on BDNF gene expression and cell survival. *Neurosci. Lett.* 553, 211–215.

Frassetto, A., Zhang, J., Lao, J.Z., White, A., Metzger, J.M., Fong, T.M., and Chen, R.Z. (2008). Reduced sensitivity to diet-induced obesity in mice carrying a mutant 5-HT₆ receptor. *Brain Res.* 1236, 140–144.

Fu, W.-Y., Cheng, K., Fu, A.K.Y., and Ip, N.Y. (2011). Cyclin-dependent kinase 5-dependent phosphorylation of Pctaire1 regulates dendrite development. *Neuroscience* 180, 353–359.

G

Gaffuri, A.-L., Ladarre, D., and Lenkei, Z. (2012). Type-1 cannabinoid receptor signaling in neuronal development. *Pharmacology* 90, 19–39.

Gambello, M.J., Darling, D.L., Yingling, J., Tanaka, T., Gleeson, J.G., and Wynshaw-Boris, A. (2003). Multiple dose-dependent effects of Lis1 on cerebral cortical development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 1719–1729.

Gaspar, P., Cases, O., and Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 1002–1012.

Gautreau, A., Ho, H.H., Li, J., Steen, H., Gygi, S.P., and Kirschner, M.W. (2004). Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4379–4383.

Ge, S., Goh, E.L.K., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G., and Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589–593.

Gérard, C., Martres, M.P., Lefèvre, K., Miquel, M.C., Vergé, D., Lanfumey, L., Doucet, E., Hamon, M., and el Mestikawy, S. (1997). Immuno-localization of serotonin 5-HT₆ receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain Res.* 746, 207–219.

Gershon, M.D. (2013). 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 20, 14–21.

Gleeson, J.G., Allen, K.M., Fox, J.W., Lamperti, E.D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E.C., Dobyns, W.B., Minnerath, S.R., Ross, M.E., et al. (1998). Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 92, 63–72.

González-Maeso, J., Ang, R.L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N.V., López-Giménez, J.F., Zhou, M., Okawa, Y., Callado, L.F., Milligan, G., et al. (2008). Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* 452, 93–97.

Gould, D.J. (2014). *Lippincott's pocket neuroanatomy* (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins).

Govek, E.-E., Newey, S.E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 19, 1–49.

Guadiana, S.M., Semple-Rowland, S., Daroszewski, D., Madorsky, I., Breunig, J.J., Mykytyn, K., and Sarkisian, M.R. (2013). Arborization of dendrites by developing neocortical neurons is dependent on primary cilia and type 3 adenylyl cyclase. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 2626–2638.

H

Hagmann, H., Taniguchi, Y., Pippin, J.W., Kauerz, H.-M., Benzing, T., Shankland, S.J., and Brinkkoetter, P.T. (2015). Cyclin I and p35 determine the subcellular distribution of Cdk5. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 308, C339–C347.

Hall, R.A., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (1999). Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J. Cell Biol.* 145, 927–932.

Hamon, M., Doucet, E., Lefèvre, K., Miquel, M.C., Lanfumey, L., Insausti, R., Frechilla, D., Del Rio, J., and Vergé, D. (1999). Antibodies and antisense oligonucleotide for probing the distribution and putative functions of central 5-HT₆ receptors. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 21, 68S – 76S.

Harada, T., Morooka, T., Ogawa, S., and Nishida, E. (2001). ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nat. Cell Biol.* 3, 453–459.

Harris, K.M., Jensen, F.E., and Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 2685–2705.

Hawasli, A.H., Benavides, D.R., Nguyen, C., Kansy, J.W., Hayashi, K., Chambon, P., Greengard, P., Powell, C.M., Cooper, D.C., and Bibb, J.A. (2007). Cyclin-dependent kinase 5 governs learning and synaptic plasticity via control of NMDAR degradation. *Nat. Neurosci.* 10, 880–886.

