



HAL
open science

La neuroimagerie TEP-IRM pour l'exploration de l'agonisme des récepteurs 5-HT1A

Benjamin Vidal

► **To cite this version:**

Benjamin Vidal. La neuroimagerie TEP-IRM pour l'exploration de l'agonisme des récepteurs 5-HT1A. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1235 . tel-01891070

HAL Id: tel-01891070

<https://theses.hal.science/tel-01891070>

Submitted on 9 Oct 2018

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.



N°1235

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 476
« Neurosciences et cognition »

DIPLÔME DE DOCTORAT

Soutenue publiquement le 7 novembre 2017 par :
Benjamin VIDAL

**La neuroimagerie TEP-IRM pour l'exploration de l'agonisme des
récepteurs 5-HT_{1A}**

Directeur de thèse
Pr Luc ZIMMER - Université Claude Bernard Lyon 1 – Hospices Civils de Lyon

Jury

Pr François DAUPHIN – Université de Caen Normandie (Rapporteur)
Pr Nathalie GINOVART – Université de Genève (Rapporteure)
Dr Laurence LANFUMEY – INSERM, Paris (Examinatrice)
Dr Adrian NEWMAN-TANCREDI – Neurolix, Castres/San Diego (Examinateur)
Dr Nicolas COSTES – CNRS, Lyon (Examinateur)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire
Vice-président de la Commission Recherche
Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID
M. le Professeur Didier REVEL
M. le Professeur Philippe CHEVALIER
M. Fabrice VALLÉE
Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux
Faculté d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation
Département de formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE
Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Directeur : M. X. PERROT
Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies
Département Biologie
Département Chimie Biochimie
Département GEP
Département Informatique
Département Mathématiques
Département Mécanique
Département Physique
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et
Sportives
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon
Polytech Lyon
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI
Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Directeur : Mme C. FELIX
Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
Directeur : M. Y.VANPOULLE
Directeur : M. B. GUIDERDONI
Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Directeur : M. G. PIGNAULT
Directeur : M. le Professeur C. VITON
Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier les nombreuses personnes qui m'ont grandement aidé à réaliser ce travail, et le CERMEP de m'avoir accueilli pendant ces trois années.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

A Luc Zimmer

Travailler au sein de l'équipe BIORAN a été une véritable opportunité pour moi, et je vous en suis profondément reconnaissant. Ces années de thèse ont été passionnantes et c'est à vous que je dois l'envie de poursuivre dans cette voie. Je vous remercie aussi pour votre bienveillance et votre disponibilité, et j'espère que nous aurons à nouveau l'occasion de travailler ensemble à l'avenir.

A Adrian Newman-Tancredi

Je vous remercie de m'avoir permis d'initier cette thèse grâce au financement apporté par Neurolixis durant la première année. Merci également pour vos conseils précieux et pour nos stimulantes discussions scientifiques. Enfin, je vous remercie pour votre présence dans le jury de thèse en tant qu'examineur.

A Mme le Pr Nathalie Ginovart et M le Pr François Dauphin

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse en qualité de rapporteurs, et de venir de loin pour participer à ma soutenance. Soyez assurés de ma reconnaissance et de mon respect.

A Mme le Dr Laurence Lanfumey

Je vous remercie de me faire l'honneur de votre présence dans ce jury de thèse en tant qu'examinatrice, et de venir de loin pour ma soutenance. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon respect.

A Nicolas Costes

Je te remercie pour ton aide précieuse et pour les conseils que tu m'as apportés, et qui m'ont été indispensables à la réalisation de cette thèse. Malgré les quelques déboires auxquels nous avons dû faire face je garde un très bon souvenir de ces manips à LILI ! Enfin, je te remercie pour ta présence dans mon jury de thèse en tant qu'examineur.

A mes collègues de l'équipe BIORAN et du CERMEP

Evidemment je remercie en premier lieu Sylvain, mon « binôme » de manip sans qui cette thèse aurait peut-être duré six ans au lieu de trois. Tu m'as énormément aidé, et c'est peu dire. J'espère que tu garderas de ces années d'aussi bons souvenirs que moi ! Team 5-HT forever. Je n'oublie pas la promesse d'hommage à notre idole et porte-bonheur de manip.

Je remercie ensuite les radiochimistes, à commencer par Thierry pour ta bonne humeur, ta disponibilité pour les synthèses et aussi pour tes conseils. Un grand merci également à Didier, Thibaut, Fred, Christian, Florence et François, pour votre sympathie au quotidien et votre travail sans lequel je n'aurais jamais pu faire cette thèse.

Je remercie tous les géniaux collègues (ou ex collègues) de l'équipe BIORAN : Fabien, Mathieu, Elise, Sylvain, Matthieu, Sophie, Isabelle, Anthony, Armand, Luc, Laure, Johan... pour tous les excellents moments passés (les réunions matinales mais surtout les soirées, les restos et autres congrès mémorables...).

Un grand merci à Caroline, qui m'a beaucoup aidé que ce soit pour les manips ou pour comprendre le fonctionnement obscur de IRW.

Merci à Véronique, pour ton énergie positive et ton aide précieuse lors des manips chats.

Merci à Jérôme qui m'a énormément aidé pour le traitement des données notamment les données TEP-IRM chez le chat. Merci également aux autres personnes qui m'ont aidé dans cette longue étude : Sylvain, Nicolas, Marjorie, Jean-Baptiste, Inès, Didier, Fred, Thibaut, Christian...

Je remercie également Radu et Jean-Baptiste pour leur aide lors de l'étude de pharmacologie-IRM, et Franck, Jérôme et Audrey pour leur aide lors des manips sur la TEP/CT.

A ma famille

A mes parents,

Je vous remercie du fond du cœur pour tout ce que vous avez fait pour moi durant ces 26 années, et il y aurait probablement des centaines de pages à écrire... Sans votre soutien je n'en serais pas là. Merci.

A Emilie, ma petite sœur dont je suis très fier, qui se retrouve au lycée alors que je termine mes études... Courage car ce n'est peut être que le début !

A mes grands parents, qui m'ont énormément apporté au fil des années. Je ne vous remercierais jamais assez.

A mon oncle, ma tante et mes cousins, merci pour votre soutien et pour ces bons moments passés.

A mes amis

Je vous remercie tous du fond du cœur d'avoir été présents au cours de ces dernières années. Merci pour tous ces moments épiques (je ne mâcherais pas mes mots).

Aux frères Rougny, ces artistes incompris.

Aux bros Edouard, Nico, Jérémy.

A Alex, Marie, Sophie, Marion et les belfortains.

A Geoffrey, mon ingé son/compositeur préféré, et Sandra.

A mes amis trop éloignés à mon goût, Ugo, Julie, Léo.

A Nicolo et Océane.

Aux musicos: Théa, Samy, Guillaume...

A Stève, Nathan et Quentin, que je n'oublie pas.

A Larry, Nicolo et Olivier, avec qui j'ai eu la chance et le plaisir d'enregistrer un album cette année.

A Salomé

La meilleure pour la fin... Merci pour tous ces moments inoubliables, et ce n'est que le début.

Ce travail a donné lieu aux publications suivantes :

Publications internationales

Vidal, B., Sebti J., Verdurand, M., Fieux, S., Billard, T., Streichenberger, N., Troakes, C., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L., 2016. Agonist and antagonist bind differently to 5-HT1A receptors during Alzheimer's disease: A post-mortem study with PET radiopharmaceuticals. *Neuropharmacology* 109, 88-95.

Vidal, B., Fieux, S., Billard, T., Bouillot, C., Barret, O., Constantinescu, C., Tamagnan, G., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L. 18F-F13640 preclinical evaluation in rodent and primate models as a 5-HT1A receptor agonist for PET neuroimaging. Soumis.

Vidal, B., Bolbos, R., Redoute, J., Langlois, J.B., Costes, N., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L. 5-HT1A biased agonists induce different hemodynamic responses : a pharmaco-MRI study. En préparation.

Vidal, B., Fieux, S., Bouillot, C., Redoute, J., Costes, N., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L. 5-HT1A biased agonists induce different modifications of cerebral glucose metabolism : a microPET study with [¹⁸F]FDG. En préparation.

Vidal, B., Fieux, S., Redouté, J., Villien, M., Le Bars, D., Newman-Tancredi, A., Costes, N., Zimmer, L. Exploration of the concept of 5-HT1A receptor biased agonists: a simultaneous PET-MRI study in cat brain. En préparation.

Communications orales dans des congrès internationaux

Vidal, B., Fieux, S., Billard, T., Barret, O., Tamagnan, G., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L. [18F]F13640 preclinical evaluation as a 5-HT1A receptor agonist for PET neuroimaging, from rodent to non-human primate. European Association of Nuclear Medicine Annual Congress, Barcelone, 2016.

Vidal, B., Villien, M., Fieux, S., Redouté, J., Le Bars, D., Newman-Tancredi, A., Costes, N., Zimmer, L. Exploration of the concept of 5-HT1A receptor biased agonists: a PET-MRI study. European Association of Nuclear Medicine Annual Congress, Barcelone, 2016.

Communications orales dans des congrès nationaux

Sebti, J., Vidal, B., Verdurand, M., Streichenberger, N., Billard, T., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L. 5-HT1A agonist and antagonist radiotracers bind differently to receptors in Alzheimer's Disease: a post-mortem study. 19th Annual Meeting of French Society of Pharmacology and Therapeutics, Caen, 2015.

Zimmer, L., Vidal, B., Sebti, J., Verdurand, M., Streichenberger, N., Fieux, S., Billard, T., Newman-Tancredi, A. Imagerie post-mortem des sites fonctionnels et non fonctionnels des récepteurs 5-HT1A. Vers un nouveau concept en neuroimagerie TEP ? Premières Journées Francophones de Médecine Nucléaire, La Rochelle, 2015.

Vidal, B., Villien, M., Fieux, S., Redouté, J., Le Bars, D., Newman-Tancredi, A., Costes, N., Zimmer, L. Exploration of the concept of 5-HT1A receptor biased agonists: a PET-MRI study. Colloque Annuel de la SCMC, Paris, 2017.