Heal, D.J., Smith, S.L., Fisas, A., Codony, X., and Buschmann, H. (2008). Selective 5-HT₆ receptor ligands: progress in the development of a novel pharmacological approach to the treatment of obesity and related metabolic disorders. *Pharmacol. Ther.* **117**, 207–231.

Heerssen, H.M., and Segal, R.A. (2002). Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci.* **25**, 160–165.

Hegedus, B., Dasgupta, B., Shin, J.E., Emmett, R.J., Hart-Mahon, E.K., Elghazi, L., Bernal-Mizrachi, E., and Gutmann, D.H. (2007). Neurofibromatosis-1 regulates neuronal and glial cell differentiation from neuroglial progenitors in vivo by both cAMP- and Ras-dependent mechanisms. *Cell Stem Cell* **1**, 443–457.

Henríquez, D.R., Bodaleo, F.J., Montenegro-Venegas, C., and González-Billault, C. (2012). The light chain 1 subunit of the microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is responsible for Tiam1 binding and Rac1 activation in neuronal cells. *PLoS One* **7**, e53123.

Hill, J.J., Hashimoto, T., and Lewis, D.A. (2006). Molecular mechanisms contributing to dendritic spine alterations in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **11**, 557–566.

Hirst, W.D., Abrahamsen, B., Blaney, F.E., Calver, A.R., Aloj, L., Price, G.W., and Medhurst, A.D. (2003). Differences in the central nervous system distribution and pharmacology of the mouse 5-hydroxytryptamine-6 receptor compared with rat and human receptors investigated by radioligand binding, site-directed mutagenesis, and molecular modeling. *Mol. Pharmacol.* **64**, 1295–1308.

Hirst, W.D., Stean, T.O., Rogers, D.C., Sunter, D., Pugh, P., Moss, S.F., Bromidge, S.M., Riley, G., Smith, D.R., Bartlett, S., et al. (2006). SB-399885 is a potent, selective 5-HT₆ receptor antagonist with cognitive enhancing properties in aged rat water maze and novel object recognition models. *Eur. J. Pharmacol.* **553**, 109–119.

Hoyer, D., Hannon, J.P., and Martin, G.R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**, 533–554.

Huang, J., and Manning, B.D. (2008). The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem. J.* **412**, 179–190.

Hüfner, K., Higgs, H.N., Pollard, T.D., Jacobi, C., Aepfelbacher, M., and Linder, S. (2001). The verprolin-like central (vc) region of Wiskott-Aldrich syndrome protein induces Arp2/3 complex-dependent actin nucleation. *J. Biol. Chem.* **276**, 35761–35767.

J

Jacobshagen, M., Niquille, M., Chaumont-Dubel, S., Marin, P., and Dayer, A. (2014). The serotonin 6 receptor controls neuronal migration during corticogenesis via a ligand-independent Cdk5-dependent mechanism. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 3370–3377.

K

Kang, H., Lee, W.K., Choi, Y.H., Vukoti, K.M., Bang, W.G., and Yu, Y.G. (2005). Molecular analysis of the interaction between the intracellular loops of the human serotonin receptor type 6 (5-HT₆) and the alpha subunit of GS protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *329*, 684–692.

Katsuyama, Y., and Terashima, T. (2009). Developmental anatomy of reeler mutant mouse. *Dev. Growth Differ.* *51*, 271–286.

Kaufmann, W.E., and Moser, H.W. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *10*, 981–991.

Keefe, R.S.E., Bilder, R.M., Davis, S.M., Harvey, P.D., Palmer, B.W., Gold, J.M., Meltzer, H.Y., Green, M.F., Capuano, G., Stroup, T.S., et al. (2007). Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Arch. Gen. Psychiatry* *64*, 633–647.

Kim, A.S., Kakalis, L.T., Abdul-Manan, N., Liu, G.A., and Rosen, M.K. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* *404*, 151–158.

Kim, J.Y., Duan, X., Liu, C.Y., Jang, M.-H., Guo, J.U., Pow-anpongkul, N., Kang, E., Song, H., and Ming, G. (2009). DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron* *63*, 761–773.