Communications écrites dans des congrès internationaux

Vidal, B., Fieux, S., Billard, T., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L. Radiopharmacological evaluation of [18F]F13640, a novel 5-HT1A receptor agonist. Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Annual Meeting, St. Louis, 2014.

Vidal, B., Sebti J., Verdurand, M., Fieux, S., Streichenberger, N., Billard, T., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L., 2016. 5-HT1A agonist and antagonist PET radiopharmaceuticals bind differently to receptors in Alzheimer 's disease: a postmortem study. European Association of Nuclear Medicine Annual Congress, Hamburg, 2015.

Vidal, B., Villien, M., Le Bars, D., Fieux, S., Newman-Tancredi, A., Costes, N., Zimmer, L. Exploration of the concept of biased agonism: a serotonin 5-HT1A PET-MR receptor study. PSMR, Cologne, 2016.

Vidal, B., Bolbos, R., Redouté, J., Langlois, J.B., Fieux, S., Bouillot, C., Costes, N., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L. 5-HT1A biased agonists induce different hemodynamic responses : a pharmacological MRI study. 30th European College of Neuropsychopharmacology Congress, Paris, 2017.

Communications écrites dans des congrès nationaux

Zimmer, L., Sebti, J., Vidal, B., Fieux, S., Streichenberger, N., Billard, T., Newman-Tancredi, A. Imagerie post-mortem des sites agonistes et antagonistes des récepteurs 5-HT1A. Vers un nouveau concept en neuroimagerie ? 13^e Congrès de l'Encéphale, Paris, 2015.

Vidal, B., Sebti J., Verdurand, M., Fieux, S., Billard, T., Streichenberger, N., Troakes, C., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L. Imagerie des récepteurs 5-HT1A fonctionnels au cours de la maladie d'Alzheimer : étude postmortem avec deux radiopharmaceutiques. 13^{ème} Réunion Francophone sur la Maladie d'Alzheimer et les Syndromes Apparentés, Lyon, 2016.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.....	13
Rappels bibliographiques.....	15
I – La neurotransmission sérotoninergique.....	15
1.1 La sérotonine.....	15
1.1.1 Généralités et historique.....	15
1.1.2 Biosynthèse.....	17
1.1.3 Stockage et libération.....	18
1.1.4 Recapture et catabolisme.....	18
1.2 Le système sérotoninergique central.....	20
1.2.1 Les corps cellulaires.....	20
1.2.2 Les projections.....	22
1.3 Les récepteurs sérotoninergiques.....	25
1.3.1 Les récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G.....	25
1.3.2 Les récepteurs ionotropiques.....	27
1.3.3 Les différentes familles de récepteurs sérotoninergiques.....	27
1.4 Les récepteurs 5-HT _{1A} comme cible thérapeutique ou biomarqueur.....	32
1.4.1 Généralités.....	32
1.4.2 Implications physiopathologiques.....	40
II – Apports de l'imagerie <i>in vivo</i> pour l'exploration du système sérotoninergique.....	47
2.1 La tomographie par émission de positons (TEP).....	47
2.1.1 Généralités.....	47
2.1.2 Principes physiques et instrumentaux.....	47
2.1.3 Radiosynthèse.....	49
2.1.4 Applications pour l'étude de la neurotransmission sérotoninergique.....	51
2.1.5 L'imagerie TEP des récepteurs 5-HT _{1A}	55
2.2. L'imagerie par résonance magnétique pharmacologique (pharmaco-IRM).....	61
2.2.1 Généralités.....	61
2.2.2 Principes physiques et instrumentaux.....	61
2.2.3 L'IRM pharmacologique : application de l'IRM fonctionnelle à la neuropharmacologie.....	62
2.2.4 La pharmaco-IRM pour l'étude du système sérotoninergique.....	65
III – L'agonisme biaisé, une révolution en pharmacologie ?.....	67

3.1 Principe.....	67
3.2 Implications et challenges	71
3.3 Les agonistes biaisés des récepteurs 5-HT _{1A}	71
Objectifs.....	79
Partie 1 : Evaluation préclinique du [¹⁸F]F13640 comme radiotracteur agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} pour l'imagerie TEP.....	80
I – Problématique.....	80
II - Matériel et méthodes	82
2.1 Radiosynthèse	82
2.1.1 Production du radioisotope.....	82
2.1.2 Radiosynthèse des traceurs fluorés.....	82
2.2 Animaux	83
2.3 Traitements pharmacologiques.....	83
2.3.1 WAY-100635.....	83
2.3.2 8-OH-DPAT	84
2.3.3 Gpp(NH)p.....	84
2.3.4 Fenfluramine	84
2.4 Autoradiographie	84
2.4.1 Principe.....	84
2.4.2 Prélèvement des tissus.....	85
2.4.3 Autoradiographie <i>in vitro</i>	85
2.4.4 Autoradiographie <i>ex vivo</i>	86
2.5 Distribution tissulaire	87
2.6 Analyse des métabolites cérébraux.....	87
2.7 Analyse des métabolites artériels.....	88
2.8 Acquisitions microTEP chez le rat	88
2.9 Acquisitions TEP chez le chat.....	89
2.10 Acquisitions TEP chez le singe rhésus	90
III - Résultats	91
3.1 Radiosynthèse	91
3.2 Autoradiographie <i>in vitro</i>	92
3.2.1 Distribution <i>in vitro</i>	92
3.2.2 Compétitions <i>in vitro</i>	93

3.3 Autoradiographie <i>ex vivo</i>	96
3.3.1 Distribution <i>ex vivo</i>	96
3.3.2 Sensibilité à la sérotonine extracellulaire	97
3.4 Pharmacocinétique du [¹⁸ F]F13640 chez le rat.....	98
3.4.1 Distribution tissulaire	98
3.4.2 Métabolites cérébraux	99
3.4.3 Métabolites artériels	100
3.5 MicroTEP chez le rat.....	102
3.5.1 Distribution <i>in vivo</i>	102
3.5.2 Blocage et compétition <i>in vivo</i>	102
3.5.3 Sensibilité à la sérotonine endogène <i>in vivo</i>	102
3.6 TEP chez le chat.....	104
3.6.1 Distribution <i>in vivo</i>	104
3.6.2 Blocage <i>in vivo</i>	105
3.7 TEP chez le singe rhésus	106
3.7.1 Distribution <i>in vivo</i>	106
3.7.2 Blocage <i>in vivo</i>	108
IV - Discussion	109
Partie 2 : Etude autoradiographique postmortem des récepteurs 5-HT_{1A} au cours de la maladie d'Alzheimer : comparaison de l'agoniste [¹⁸F]F13640 et l'antagoniste [¹⁸F]MPPF	123
I – Problématique.....	123
II - Matériel et méthodes	125
2.1 Sujets et échantillons	125
2.2 Radiosynthèse et contrôle qualité.....	126
2.3 Autoradiographie semi-quantitative	126
2.4 Immunomarquage NeuN et comptage neuronal.....	127
2.5 Analyse statistique	128
III - Résultats	129
3.1 Autoradiographie	129
3.2 Comptage neuronal.....	132
IV - Discussion	132
Partie 3 : Caractérisation <i>in vivo</i> de la sélectivité fonctionnelle des agonistes 5-HT_{1A} F15599 et F13640 par l'imagerie fonctionnelle TEP et IRM.....	138

I – Problématique	138
II - Matériel et méthodes	140
2.1. Animaux	140
2.2 Traitements pharmacologiques.....	141
2.2.1 F15599.....	141
2.2.2 F13640.....	141
2.3. Protocole pharmaco-IRM chez le rat.....	141
2.3.1 Conception de l'étude	141
2.3.2 Procédures animales	141
2.3.3 Acquisition des données.....	142
2.3.4 Traitement des données.....	143
2.4 Protocole microTEP	145
2.4.1 Conception de l'étude	145
2.4.2 Procédures animales et acquisition des données.....	145
2.4.3 Analyse statistique	146
2.5 Protocole TEP/IRM chez le chat.....	146
2.5.1 Conception	146
2.5.2 Procédures animales	147
2.5.3 Acquisition des données.....	147
2.5.4 Analyse des données TEP	149
2.5.5 Analyse des données pharmaco-IRM	150
2.5.6 Analyse par corrélation TEP et IRMf	151
III - Résultats	152
3.1. Etude en pharmaco-IRM chez le rat	152
3.1.1 Décours temporel du signal BOLD brut	152
3.1.2 Cartes d'activation.....	153
3.2 MicroTEP [¹⁸ F]FDG chez le rat.....	165
3.2.1 F13640.....	166
3.2.2 F15599.....	166
3.3. Etude TEP-IRM chez le chat	169
3.3.1. Analyse TEP	169
3.3.2. Analyse pharmaco-IRM	181
IV - Discussion	185
4.1 Effets du F13640 et du F15599 en pharmaco-IRM chez le rat.....	185

4.2 Effets du F13640 et du F15599 sur l'utilisation du glucose cérébral	195
4.3 Profils du F13640 et du F15599 en TEP/IRMf chez le chat	200
4.4 Résumé des principales caractéristiques fonctionnelles du F13640 et du F15599 <i>in vivo</i>	208
Conclusion générale.....	210
Bibliographie.....	213

LISTE DES ABREVIATIONS

5,7 DHT : 5,7-Dihydroxytryptamine
5-HIAA : Acide 5 -hydroxyindolacétique
5-HT : 5-Hydroxytryptamine ou sérotonine
5-HTP : 5-Hydroxytryptophane
AADC : Acide L-aminé aromatique décarboxylase
AC : Adénylate cyclase
Akt : Protéine kinase B ou PKB
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA : Analyse de la variance (« ANalysis Of VAriance »)
ARNm : Acide ribonucléique messager
ASL : Marquage de spin artériel (« Arterial Spin Labeling »)
BHE : Barrière hémato-encéphalique
Bmax : Densité de totale de récepteurs spécifiques dans un tissu
BOLD : De l'anglais «Blood-Oxygen Level Dependent »
BP : Potentiel de liaison (« Binding Potential »)
BP_{ND} : Potentiel de liaison par rapport à la liaison non déplaçable
BPM : De l'anglais « Biological Parametric Mapping »
CBF : Flux sanguin cérébral (« Cerebral Blood Flow »)
CBV : Volume sanguin cérébral (« Cerebral Blood Volume »)
CELYNE : Comité d'Ethique Lyonnais pour les Neurosciences Expérimentales
CERMEP : Centre d'Exploration et de Recherche Médicale par Emission de Positons
CIQLE : Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est
CLHP : Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC en anglais)
CMRO₂ : Consommation cérébrale en oxygène
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DTI : Imagerie par tenseur de diffusion (« Diffusion Tensor Imaging »)
EPI : Imagerie écho-planaire (« Echo-Planar Imaging »)
ERK : De l'anglais « Extra-cellular Regulated Kinase »
GABA : Acide gamma-aminobutyrique
GDP : Guanosine diphosphate
GIRK : Courant potassique rectifiant activé par les protéines G (« G-protein activated Inwardely Rectifying K⁺ current »)
GTP : Guanosine triphosphate
i.p : Intrapéritonéal
IP₃ : Inositol trisphosphate
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle
ISRS : Inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine
IUPHAR : De l'anglais «International Union of Basic and Clinical Pharmacology »
i.v : Intraveineux
KCl : Chlorure de potassium
Kd : Constante de dissociation
Ki : Constante d'inhibition

KO : Knock-out
LAT : Transporteur d'acide L-aminé
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LID : Dyskinésie induite par la lévodopa (« Levodopa-Induced Dyskinesia »)
MA : Maladie d'Alzheimer (en anglais AD)
MAO : Monoamine oxydase
MAPK : De l'anglais « Mitogen-Activated Protein Kinase »
MCI : Déficit cognitif léger (« Mild Cognitive Impairment »)
MICAD : De l'anglais « Molecular Imaging and Contrast Agent Database »
MNI : De l'anglais « Molecular NeuroImaging »
NaCl : Chlorure de sodium
NeuN : Antigène spécifique des noyaux des neurones (« Neuronal Nuclei »)
NRD : Noyau du raphé dorsal
pCO₂ : Pression partielle en dioxyde de carbone
P-gp : Glycoprotéine P (« Permeability-glycoprotein »)
phIRM : IRM pharmacologique ou pharmaco-IRM
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
p.p.i : Pour préparation injectable
RARE : De l'anglais « Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement »
rCBV : Volume sanguin cérébral relatif
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G (en anglais GPCR)
SEM : Erreur type (« Standard Error of the Mean »)
SERT : Transporteur de la sérotonine ou 5-HTT
SPM : De l'anglais « Statistical Parametric Mapping »
SUV : Valeur de fixation normalisée (« Standardized Uptake Value »)
SUVR : Valeur de fixation normalisée par rapport à une région de référence
TBS : Solution tampon de trishydroxyméthylaminométhane (« Tris-Buffered Saline »)
TDM : Tomodensitométrie (en anglais CT pour « Computed Tomography »)
TE : Temps d'écho
TEP : Tomographie par Emission de Positons
TPH : Tryptophane hydroxylase
TR : Temps de répétition
VMAT : Transporteur vésiculaire des monoamines (« Vesicular Monoamine Transporter »)

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I – La neurotransmission sérotoninergique

1.1 La sérotonine

1.1.1 Généralités et historique

La sérotonine, ou 5-hydroxytryptamine (5-HT), est une indolamine endogène impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques. Elle est extrêmement conservée au cours de l'évolution, puisqu'on la retrouve des organismes unicellulaires jusqu'aux mammifères en passant par les invertébrés, ainsi que chez les végétaux (Charnay et Léger, 2010). L'histoire de la découverte de la sérotonine débute en 1937, lorsque le pharmacologue italien Erspamer parvient à isoler la molécule et à caractériser son action sur le tonus des muscles lisses. Extraite de cellules entérochromaffines de l'intestin du lapin, la monoamine est alors nommée « entéramine » (Erspamer et Vialli, 1937). Cette même molécule est isolée du sérum bovin en 1948 par les américains Rapport et Page, et baptisée sérotonine en raison de ses propriétés vasoconstrictrices (Rapport *et al.*, 1948). A l'époque, il ne s'agit alors que d'une substance perturbatrice dans leurs recherches visant à identifier les mécanismes physiopathologiques de l'hypertension artérielle. Un an plus tard, Rapport identifie la structure de la sérotonine comme étant la 5-hydroxytryptamine (Rapport, 1949). En parallèle Erspamer élucide la structure de sa propre découverte, l'entéramine, comme étant également la 5-hydroxytryptamine (Erspamer et Asero, 1952).

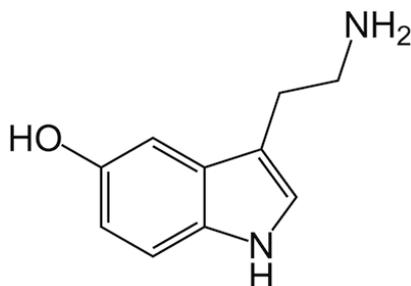


Figure 1 : Structure chimique de la sérotonine ou 5-hydroxytryptamine.

Comme le soulignent ces premières découvertes, la sérotonine est majoritairement présente dans les organes périphériques et notamment dans l'intestin (qui contient environ 95% des corps cellulaires sérotoninergiques) où elle joue un rôle majeur dans la régulation du péristaltisme et des sécrétions intestinales (Gershon et Tack, 2007). La sérotonine est par ailleurs impliquée dans toutes les grandes fonctions physiologiques majeures (pour revue, Berger *et al.*, 2009). Au niveau cardiovasculaire, elle intervient dans la régulation de la fréquence cardiaque, le tonus vasculaire et l'aggrégation plaquettaire. Elle module également la respiration, l'activité du pancréas, les fonctions reproductrices, le développement embryonnaire ou encore le métabolisme osseux (Berger *et al.*, 2009).

Malgré une synthèse majoritairement périphérique, la sérotonine a rapidement été identifiée comme « neurotransmetteur ». A peine quelques années après la découverte de sa structure chimique, l'équipe de Page met en évidence la présence de quantités significatives de sérotonine dans le cerveau du chien, du rat et du lapin (Twarog et Page, 1953). En 1957, une première étude visant à caractériser ses récepteurs les distingue en deux types « M » et « D » (Gaddum et Picarrelly, 1957). S'ensuivent ensuite des études de cartographie détaillée du système sérotoninergique central, des corps cellulaires aux terminaisons axonales, grâce au développement de techniques d'histologie utilisant la fluorescence des monoamines après exposition au formaldéhyde (Carlsson *et al.*, 1962 ; Dahlstrom et Fuxe, 1964). Dans les années 1970, des neurotoxines sélectives comme le 5,7-DHT sont utilisées afin de caractériser le rôle fonctionnel des neurones sérotoninergiques centraux (Baugmarten et Lachenmayer, 1972 ; Bjorklund *et al.*, 1975). A partir des années 1980, l'utilisation de radioligands tritiés et les avancées en techniques de biologie moléculaire permettent de révéler peu à peu la diversité importante des récepteurs sérotoninergiques, dont on dénombre aujourd'hui au moins 14 sous-types répartis en 7 familles 5-HT₁ à 5-HT₇ (pour revue, Hannon et Hoyer 2008 ; Filip et Bader 2009).

On sait à présent que la sérotonine est fortement impliquée dans les mécanismes cognitifs, mnésiques, émotionnels et comportementaux complexes. Elle régule également de grandes fonctions centrales comme le cycle veille-sommeil, la thermorégulation, la nociception ou encore la satiété (Berger *et al.*, 2009 ; Charnay et Léger, 2010). Des dysfonctions du système sérotoninergique sont rapportées dans les troubles psychiatriques comme la dépression majeure, les troubles anxieux, l'anorexie et la schizophrénie (Jones et

Blackburn, 2002 ; Lucki, 1998). Dans ces pathologies, le système sérotoninergique constitue une cible thérapeutique de choix. Plus récemment, on a mis en évidence l'implication physiopathologique de la sérotonine dans les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Politis et Niccolini, 2015 ; Rodriguez *et al.*, 2012).

1.1.2 Biosynthèse

La synthèse de sérotonine au niveau cérébral s'effectue à partir de L-tryptophane, un acide aminé essentiel qui passe la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la membrane plasmique grâce au transporteur membranaire LAT (Boadle-Biber, 1993). Le L-tryptophane est d'abord hydroxylé en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) par la tryptophane hydroxylase (TPH), qui n'est présente que dans les neurones sérotoninergiques (figure 2). Cette première étape est l'étape limitante de la synthèse, c'est-à-dire que la quantité de sérotonine synthétisée dépend en partie des apports alimentaires en tryptophane et de l'activité de la TPH (Fernstrom, 1977 ; Silber et Schmitt, 2010). L'administration de p-chlorophénylalanine (p-CPA) ou de p-éthylphénylalanine (p-EPA), des inhibiteurs de la TPH, induit ainsi une forte diminution de la quantité de sérotonine synthétisée (Zimmer *et al.*, 2002a). Le dioxygène étant utilisé comme cosubstrat par la TPH, des variations d'apport peuvent aussi modifier le taux de synthèse de 5-HT (Visser *et al.*, 2010). Il a été montré en 2003 que la TPH existe sous deux isoformes : TPH1, surtout périphérique (glande pinéale, intestin) et TPH2, exclusivement centrale (Walther et Bader, 2003 ; Sakowski *et al.*, 2006). Des polymorphismes fonctionnels de la TPH2 seraient impliqués dans la physiopathologie de certains désordres neuropsychiatriques (Zhang *et al.*, 2006), et notamment dans la réponse aux traitements antidépresseurs (Xu *et al.*, 2016).

Dans une deuxième étape, le 5-HTP subit une décarboxylation par l'acide aminé décarboxylase (AADC), enzyme non spécifique également impliquée dans la synthèse des catécholamines, pour former la sérotonine (figure 2).