Kim, S.-H., Kim, D.H., Lee, K.H., Im, S.-K., Hur, E.-M., Chung, K.C., and Rhim, H. (2014). Direct interaction and functional coupling between human 5-HT₆ receptor and the light chain 1 subunit of the microtubule-associated protein 1B (MAP1B-LC1). *PLoS One* *9*, e91402.

Kim, Y., Sung, J.Y., Ceglia, I., Lee, K.-W., Ahn, J.-H., Halford, J.M., Kim, A.M., Kwak, S.P., Park, J.B., Ho Ryu, S., et al. (2006). Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature* *442*, 814–817.

King, M.V., Sleight, A.J., Woolley, M.L., Topham, I.A., Marsden, C.A., and Fone, K.C.F. (2004). 5-HT₆ receptor antagonists reverse delay-dependent deficits in novel object discrimination by enhancing consolidation—an effect sensitive to NMDA receptor antagonism. *Neuropharmacology* *47*, 195–204.

Kiyasova, V., and Gaspar, P. (2011). Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance. *Eur. J. Neurosci.* *34*, 1553–1562.

- Ko, J., Humbert, S., Bronson, R.T., Takahashi, S., Kulkarni, A.B., Li, E., and Tsai, L.H. (2001). p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 6758–6771.
- Kobe, F., Guseva, D., Jensen, T.P., Wirth, A., Renner, U., Hess, D., Müller, M., Medrihan, L., Zhang, W., Zhang, M., et al. (2012). 5-HT₇R/G12 signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 2915–2930.
- Kohen, R., Fashingbauer, L.A., Heidmann, D.E., Guthrie, C.R., and Hamblin, M.W. (2001). Cloning of the mouse 5-HT₆ serotonin receptor and mutagenesis studies of the third cytoplasmic loop. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 90, 110–117.
- Kovacs, J.J., Whalen, E.J., Liu, R., Xiao, K., Kim, J., Chen, M., Wang, J., Chen, W., and Lefkowitz, R.J. (2008). Beta-arrestin-mediated localization of smoothensin to the primary cilium. *Science* 320, 1777–1781.
- Kriegstein, A.R., and Noctor, S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 27, 392–399.
- Kulkarni, V.A., and Firestein, B.L. (2012). The dendritic tree and brain disorders. *Mol. Cell. Neurosci.* 50, 10–20.
- Kumar, V., Zhang, M.-X., Swank, M.W., Kunz, J., and Wu, G.-Y. (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 11288–11299.
- Kuo, G., Arnaud, L., Kronstad-O’Brien, P., and Cooper, J.A. (2005). Absence of Fyn and Src causes a reeler-like phenotype. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 8578–8586.
- Kusakawa, G., Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T., and Hisanaga, S. (2000). Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J. Biol. Chem.* 275, 17166–17172.
- Kutzleb, C., Sanders, G., Yamamoto, R., Wang, X., Lichte, B., Petrasch-Parwez, E., and Kilimann, M.W. (1998). Paralemmin, a prenyl-palmitoyl-anchored phosphoprotein abundant in neurons and implicated in plasma membrane dynamics and cell process formation. *J. Cell Biol.* 143, 795–813.
- Kvachnina, E., Liu, G., Dityatev, A., Renner, U., Dumuis, A., Richter, D.W., Dityateva, G., Schachner, M., Voyno-Yasenetskaya, T.A., and Ponimaskin, E.G. (2005). 5-HT₇ receptor is coupled to G α subunits of heterotrimeric G12-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 7821–7830.

Ladarré, D., Roland, A.B., Biedzinski, S., Ricobaraza, A., and Lenkei, Z. (2014). Polarized cellular patterns of endocannabinoid production and detection shape cannabinoid signaling in neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 426.

Lai, K.-O., Wong, A.S.L., Cheung, M.-C., Xu, P., Liang, Z., Lok, K.-C., Xie, H., Palko, M.E., Yung, W.-H., Tessarollo, L., et al. (2012). TrkB phosphorylation by Cdk5 is required for activity-dependent structural plasticity and spatial memory. *Nat. Neurosci.* 15, 1506–1515.

Lalioi, V., Pulido, D., and Sandoval, I.V. (2010). Cdk5, the multifunctional surveyor. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 284–311.

Lebensohn, A.M., and Kirschner, M.W. (2009). Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol. Cell* 36, 512–524.

Lee, E., and Son, H. (2009). Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep.* 42, 239–244.

Lee, J.H., and Gleeson, J.G. (2010). The role of primary cilia in neuronal function. *Neurobiol. Dis.* 38, 167–172.

Lee, M.S., Kwon, Y.T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R.M., and Tsai, L.H. (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405, 360–364.

Leibowitz, S.F., Weiss, G.F., and Suh, J.S. (1990). Medial hypothalamic nuclei mediate serotonin's inhibitory effect on feeding behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37, 735–742.

Leterrier, C., Lainé, J., Darmon, M., Boudin, H., Rossier, J., and Lenkei, Z. (2006). Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 3141–3153.

Lewis, D.A., Hashimoto, T., and Volk, D.W. (2005). Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 312–324.

Li, B.S., Sun, M.K., Zhang, L., Takahashi, S., Ma, W., Vinade, L., Kulkarni, A.B., Brady, R.O., and Pant, H.C. (2001). Regulation of NMDA receptors by cyclin-dependent kinase-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12742–12747.

Lieben, C.K.J., Blokland, A., Sik, A., Sung, E., van Nieuwenhuizen, P., and Schreiber, R. (2005). The selective 5-HT₆ receptor antagonist Ro4368554 restores memory performance in cholinergic and serotonergic models of memory deficiency in the rat. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 30, 2169–2179.

Lim, D.A., Flames, N., Collado, L., and Herrera, D.G. (2002). Investigating the use of primary adult subventricular zone neural precursor cells for neuronal replacement therapies. *Brain Res. Bull.* 57, 759–764.

López-Bendito, G., Cautinat, A., Sánchez, J.A., Bielle, F., Flames, N., Garratt, A.N., Talmage, D.A., Role, L.W., Charnay, P., Marín, O., et al. (2006). Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell* 125, 127–142.

Lucki, I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol. Psychiatry* 44, 151–162.

Luo, L. (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 601–635.

M

Marazziti, D., Baroni, S., Pirone, A., Giannaccini, G., Betti, L., Schmid, L., Vatteroni, E., Palego, L., Borsini, F., Bordi, F., et al. (2012). Distribution of serotonin receptor of type 6 (5-HT₆) in human brain post-mortem. A pharmacology, autoradiography and immunohistochemistry study. *Neurochem. Res.* 37, 920–927.

Marazziti, D., Baroni, S., Pirone, A., Giannaccini, G., Betti, L., Testa, G., Schmid, L., Palego, L., Borsini, F., Bordi, F., et al. (2013). Serotonin receptor of type 6 (5-HT₆) in human prefrontal cortex and hippocampus post-mortem: an immunohistochemical and immunofluorescence study. *Neurochem. Int.* 62, 182–188.

Marín, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L. (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293, 872–875.

Marín, O., Valdeolmillos, M., and Moya, F. (2006). Neurons in motion: same principles for different shapes? *Trends Neurosci.* 29, 655–661.

Marín, O., Valiente, M., Ge, X., and Tsai, L.-H. (2010). Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001834.

Masuho, I., Mototani, Y., Sahara, Y., Asami, J., Nakamura, S., Kozasa, T., and Inoue, T. (2008). Dynamic expression patterns of G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1 (GRIN1) and its colocalization with Galphao implicate significant roles of Galphao-GRIN1 signaling in nervous system. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 237, 2415–2429.

Di Matteo, V., De Blasi, A., Di Giulio, C., and Esposito, E. (2001). Role of 5-HT(2C) receptors in the control of central dopamine function. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 229–232.

Mattison, H.A., Popovkina, D., Kao, J.P.Y., and Thompson, S.M. (2014). The role of glutamate in the morphological and physiological development of dendritic spines. *Eur. J. Neurosci.* 39, 1761–1770.