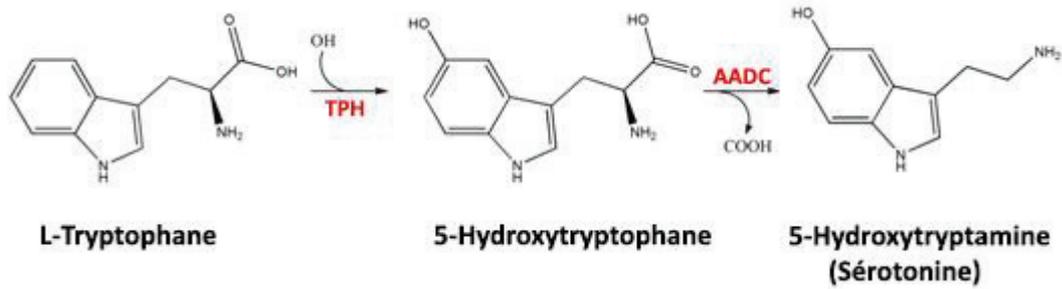


Figure 2: Voie de synthèse de la sérotonine à partir de L-tryptophane.

1.1.3 Stockage et libération

Une fois synthétisée, la 5-HT est en grande majorité stockée dans des vésicules synaptiques via le transporteur vésiculaire VMAT (Vesicular Monoamine Transporter). La libération est déclenchée par la propagation d'un potentiel d'action le long du neurone, qui provoque l'ouverture de canaux calciques membranaires voltage-dépendants (figure 3). L'entrée d'ions Ca^{2+} dans la cellule provoque l'exocytose de la sérotonine par fusion des vésicules avec la membrane présynaptique pour libérer le contenu vésiculaire dans la synapse (Elhwuegi, 2004). Les neurones sérotoninergiques présentent un rythme de décharge spontané, lent (1 à 5 pics par seconde) et régulier, mais variable au cours du cycle veille/sommeil (pour revue, Pineyro et Blier, 1999). La quantité de sérotonine libérée est régulée par des autorécepteurs inhibiteurs, situés au niveau présynaptique ou au niveau somatodendritique (Hjorth *et al.*, 1995).

1.1.4 Recapture et catabolisme

Après libération, la sérotonine peut se fixer à une grande diversité de récepteurs sérotoninergiques, qui peuvent être présynaptiques ou postsynaptiques. Ils sont qualifiés d'autorécepteurs s'ils sont situés sur des neurones sérotoninergiques, ou d'hétérorécepteurs s'ils sont situés sur des neurones libérant d'autres neurotransmetteurs. Ces récepteurs peuvent être métabotropiques ou ionotropiques, et seront décrits plus en détail dans une partie dédiée. La présence de sérotonine dans la fente synaptique est limitée grâce à des mécanismes d'inactivation (figure 3). Elle peut être recaptée via un transporteur spécifique de nature glycoprotéique, le transporteur de la sérotonine SERT ou 5-HTT (Mochizuki *et al.*, 2005). Le SERT permet un transport actif de la sérotonine à l'intérieur des neurones, des

cellules entérochromaffines et des plaquettes via l'échange d'un ion Na^+ extracellulaire avec un ion K^+ intracellulaire. Au sein du SNC, il est présent à la fois au niveau présynaptique dans les aires de projection des neurones sérotoninergiques (majoritairement dans le thalamus, l'hypothalamus et le striatum, et plus modérément dans l'hippocampe et le cortex cingulaire) et au niveau somatodendritique dans les noyaux du raphé (Qian *et al.*, 1995 ; Murphy *et al.*, 2004). Une fois recaptée, la 5-HT peut être restockée dans les vésicules pour une libération ultérieure ou être dégradée par l'isoforme A de la monoamine oxydase (MAO), une enzyme présente au niveau de la membrane externe des mitochondries (Charnay et Léger, 2010). La sérotonine est alors désaminée, oxydée en acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) puis éliminée par voie urinaire. Ce processus de dégradation est rapide, la demi-vie de la sérotonine étant de l'ordre de quelques minutes (Charnay et Léger, 2010). Un taux de 5-HIAA anormalement bas dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) a été associé avec certains troubles psychiatriques comme les comportements agressifs (Coccaro et Lee, 2010).

Les facteurs conduisant au stockage vésiculaire plutôt qu'à la dégradation intracellulaire de la sérotonine sont pour l'heure mal connus (Charnay et Léger, 2010). Des travaux ont cependant montré que certains neurones sérotoninergiques co-expriment VMAT2 et le transporteur vésiculaire du glutamate, VGLUT3, sur les mêmes vésicules (Amilhon *et al.*, 2010). Dans ces neurones, le stockage du glutamate via VGLUT3 favorise le stockage de la sérotonine via VMAT2 (et ainsi le relargage ultérieur, facilitant la transmission 5-HT), un mécanisme dénommé « synergie vésiculaire » et précédemment décrit chez certains neurones cholinergiques.

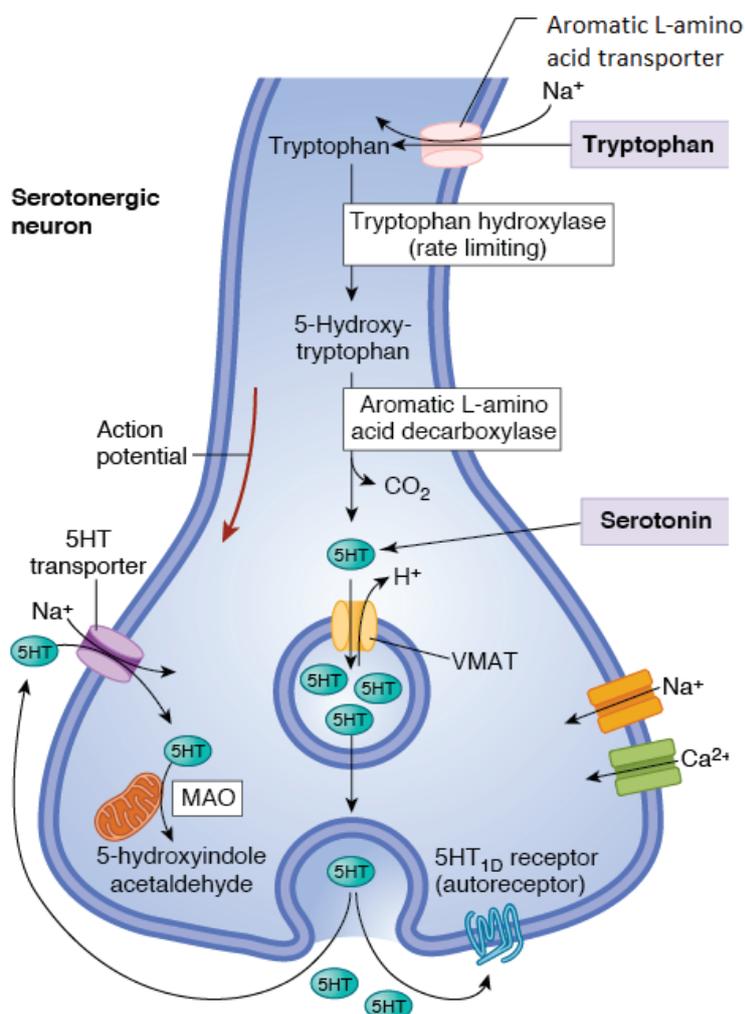


Figure 3 : Schéma d'une terminaison neuronale sérotoninergique. MAO : monoamine oxydase ; VMAT : transporteur vésiculaire des monoamines (Barrett et al., 2012).

1.2 Le système sérotoninergique central

1.2.1 Les corps cellulaires

Les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques du système nerveux central ont été décrits pour la première fois par Dahlström et Fuxe grâce à des techniques d'histofluorescence chez le rat (Dahlstrom et Fuxe, 1964). Les auteurs ont distingué les différents groupes de corps cellulaires en 9 groupes B1 à B9 dans le sens caudo-rostral (figure 4). Cette dénomination est moins utilisée aujourd'hui, ces groupes correspondant en grande majorité à un ensemble de structures du tronc cérébral, les noyaux du raphé (Törk,

1990). Les corps cellulaires sérotoninergiques sont distribués selon deux systèmes, un système caudal innervant le tronc cérébral et la moelle épinière, et un système rostral innervant le reste du cerveau (Törk, 1990 ; Pineyro et Blier, 1999).

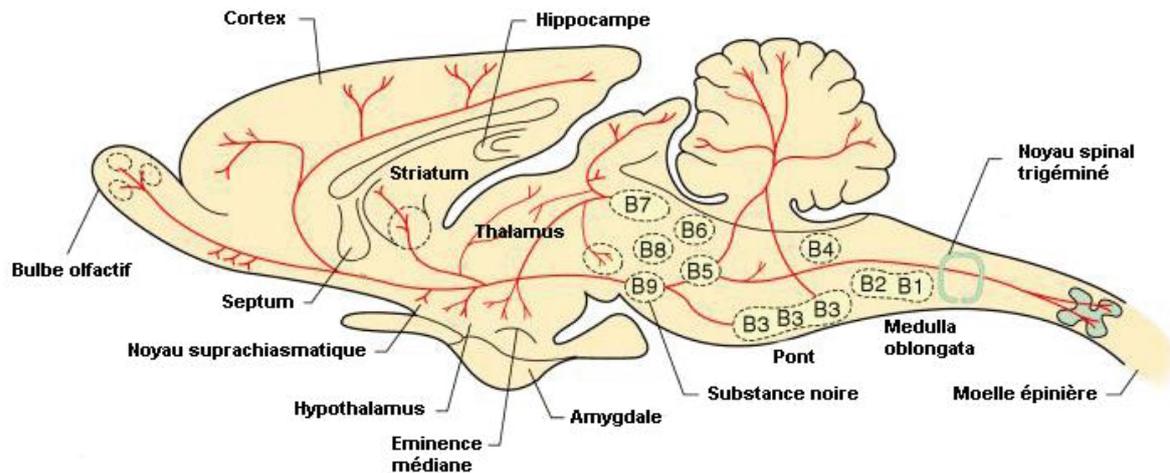


Figure 4 : Distribution des corps cellulaires et des projections sérotoninergiques chez le rat.