Meffre, J., Chaumont-Dubel, S., Mannoury la Cour, C., Loiseau, F., Watson, D.J.G., Dekeyne, A., Séveno, M., Rivet, J.-M., Gaven, F., Déléris, P., et al. (2012). 5-HT(6) receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. *EMBO Mol. Med.* *4*, 1043–1056.

Mendoza, M.C. (2013). Phosphoregulation of the WAVE regulatory complex and signal integration. *Semin. Cell Dev. Biol.* *24*, 272–279.

Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* *17*, 6932–6941.

Millan, M.J., Marin, P., Bockaert, J., and Mannoury la Cour, C. (2008). Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol. Sci.* *29*, 454–464.

Millan, M.J., Agid, Y., Brüne, M., Bullmore, E.T., Carter, C.S., Clayton, N.S., Connor, R., Davis, S., Deakin, B., DeRubeis, R.J., et al. (2012). Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *11*, 141–168.

Mitchell, E.S., and Neumaier, J.F. (2005). 5-HT₆ receptors: a novel target for cognitive enhancement. *Pharmacol. Ther.* *108*, 320–333.

N

Nakata, H., and Kozasa, T. (2005). Functional characterization of Gα_q signaling through G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1. *Mol. Pharmacol.* *67*, 695–702.

Narboux-Nême, N., Angenard, G., Mosienko, V., Klempin, F., Pitychoutis, P.M., Deneris, E., Bader, M., Giros, B., Alenina, N., and Gaspar, P. (2013). Postnatal growth defects in mice with constitutive depletion of central serotonin. *ACS Chem. Neurosci.* *4*, 171–181.

Nichols, D.E., and Nichols, C.D. (2008). Serotonin receptors. *Chem. Rev.* *108*, 1614–1641.

Niethammer, M., Smith, D.S., Ayala, R., Peng, J., Ko, J., Lee, M.S., Morabito, M., and Tsai, L.H. (2000). NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron* *28*, 697–711.

Lo Nigro, C., Chong, C.S., Smith, A.C., Dobyns, W.B., Carrozzo, R., and Ledbetter, D.H. (1997). Point mutations and an intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 157–164.

Nikolic, M., Dudek, H., Kwon, Y.T., Ramos, Y.F., and Tsai, L.H. (1996). The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev.* *10*, 816–825.

Nikolic, M., Chou, M.M., Lu, W., Mayer, B.J., and Tsai, L.H. (1998). The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature* *395*, 194–198.

O

Odajima, J., Wills, Z.P., Ndassa, Y.M., Terunuma, M., Kretschmannova, K., Deeb, T.Z., Geng, Y., Gawrzak, S., Quadros, I.M., Newman, J., et al. (2011). Cyclin E constrains Cdk5 activity to regulate synaptic plasticity and memory formation. *Dev. Cell* 21, 655–668.

Olsen, M.A., Nawoschik, S.P., Schurman, B.R., Schmitt, H.L., Burno, M., Smith, D.L., and Schechter, L.E. (1999). Identification of a human 5-HT₆ receptor variant produced by alternative splicing. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 64, 255–263.

Olvera-Cortés, M.E., Anguiano-Rodríguez, P., López-Vázquez, M.A., and Alfaro, J.M.C. (2008). Serotonin/dopamine interaction in learning. *Prog. Brain Res.* 172, 567–602.

P

Papa, M., Bundman, M.C., Greenberger, V., and Segal, M. (1995). Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 1–11.

Park, H., and Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 7–23.

Pencea, V., Bingaman, K.D., Wiegand, S.J., and Luskin, M.B. (2001). Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 6706–6717.

Peters, A., and Kaiserman-Abramof, I.R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* 127, 321–355.

Ponimaskin, E., Voyno-Yasenetskaya, T., Richter, D.W., Schachner, M., and Dityatev, A. (2007). Morphogenic signaling in neurons via neurotransmitter receptors and small GTPases. *Mol. Neurobiol.* 35, 278–287.