Le système rostral correspond aux groupes B5 à B9 et s'étend de la partie rostrale du pont jusqu'au mésencéphale. Il est majoritairement constitué par le raphé médian, le raphé dorsal et le noyau situé dans la région suprallemniscale (encore dénommé B9), et comprend aussi des structures plus petites comme le noyau linéaire caudal. Le noyau du raphé dorsal (NRD) s'étend de la partie ventrale de la substance grise périaqueducule à la partie rostrale périventriculaire du pont (figure 5) et contient le plus grand nombre de neurones sérotoninergiques, soit environ 24000 chez le chat et 135000 chez l'humain (Törk, 1990 ; Wiklund *et al.*, 1981 ; Baker *et al.*, 1985). Le raphé médian constitue le second groupe le plus dense, avec environ 7000 neurones 5-HT chez le chat et 64000 chez l'humain, et forme des projections distinctes mais partiellement superposables avec le raphé dorsal (Hornung, 2003). Le système caudal correspond aux groupes B1 à B4, situés au niveau du bulbe rachidien et de la partie caudale du pont, et comprend notamment le raphé magnus, le raphé obscurus et le raphé pallidus. Ces noyaux contiennent une quantité minoritaire de corps cellulaires dont les axones innervent le tronc cérébral et la moelle épinière. De manière globale, le système sérotoninergique se distingue par une hétérogénéité entre les groupes de corps cellulaires sur le plan anatomique et fonctionnel. Au sein même de noyaux comme le raphé dorsal, il a été mis en évidence une grande diversité de populations

neuronaux, avec différentes sous-régions contenant des cellules morphologiquement variées et responsables de projections distinctes (Baker *et al.*, 1990 ; Waterhouse *et al.*, 1986). On a aussi montré des hétérogénéités électrophysiologiques et neurochimiques dans le NRD (Andrade et Haj-Damane, 2013 ; Gaspar et Lillesaar, 2012). Par ailleurs, on peut noter qu'aucun noyau n'est exclusivement sérotoninergique : même dans le NRD, seulement 25 à 50% des corps cellulaires appartiennent à des neurones sérotoninergiques (Andrade et Haj-Damane, 2013). On y retrouve également des neurones synthétisant des catécholamines, de la substance P, de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) ou des neuropeptides comme l'enképhaline (Hornung *et al.*, 2003 ; Pineyro et Blier, 1999).

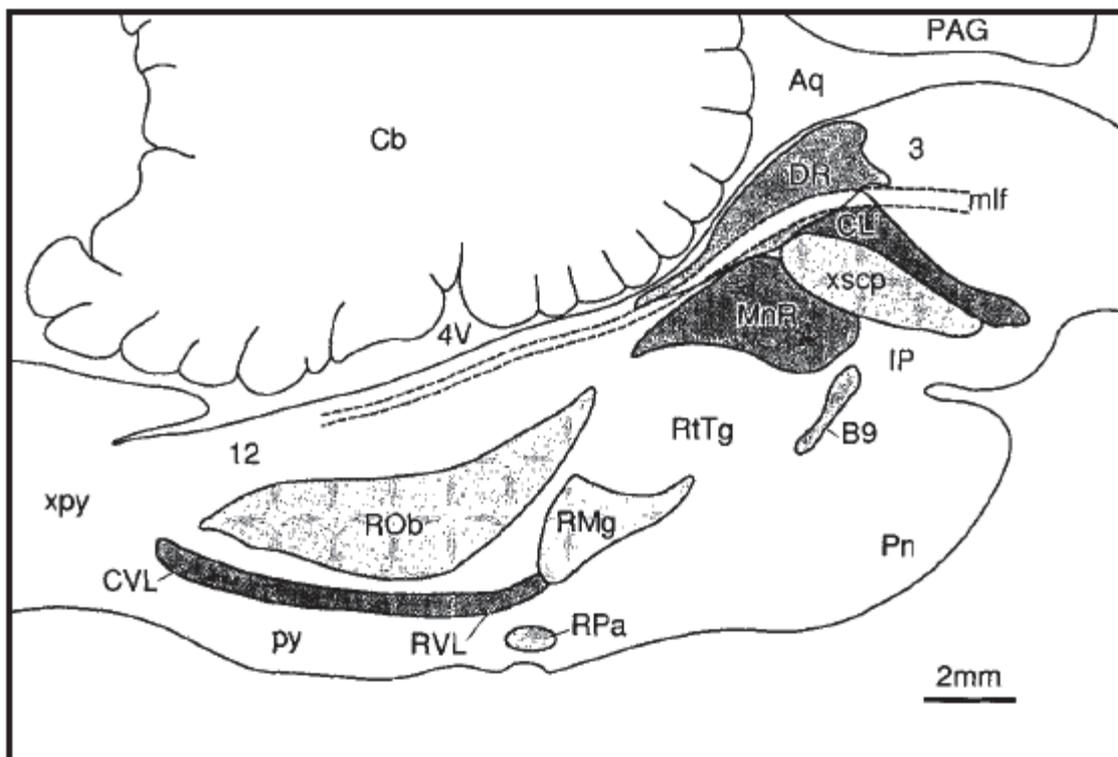


Figure 5 : Figure de la distribution des corps cellulaires sérotoninergiques chez le chat (Törk, 1990). 3 : noyau oculomoteur ; 12 : noyau hypoglossal ; 4V : 4^{ème} ventricule ; Aq : aqueduc cérébral ; Cb : cervelet ; CLi : noyau linéaire caudal ; CVL : bulbe ventrolatéral caudal ; DR : noyau du raphé dorsal ; IP : noyau interpédonculaire ; mlf : faisceau longitudinal médial ; MnR : noyau du raphé médian ; PAG : substance grise périaqueducale ; Pn : noyaux pontiques ; py : pyramide ; RMg : noyau du raphé magnus ; ROb : noyau du raphé obscurus ; RPa : noyau du raphé pallidus ; RtTg : noyau réticulaire du tegmentum du pont ; RVL : bulbe ventrolatéral rostral ; xpy : décussation pyramidale ; xscp : décussation des pédoncules cérébelleux supérieurs.

1.2.2 Les projections

1.2.2.1 Projections efférentes

Les projections efférentes comprennent les projections ascendantes vers les structures cérébrales supérieures, et les projections descendantes vers le tronc cérébral et la moelle épinière (Hensler, 2006). Les projections ascendantes sont nombreuses et innervent le cortex cérébral, les ganglions de la base, le système limbique et le diencephale avec une topographie particulière. Le cortex préfrontal, le septum latéral, le striatum, l'hippocampe ventral, l'amygdale et le thalamus reçoivent majoritairement des projections du raphé dorsal, tandis que l'hippocampe dorsal et l'hypothalamus sont surtout innervés par le raphé médian (figure 6). Les aires corticales sont innervées par les deux groupes dans des proportions variables. L'organisation du système est bien structurée de façon à projeter des axones collatéraux vers les aires apparentées en terme de fonction comme l'amygdale et l'hippocampe, le cortex entorhinal et l'hippocampe, ou encore la substance noire et le striatum (Molliver, 1987 ; Köhler et Steinbuch, 1982).

Les axones sérotoninergiques peuvent être de différents types en fonction de leur origine et des aires de projection (pour revue Törk, 1990 ; Kosofsky et Molliver, 1987). La plupart des axones sont fins, présentent des varicosités fusiformes et de nombreuses ramifications, et proviennent du raphé dorsal. On retrouve également des axones très fins caractérisés par de larges varicosités qui proviennent du raphé médian. Un troisième type de fibre est observé plus rarement et se caractérise par des axones plus larges dépourvus de varicosités. Par ailleurs, il est à noter que les varicosités ne forment pas nécessairement de jonctions synaptiques, dont l'incidence semble varier en fonction du type d'axone, des aires de projections et des espèces. Ainsi, dans l'hippocampe du rat on a rapporté une proportion des varicosités sérotoninergiques associées à des jonctions synaptiques de 18 à 33% (Oleskevich *et al.*, 1991). Similairement, au niveau cortical la plupart des varicosités ne sont pas associées à des synapses chez le rat, et d'autant plus chez le primate (Descarries et Mechawar, 2000). Une large proportion de la neurotransmission sérotoninergique est donc de nature non synaptique, la sérotonine pouvant diffuser largement à travers le système nerveux central, un processus dénommé « transmission volumique » (Descarries et Mechawar, 2000).

Les projections descendantes sont assurées par les noyaux situés dans la partie la plus caudale, c'est-à-dire le raphé magnus (le noyau du système caudal le plus riche en corps cellulaires), le raphé obscurus, le raphé pallidus et une population de 18 000 neurones dans

la formation réticulée latérale (Hornung, 2003). La moelle épinière reçoit une forte innervation sérotoninergique, et particulièrement la couche I de la corne dorsale depuis le raphé magnus ainsi que les motoneurones de la corne ventrale depuis le raphé obscurus.

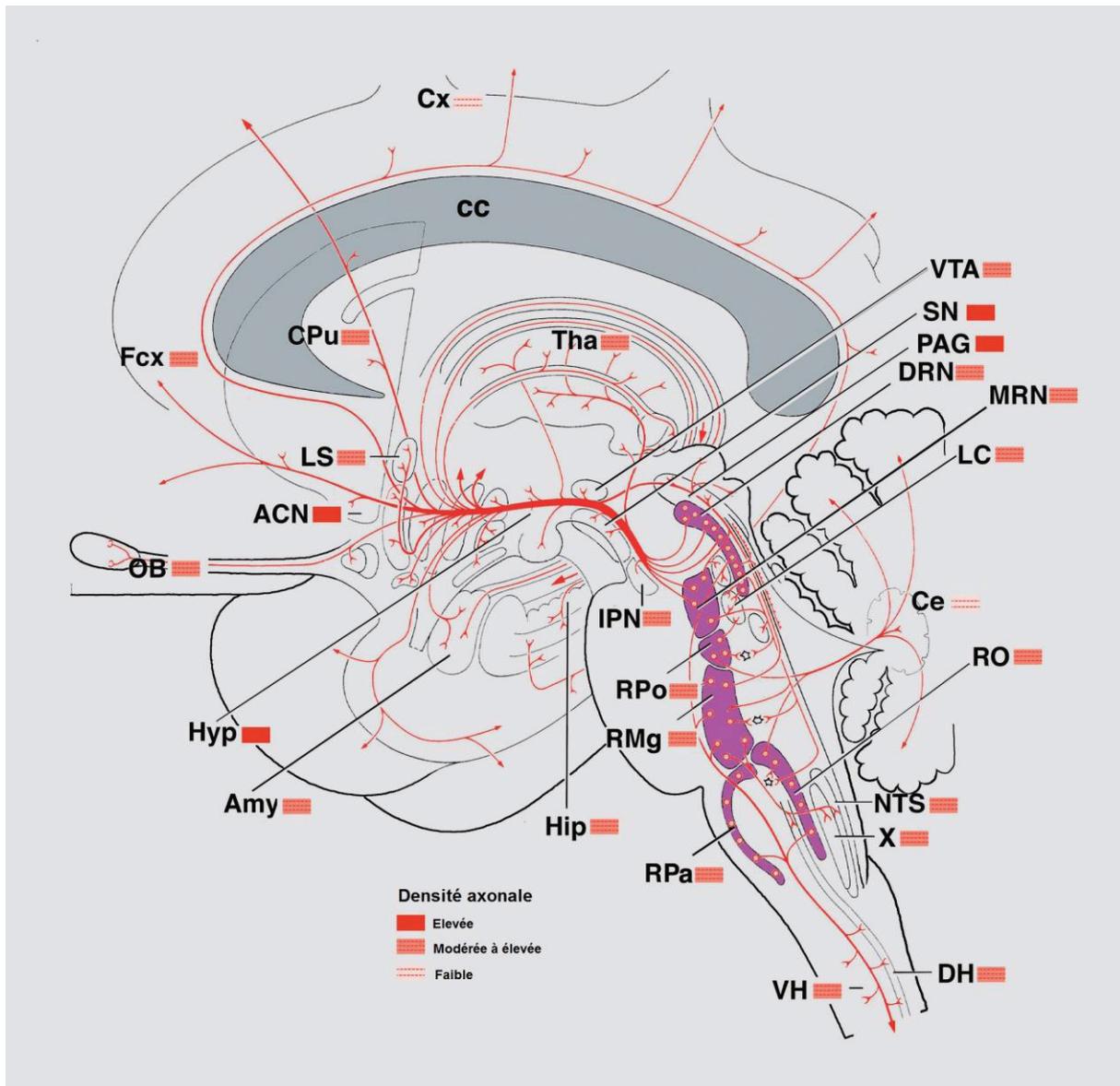


Figure 6 : Distribution du système sérotoninergique chez l'humain. Les somas sont représentés en violet et les axones en rouge. La densité du réseau axonal est indiquée dans la légende (Charnay et Léger, 2010). X, noyau dorsal du nerf vague ; ACN, noyau accumbens ; Amy, amygdale ; cc, corpus calleux ; Ce, cervelet ; CPu, caudé-putamen ; Cx, cortex ; DH, corne postérieure de la moelle épinière ; DRN, noyau du raphé dorsal ; Fcx, cortex frontal ; Hip, hippocampe ; Hyp, hypothalamus ; IPN, noyau interpédonculaire ; LC, locus coeruleus ; LS, septum latéral ; MRN, noyau du raphé médian ; NTS, noyau du tractus solitaire ; OB, bulbe olfactif ; PAG, substance grise périaqueducale ; RMg, noyau du raphé magnus ; RO, noyau du raphé obscurus ; Rpa, noyau du raphé pallidus ; RPo, noyau du raphé pontis ; SN, substance noire ; Tha, thalamus ; VH, corne dorsale de la moelle épinière ; VTA, aire tegmentale ventrale.

1.2.2.2 Projections afférentes

L'activité de l'ensemble du système sérotoninergique est régulée grâce à l'innervation des corps cellulaires par des afférences provenant de populations neuronales variées (Altieri *et al.*, 2013). Ainsi, le raphé dorsal est innervé par des voies provenant du cortex, de l'hypothalamus ou du système limbique, et également des corps cellulaires dopaminergiques, noradrénergiques et cholinergiques (Jacobs et Azmitia, 1992). Il reçoit aussi des projections GABAergiques notamment par le biais de l'habénula latérale (Adell *et al.*, 2002 ; Pineyro et Blier, 1999). Au sein même du système sérotoninergique, des interconnexions ont été observées entre différents noyaux notamment entre raphé dorsal et raphé médian (Hensler, 2006).

1.3 Les récepteurs sérotoninergiques

La première description des récepteurs sérotoninergiques fut réalisée par Gaddum dans les années 50, qui distingua deux classes de récepteurs M et D en fonction des propriétés antagonistes de la morphine (M) ou de la dibenzylène (D) sur les effets constricteurs de la sérotonine sur l'iléon de cobaye (Gaddum et Picarelli, 1957). Au cours des années, le développement des techniques de radioliation et d'autoradiographie puis de biologie moléculaire ont permis de révéler petit à petit la grande diversité des récepteurs sérotoninergiques (Hannon et Hoyer, 2008). Aujourd'hui, on admet l'existence d'au moins 14 sous-types de récepteurs qui sont regroupés en 7 familles (5-HT₁ à 5-HT₇) selon des critères de séquence, de structure et de mécanismes de transduction établis par le comité de nomenclature de la sérotonine de l'IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology - Hoyer *et al.*, 1994 ; Millan *et al.*, 2008). Parmi ces 14 récepteurs, 13 font partie de la superfamille des récepteurs métabotropiques couplés à des protéines G. Seuls les récepteurs 5-HT₃ sont des récepteurs ionotropiques (Derkach *et al.*, 1989).

1.3.1 Les récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G

Les récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G (RCPG) constituent l'une des plus grandes familles de protéines. Ils partagent une homologie structurale et un mécanisme commun de transduction du signal basé sur une interaction entre le récepteur

lui-même, une protéine G et une protéine effectrice (figure 7). Le récepteur est composé de 7 hélices alpha transmembranaires reliées par 3 boucles extracellulaires et 3 boucles cytoplasmiques, avec une extrémité amino-terminale côté extracellulaire et une extrémité carboxy-terminale côté cytoplasmique (Alexander *et al.*, 2013). La protéine G assure le couplage entre le récepteur et l'effecteur, et se compose de 3 sous-unités alpha, bêta et gamma. Au repos, une molécule de GDP est fixée à la sous-unité alpha. Les sous-unités bêta et gamma sont indissociables et ont un rôle régulateur dans la transmission du signal. La fixation d'un agoniste sur le site de reconnaissance extracellulaire du récepteur induit des modifications structurales qui aboutissent à l'activation de la protéine G par remplacement de la molécule de GDP par une molécule de GTP. La sous-unité alpha se dissocie alors du reste de la protéine et interagit avec l'effecteur pour induire des modifications de concentration intracellulaires de molécules appelées seconds messagers (comme l'AMPc ou l'IP₃), entraînant ensuite une cascade d'événements dépendant de la nature de la protéine G. Le cycle de transduction se termine lorsque le GTP est hydrolysé en GDP par l'activation d'une GTPase intrinsèque à la sous-unité alpha, qui retourne à son état de repos initial.

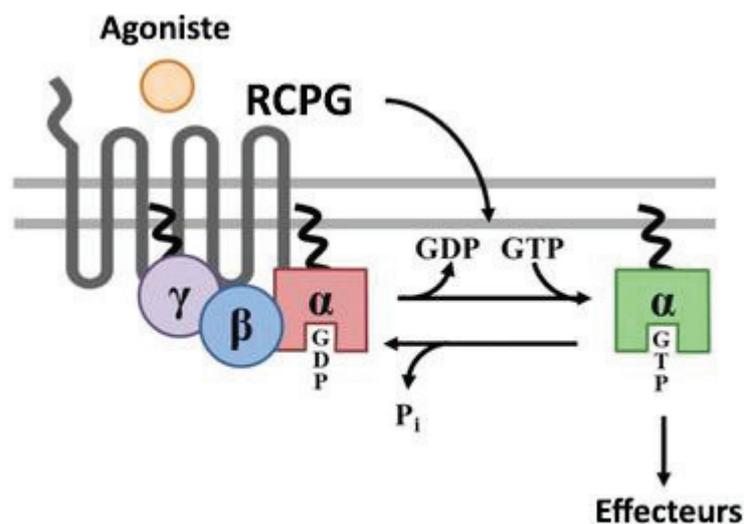


Figure 7 : Représentation schématique d'un RCPG : l'activation par un agoniste entraîne un changement de conformation du récepteur et ainsi une activation de la protéine G intracellulaire, activant à son tour divers effecteurs (d'après Stewart *et al.*, 2012).

1.3.2 Les récepteurs ionotropiques

Ces récepteurs sont constitués de plusieurs chaînes polypeptidiques transmembranaires formant un canal ionique. La liaison d'un agoniste sur un site de reconnaissance extracellulaire induit des changements de conformation du canal, ce qui permet le passage d'ions dans le sens du gradient transmembranaire ayant pour conséquence l'hyperpolarisation ou la dépolarisation du neurone selon l'ion considéré.

1.3.3 Les différentes familles de récepteurs sérotoninergiques

1.3.3.1 Les récepteurs 5-HT₁

Les récepteurs 5-HT₁ sont préférentiellement couplés à la protéine G_{i/o}. Leur activation induit donc une inhibition de l'adénylate cyclase ce qui provoque une diminution de la production d'AMPc intracellulaire, se traduisant par une hyperpolarisation membranaire et une inhibition de l'activité du neurone (pour revue Nichols et Nichols, 2008). Cette famille comprend 5 récepteurs différents : 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} et 5-HT_{1F}. Les récepteurs 5-HT_{1A} ont été très largement étudiés au cours des dernières années et seront décrits en détail dans la section suivante.