Ponimaskin, E.G., Profirovic, J., Vaiskunaite, R., Richter, D.W., and Voyno-Yasenetskaya, T.A. (2002). 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor is coupled to the Galpha subunit of heterotrimeric G13 protein. *J. Biol. Chem.* 277, 20812–20819.

Ragland, J.D., Yoon, J., Minzenberg, M.J., and Carter, C.S. (2007). Neuroimaging of cognitive disability in schizophrenia: search for a pathophysiological mechanism. *Int. Rev. Psychiatry Abingdon Engl.* *19*, 417–427.

Rapport, M.M., Green, A.A., and Page, I.H. (1948). Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* *176*, 1243–1251.

Redmond, L., Kashani, A.H., and Ghosh, A. (2002). Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription. *Neuron* *34*, 999–1010.

Ricciardi, S., Boggio, E.M., Grosso, S., Lonetti, G., Forlani, G., Stefanelli, G., Calcagno, E., Morello, N., Landsberger, N., Biffo, S., et al. (2011). Reduced AKT/mTOR signaling and protein synthesis dysregulation in a Rett syndrome animal model. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 1182–1196.

Riccio, O., Potter, G., Walzer, C., Vallet, P., Szabó, G., Vutskits, L., Kiss, J.Z., and Dayer, A.G. (2009). Excess of serotonin affects embryonic interneuron migration through activation of the serotonin receptor 6. *Mol. Psychiatry* *14*, 280–290.

Riccio, O., Jacobshagen, M., Golding, B., Vutskits, L., Jabaudon, D., Hornung, J.P., and Dayer, A.G. (2011). Excess of serotonin affects neocortical pyramidal neuron migration. *Transl. Psychiatry* *1*, e47.

Riemer, C., Borroni, E., Levet-Trafit, B., Martin, J.R., Poli, S., Porter, R.H.P., and Bös, M. (2003). Influence of the 5-HT₆ receptor on acetylcholine release in the cortex: pharmacological characterization of 4-(2-bromo-6-pyrrolidin-1-ylpyridine-4-sulfonyl)phenylamine, a potent and selective 5-HT₆ receptor antagonist. *J. Med. Chem.* *46*, 1273–1276.

Roberts, J.C., Reavill, C., East, S.Z., Harrison, P.J., Patel, S., Routledge, C., and Leslie, R.A. (2002). The distribution of 5-HT₆ receptors in rat brain: an autoradiographic binding study using the radiolabelled 5-HT₆ receptor antagonist [(125)I]SB-258585. *Brain Res.* *934*, 49–57.

Rodal, A.A., Sokolova, O., Robins, D.B., Daugherty, K.M., Hippenmeyer, S., Riezman, H., Grigorieff, N., and Goode, B.L. (2005). Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 26–31.

Roussignol, G., Ango, F., Romorini, S., Tu, J.C., Sala, C., Worley, P.F., Bockaert, J., and Fagni, L. (2005). Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 3560–3570.

Ruat, M., Traiffort, E., Arrang, J.M., Tardivel-Lacombe, J., Diaz, J., Leurs, R., and Schwartz, J.C. (1993). A novel rat serotonin (5-HT₆) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *193*, 268–276.