Les récepteurs 5-HT_{1B} sont majoritairement exprimés au niveau des ganglions de la base et du cortex frontal. Ils sont présents au niveau présynaptique des terminaisons des neurones sérotoninergiques en tant qu'auto-récepteurs, et des neurones cholinergiques, GABAergiques et glutamatergiques en tant qu'hétéro-récepteurs et participent à la régulation de la libération de ces neurotransmetteurs. Ils sont impliqués dans des désordres comportementaux comme l'agressivité, l'impulsivité et l'addiction, et régulent la mémoire à court terme et à long terme (pour revue Hannon et Hoyer, 2008). Ils participent à l'activité antimigraleuse des triptans (Maassen van den Brink *et al.*, 1998).

Les récepteurs 5-HT_{1D} sont présents principalement dans les ganglions de la base et aussi au niveau de la substance grise périaqueducule et de la moelle épinière chez l'humain. Ces récepteurs sont très proches des 5-HT_{1B} en termes de structure, de fonction et de localisation, mais sont exprimés en bien plus faible densité (Hannon et Hoyer, 2008). Comme les 5-HT_{1B}, ils sont situés au niveau présynaptique et inhibent la libération de sérotonine ou d'autres neurotransmetteurs (pour revue Filip et Bader 2009 ; Lanfumey et Hamon 2004).

Des polymorphismes des 5-HT_{1D} ont été mis en évidence dans l'anorexie nerveuse. Ils sont également une cible d'action des triptans, agonistes mixtes 5-HT_{1B}/5-HT_{1D}.

Les récepteurs 5-HT_{1E} sont localisés au niveau cortical (cortex frontal et entorhinal), ainsi que dans le caudé, le putamen et le claustrum. Ces récepteurs sont mal connus à l'heure actuelle dû à un manque de ligands spécifiques, d'où leur appellation en minuscules (Hannon et Hoyer, 2008).

Le dernier type de récepteur 5-HT₁ découvert est le récepteur 5-HT_{1F}, exprimé dans diverses régions comme l'hippocampe, le cortex entorhinal, le cortex cingulaire, le caudé ou encore le tronc cérébral. Les récepteurs 5-HT_{1F} participent à réguler l'inflammation neurogène et pourraient constituer une cible de choix dans le traitement de la migraine (Johnson *et al.*, 1997).

1.3.3.2 Les récepteurs 5-HT₂

Il existe 3 sous-types de récepteurs 5-HT₂ : les 5-HT_{2A}, les 5-HT_{2B}, et les 5-HT_{2C}, qui sont tous préférentiellement couplés à la protéine G_{q/11} dont la stimulation permet l'activation de la phospholipase C. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse de PIP₂ en IP₃ et diacylglycérol, qui agissent comme seconds messagers pour augmenter la concentration en calcium intracellulaire et activer la protéine kinase C, respectivement (Hercend *et al.*, 2012). Ils peuvent aussi être couplés à la protéine G_{12/13}, qui serait impliquée dans des processus de remodelage structurel de la cellule à long terme (Sah *et al.*, 2000). Les récepteurs 5-HT_{2A} sont largement distribués dans le système nerveux central, principalement dans le cortex (notamment piriforme et entorhinal), le claustrum et certains noyaux du tronc cérébral, mais également dans le système limbique et le striatum (Hannon et Hoyer, 2008). Ces récepteurs sont impliqués dans la régulation du sommeil et les effets hallucinogènes et psychotiques induits par les psychédéliques comme la psilocybine et le LSD. Par ailleurs ils sont bloqués par certains antipsychotiques dits atypiques, ce qui diminuerait l'apparition des syndromes extrapyramidaux par rapport aux antipsychotiques classiques, qui sont des antagonistes plus spécifiques des récepteurs dopaminergiques D₂ (Meltzer *et al.*, 2003).

Bien que majoritairement périphérique, notamment au niveau cardiaque, le récepteur 5-HT_{2B} est présent au niveau cérébral et restreint à des régions comme le cervelet,

le septum latéral, l'amygdale et l'hypothalamus. Ce récepteur est impliqué dans la perception de la douleur, la prise alimentaire et l'anxiété (Hannon et Hoyer, 2008). Plus récemment, plusieurs études ont montré l'importance de la stimulation des récepteurs 5-HT_{2B} des astrocytes dans le mécanisme d'action des ISRS (Hertz *et al.*, 2015).

Auparavant classé parmi les récepteurs 5-HT₁, le récepteur 5-HT_{2C} est fortement exprimé dans les plexus choroïdes, et se retrouve également au niveau du système limbique et dans certains noyaux du thalamus. Il semble impliqué dans la régulation de la prise alimentaire et pourrait être une cible thérapeutique dans divers troubles psychiatriques (Leysen, 2004).

1.3.3.3 Les récepteurs 5-HT₃

Les récepteurs 5-HT₃ sont les seuls récepteurs sérotoninergiques appartenant à la superfamille des récepteurs ionotropiques. Ils partagent des similarités structurales et électrophysiologiques avec d'autres récepteurs de ce type comme les récepteurs à l'acétylcholine, à la glycine et le récepteur GABA-A (Hoyer, 1990). Ils correspondent aux récepteurs M décrits initialement par Gaddum en 1957. Leur ouverture provoque un efflux de potassium et un influx de sodium et de calcium, se traduisant par une dépolarisation rapide du neurone. Il existe plusieurs sous-unités pour ces récepteurs (5-HT_{3A-E}), qui peuvent s'associer en différents pentamères selon les espèces et dont les propriétés fonctionnelles sont à élucider (Holbrook *et al.*, 2009). La distribution des récepteurs 5-HT₃ est variable selon les espèces. Globalement, les régions les plus riches sont l'hippocampe, l'amygdale et les couches superficielles du cortex, et surtout le complexe dorsal vagal dans le bulbe rachidien. Les propriétés antiémétiques des sétrons, antagonistes 5-HT₃, sont probablement liées à un blocage des récepteurs dans cette région. Ces récepteurs sont impliqués dans la nociception, la respiration ou encore l'anxiété (Hannon et Hoyer, 2008).

1.3.3.4 Les récepteurs 5-HT₄

Ce récepteur est couplé préférentiellement à la protéine G_s, entraînant une activation de l'adénylate cyclase et l'augmentation de la concentration d'AMPC, ce qui provoque une augmentation de l'excitabilité neuronale. De nombreux isoformes ont été identifiées (au moins 9), avec des différences de distribution entre tissus et espèces mais un profil

pharmacologique comparable (Bockaert *et al.*, 2008). Les récepteurs 5-HT₄ sont exprimés au niveau des voies mésolimbique et nigrostriée du système dopaminergique, ainsi que dans l'amygdale, le septum et l'hippocampe, où ils sont présents sur les terminaisons cholinergiques. Ils sont impliqués dans la mémoire et l'appétit, ainsi que la réponse au stress (Hannon et Hoyer, 2008). Ces récepteurs sont impliqués dans la régulation de la cascade amyloïde et pourraient constituer une cible thérapeutique intéressante dans la maladie d'Alzheimer (Giannoni *et al.*, 2013 ; Freret *et al.*, 2017).

1.3.3.5 Les récepteurs 5-HT₅

Deux sous-types de récepteurs 5-HT_{5A} et 5-ht_{5B} ont été identifiés. Le produit du gène codant pour le 5-ht_{5B} n'est pas fonctionnel chez l'homme, d'où l'appellation en minuscules (Nelson, 2004). On ne connaît pas encore avec certitude la fonction et la nature du couplage des récepteurs 5-HT_{5A}. La protéine G_{i/o} ou la protéine G_s pourraient être impliquées (Filip et Bader, 2009). Ces récepteurs participent possiblement à réguler la réponse au stress.

1.3.3.6 Les récepteurs 5-HT₆

Le récepteur 5-HT₆ est couplé à la protéine G_s et semble principalement situé au niveau central, côté postsynaptique (Filip et Bader, 2009). Les régions les plus riches en récepteurs 5-HT₆ sont le striatum, le tubercule olfactif et le cortex. L'hippocampe exprime également les 5-HT₆ en plus faible densité. On a montré que ces récepteurs sont impliqués dans la régulation de la mémoire (Quiedeville *et al.*, 2014). Il pourrait s'agir d'une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement de l'obésité, la dépression, la schizophrénie et la maladie d'Alzheimer (Benhamu *et al.*, 2014 ; Di Chiara *et al.*, 2011 ; Arnt et Olsen, 2011).

1.3.3.7 Les récepteurs 5-HT₇

A l'instar des récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆, le récepteur 5-HT₇ est couplé à la protéine G_s. Il est retrouvé dans le thalamus, l'hippocampe, le noyau suprachiasmatique, l'amygdale, et de manière plus modeste dans l'hypothalamus et le raphé dorsal. Il est impliqué dans la régulation du rythme circadien, du sommeil et de la température corporelle (Hannon et Hoyer, 2008).

Tableau 1. Les différents récepteurs sérotoninergiques : voies de transduction, localisation et exemples d'implications (d'après Filip et Bader, 2009).