- Saito, T., Onuki, R., Fujita, Y., Kusakawa, G., Ishiguro, K., Bibb, J.A., Kishimoto, T., and Hisanaga, S. (2003). Developmental regulation of the proteolysis of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator by phosphorylation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 1189–1197.
- Schechter, L.E., Lin, Q., Smith, D.L., Zhang, G., Shan, Q., Platt, B., Brandt, M.R., Dawson, L.A., Cole, D., Bernotas, R., et al. (2008). Neuropharmacological profile of novel and selective 5-HT₆ receptor agonists: WAY-181187 and WAY-208466. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **33**, 1323–1335.
- Shah, K., and Lahiri, D.K. (2014). Cdk5 activity in the brain - multiple paths of regulation. *J. Cell Sci.* **127**, 2391–2400.
- Shajib, M.S., and Khan, W.I. (2015). The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* **213**, 561–574.
- Sharma, A., Hoeffler, C.A., Takayasu, Y., Miyawaki, T., McBride, S.M., Klann, E., and Zukin, R.S. (2010). Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 694–702.
- Shi, S.-H., Jan, L.Y., and Jan, Y.-N. (2003). Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* **112**, 63–75.
- Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M.-D., Xie, Z., Gleeson, J.G., and Tsai, L.-H. (2004). Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* **44**, 263–277.
- Da Silva, J.S., and Dotti, C.G. (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 694–704.
- Simpson, E.H., Kellendonk, C., and Kandel, E. (2010). A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuron* **65**, 585–596.
- Sin, W.C., Haas, K., Ruthazer, E.S., and Cline, H.T. (2002). Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature* **419**, 475–480.
- Singh, K.K., Ge, X., Mao, Y., Drane, L., Meletis, K., Samuels, B.A., and Tsai, L.-H. (2010). Dixdc1 is a critical regulator of DISC1 and embryonic cortical development. *Neuron* **67**, 33–48.
- Smith, D.S., Niethammer, M., Ayala, R., Zhou, Y., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., and Tsai, L.H. (2000). Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat. Cell Biol.* **2**, 767–775.

Smith, P.D., Crocker, S.J., Jackson-Lewis, V., Jordan-Sciutto, K.L., Hayley, S., Mount, M.P., O'Hare, M.J., Callaghan, S., Slack, R.S., Przedborski, S., et al. (2003). Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 13650–13655.

Soderling, S.H., Langeberg, L.K., Soderling, J.A., Davee, S.M., Simerly, R., Raber, J., and Scott, J.D. (2003). Loss of WAVE-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 1723–1728.

Soderling, S.H., Guire, E.S., Kaech, S., White, J., Zhang, F., Schutz, K., Langeberg, L.K., Banker, G., Raber, J., and Scott, J.D. (2007). A WAVE-1 and WRP signaling complex regulates spine density, synaptic plasticity, and memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 355–365.

Song, H.J., Ming, G.L., and Poo, M.M. (1997). cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* *388*, 275–279.

Speranza, L., Chambery, A., Di Domenico, M., Crispino, M., Severino, V., Volpicelli, F., Leopoldo, M., Bellenchi, G.C., di Porzio, U., and Perrone-Capano, C. (2013). The serotonin receptor 7 promotes neurite outgrowth via ERK and Cdk5 signaling pathways. *Neuropharmacology* *67*, 155–167.

Stovold, C.F., Millard, T.H., and Machesky, L.M. (2005). Inclusion of Scar/WAVE3 in a similar complex to Scar/WAVE1 and 2. *BMC Cell Biol.* *6*, 11.

Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (1999). Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *260*, 296–302.

Svenningsson, P., Tzavara, E.T., Qi, H., Carruthers, R., Witkin, J.M., Nomikos, G.G., and Greengard, P. (2007). Biochemical and behavioral evidence for antidepressant-like effects of 5-HT₆ receptor stimulation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 4201–4209.

T

Tanaka, T., Serneo, F.F., Higgins, C., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., and Gleeson, J.G. (2004a). Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J. Cell Biol.* *165*, 709–721.

Tanaka, T., Serneo, F.F., Tseng, H.C., Kulkarni, A.B., Tsai, L.H., and Gleeson, J.G. (2004b). Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* *41*, 215–227.

Tau, G.Z., and Peterson, B.S. (2010). Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *35*, 147–168.

Tecott, L.H., and Brennan, T.J. (2000). Serotonin 5-HT₆ receptor knockout mouse (Google Patents).

Tong, C.K., Chen, J., Cebrián-Silla, A., Mirzadeh, Z., Obernier, K., Guinto, C.D., Tecott, L.H., García-Verdugo, J.M., Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2014). Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell* 14, 500–511.

Tong, J., Hannan, F., Zhu, Y., Bernards, A., and Zhong, Y. (2002). Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. *Nat. Neurosci.* 5, 95–96.

Tsai, L.-H., and Gleeson, J.G. (2005). Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* 46, 383–388.

U

Upton, N., Chuang, T.T., Hunter, A.J., and Virley, D.J. (2008). 5-HT₆ receptor antagonists as novel cognitive enhancing agents for Alzheimer's disease. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 5, 458–469.

V

Vadodaria, K.C., Brakebusch, C., Suter, U., and Jessberger, S. (2013). Stage-specific functions of the small Rho GTPases Cdc42 and Rac1 for adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 1179–1189.

Vitalis, T., Ansorge, M.S., and Dayer, A.G. (2013). Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: special attention to the 5-HT_{3A} and 5-HT₆ receptor subtypes. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 93.

W

Ward, R.P., Hamblin, M.W., Lachowicz, J.E., Hoffman, B.J., Sibley, D.R., and Dorsa, D.M. (1995). Localization of serotonin subtype 6 receptor messenger RNA in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 64, 1105–1111.

West, P.J., Marcy, V.R., Marino, M.J., and Schaffhauser, H. (2009). Activation of the 5-HT(6) receptor attenuates long-term potentiation and facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus. *Neuroscience* 164, 692–701.

Whitaker-Azmitia, P.M. (2005). Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 23, 75–83.

Woolley, M.L., Bentley, J.C., Sleight, A.J., Marsden, C.A., and Fone, K.C. (2001). A role for 5-HT₆ receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. *Neuropharmacology* *41*, 210–219.

Woolley, M.L., Marsden, C.A., Sleight, A.J., and Fone, K.C.F. (2003). Reversal of a cholinergic-induced deficit in a rodent model of recognition memory by the selective 5-HT₆ receptor antagonist, Ro 04-6790. *Psychopharmacology (Berl.)* *170*, 358–367.

Woolley, M.L., Marsden, C.A., and Fone, K.C.F. (2004). 5-HT₆ receptors. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* *3*, 59–79.

X

Xie, Z., Sanada, K., Samuels, B.A., Shih, H., and Tsai, L.H. (2003). Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell* *114*, 469–482.

Y

Yamada, M., Saito, T., Sato, Y., Kawai, Y., Sekigawa, A., Hamazumi, Y., Asada, A., Wada, M., Doi, H., and Hisanaga, S.-I. (2007). Cdk5--p39 is a labile complex with the similar substrate specificity to Cdk5--p35. *J. Neurochem.* *102*, 1477–1487.

Young, S.Z., Taylor, M.M., and Bordey, A. (2011). Neurotransmitters couple brain activity to subventricular zone neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* *33*, 1123–1132.

Yun, H.-M., and Rhim, H. (2011). The serotonin-6 receptor as a novel therapeutic target. *Exp. Neurobiol.* *20*, 159–168.

Yun, H.-M., Kim, S., Kim, H.-J., Kostenis, E., Kim, J.I., Seong, J.Y., Baik, J.-H., and Rhim, H. (2007). The novel cellular mechanism of human 5-HT₆ receptor through an interaction with Fyn. *J. Biol. Chem.* *282*, 5496–5505.

Yun, H.-M., Baik, J.-H., Kang, I., Jin, C., and Rhim, H. (2010). Physical interaction of Jab1 with human serotonin 6 G-protein-coupled receptor and their possible roles in cell survival. *J. Biol. Chem.* *285*, 10016–10029.

Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2004). Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 24–34.

Zhang, J., Shen, C.-P., Xiao, J.C., Lanza, T.J., Lin, L.S., Francis, B.E., Fong, T.M., and Chen, R.Z. (2006). Effects of mutations at conserved TM II residues on ligand binding and activation of mouse 5-HT₆ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* *534*, 77–82.

Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* *132*, 645–660.

Ziabreva, I., Perry, E., Perry, R., Minger, S.L., Ekonomou, A., Przyborski, S., and Ballard, C. (2006). Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. *J. Psychosom. Res.* *61*, 311–316.