Famille	Sous-type	Principale voie de signalisation	Distribution cérébrale	Implications physiopathologiques chez l'humain
5-HT₁	5-HT _{1A}	G _{i/o}	Répandu - surtout hippocampe, cortex, noyaux du raphé	Emotions, comportement, cognition, douleur
	5-HT _{1B}	G _{i/o}	Répandu - surtout ganglions de la base, cortex	Comportement, addiction
	5-HT _{1D}	G _{i/o}	Ganglions de la base, hippocampe, cortex	Douleur
	5-HT _{1E}	G _{i/o}	Cortex, hippocampe, caudé putamen, claustrum	?
	5-HT _{1F}	G _{i/o}	Noyau du raphé dorsal, hippocampe, cortex, noyaux caudés, tronc cérébral	Migraine
5-HT₂	5-HT _{2A}	G _{q/11}	Cortex, hippocampe, hypothalamus, ganglions de la base	Comportement, addiction, sommeil
	5-HT _{2B}	G _{q/11}	Cervelet, septum, hypothalamus, amygdale	Emotions, appétit, douleur
	5-HT _{2C}	G _{q/11}	Plexus choroïdes, cortex, hippocampe, amygdale, striatum, substance noire	Appétit, cognition
5-HT₃	5-HT ₃	Canal ionique	Répandu - surtout area postrema, noyau du tractus solitaire, complexe vagal dorsal, structures limbiques	Douleur, cognition
5-HT₄	5-HT ₄	G _s	Ganglions de la base, cortex, septum, hippocampe	Mémoire, émotions
5-HT₅	5-HT _{5a}	G _{i/o}	Hippocampe, hypothalamus, bulbe olfactif, cortex, thalamus, striatum, pont	?
	5-HT _{5b}	?	Habenula, noyaux du raphé, hippocampe (rongeur)	Absent chez l'humain
5-HT₆	5-HT ₆	G _s	Répandu (surtout striatum, amygdale, hippocampe, cortex)	Mémoire, appétit
5-HT₇	5-HT ₇	G _s	Thalamus, hippocampe, cortex, amygdale, noyau supra-chiasmatique	Emotions, rythmes circadiens, thermorégulation

1.4 Les récepteurs 5-HT_{1A} comme cible thérapeutique ou biomarqueur

1.4.1 Généralités

1.4.1.1. Structure

Parmi les nombreux récepteurs sérotoninergiques, le récepteur 5-HT_{1A} est le premier à avoir été entièrement séquencé (pour revue, Barnes et Sharp, 1999). Le gène du récepteur humain fut cloné pour la première fois en 1987 et identifié comme codant pour le récepteur 5-HT_{1A} un an plus tard (Kobilka *et al.*, 1987 ; Fargin *et al.*, 1988) ; ce fut d'ailleurs le second récepteur de type RCPG à avoir été cloné, après le récepteur β 2 avec lequel il partage des similarités structurelles (pour revue, Hoyer, 2017). Dépourvu d'introns, il est localisé sur le chromosome 5 (5q11.2-q13). Le récepteur contient 422 acides aminés chez l'humain (Hoyer *et al.*, 1994 ; Olivier *et al.*, 1999) et le rat ; l'homologie structurelle est de 89% entre ces deux espèces (Barnes et Sharp, 1999). Sa structure est caractéristique des RCPG décrits précédemment (figure 8), avec 7 hélices alpha transmembranaires, trois sites de glycosylation au niveau de l'extrémité amino terminale extracellulaire, une extrémité –COOH intracellulaire, et trois sites de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) sur les 2e et 3e boucles intracellulaires (Lanfume et Hamon, 2000).

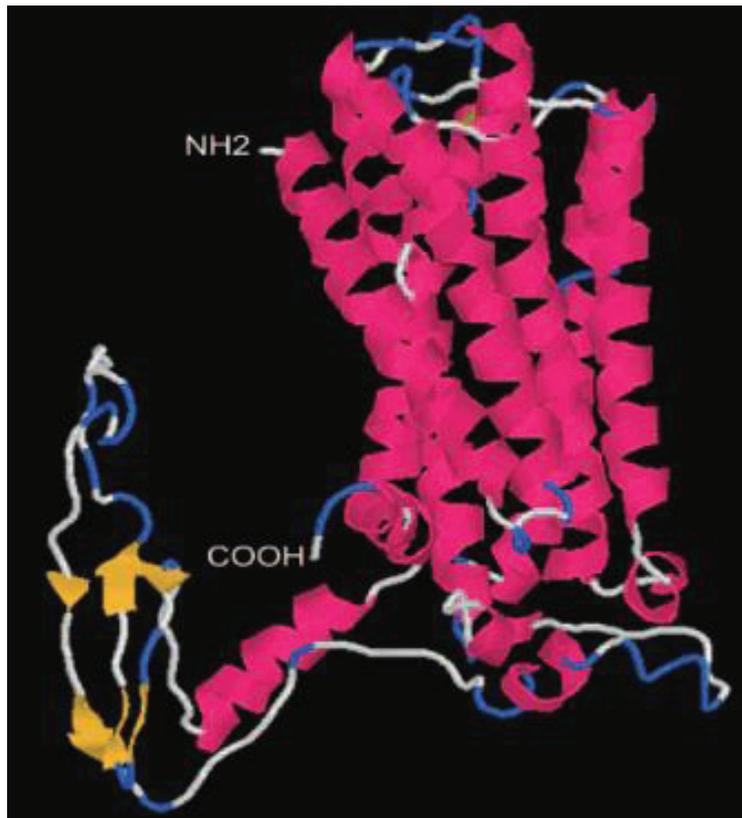


Figure 8 : Modélisation moléculaire du récepteur 5-HT_{1A} du rat, basé sur la structure cristallographique de la rhodopsine bovine sous forme inactive (Kushwaha et al., 2006). Les hélices alpha sont indiquées en rose, les feuillets bêta en orange.

1.4.1.2 Distribution

La localisation des récepteurs 5-HT_{1A} a été principalement étudiée en autoradiographie *in vitro*, grâce au développement de radioligands spécifiques comme le [³H]8-OH-DPAT, le [³H]WAY-100635 ou encore le [¹²³I]MPPI (Hall *et al.*, 1985 ; Gozlan *et al.*, 1995 ; Kung *et al.*, 1994). Ces techniques ont permis de montrer une distribution des récepteurs 5-HT_{1A} assez comparable chez les mammifères (figures 9 et 10), avec une densité importante de récepteurs 5-HT_{1A} dans les aires limbiques comme l'hippocampe, l'amygdale et le septum latéral, au niveau du raphé dorsal et médian, ainsi que dans certaines aires corticales notamment le cortex entorhinal et le cortex cingulaire (Lanfumey et Hamon, 2000 ; Hall *et al.*, 1997). Ils sont retrouvés en densité plus modeste dans le thalamus, l'hypothalamus, et d'autres noyaux du raphé en partie caudale du tronc cérébral. Dans les régions du striatum et du cervelet, les récepteurs 5-HT_{1A} sont faiblement exprimés et généralement non détectés dans ces études. Par la suite, le développement de radiotraceurs antagonistes adaptés à l'imagerie TEP comme le [¹¹C]WAY100635 et le [¹⁸F]MPPF a permis

d'établir la distribution des 5-HT_{1A} *in vivo*, avec des résultats similaires à l'autoradiographie (Mathis *et al.*, 1994 ; Shiue *et al.*, 1997).

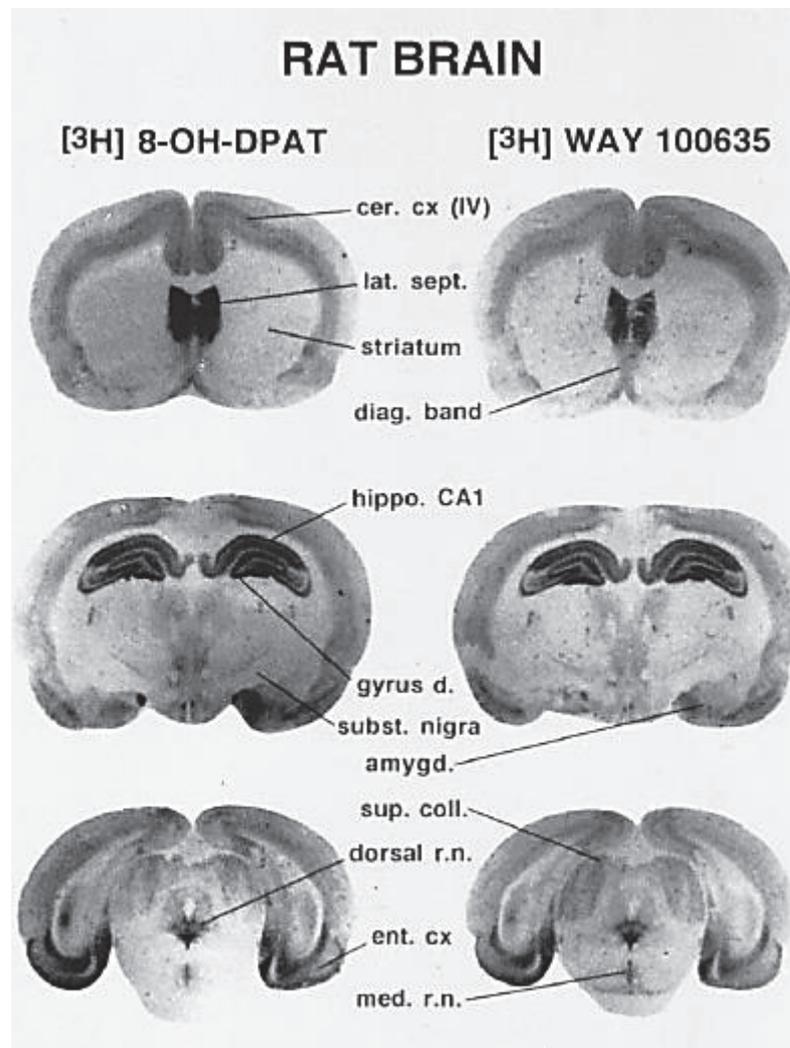


Figure 9 : Distribution cérébrale *in vitro* du récepteur 5-HT_{1A} chez le rat en autoradiographie, visualisée avec deux radioligands spécifiques, l'agoniste [³H]8-OH-DPAT et l'antagoniste [³H]WAY-100635 (Lanfumeey et Hamon, 2000). Cer. Cx (IV) : couche IV du cortex cérébral ; lat. sept. : septum latéral ; diag. band : bande diagonale de Broca ; hippo. CA1 : aire CA1 de la corne d'Ammon de l'hippocampe ; gyrus d. : gyrus denté ; subst. nigra : substance noire ; amygd. : amygdale ; supp. coll. : colliculi supérieurs ; dorsal r.n. : noyau du raphé dorsal ; ent. cx. : cortex entorhinal ; med. r.n. : noyau du raphé médian.

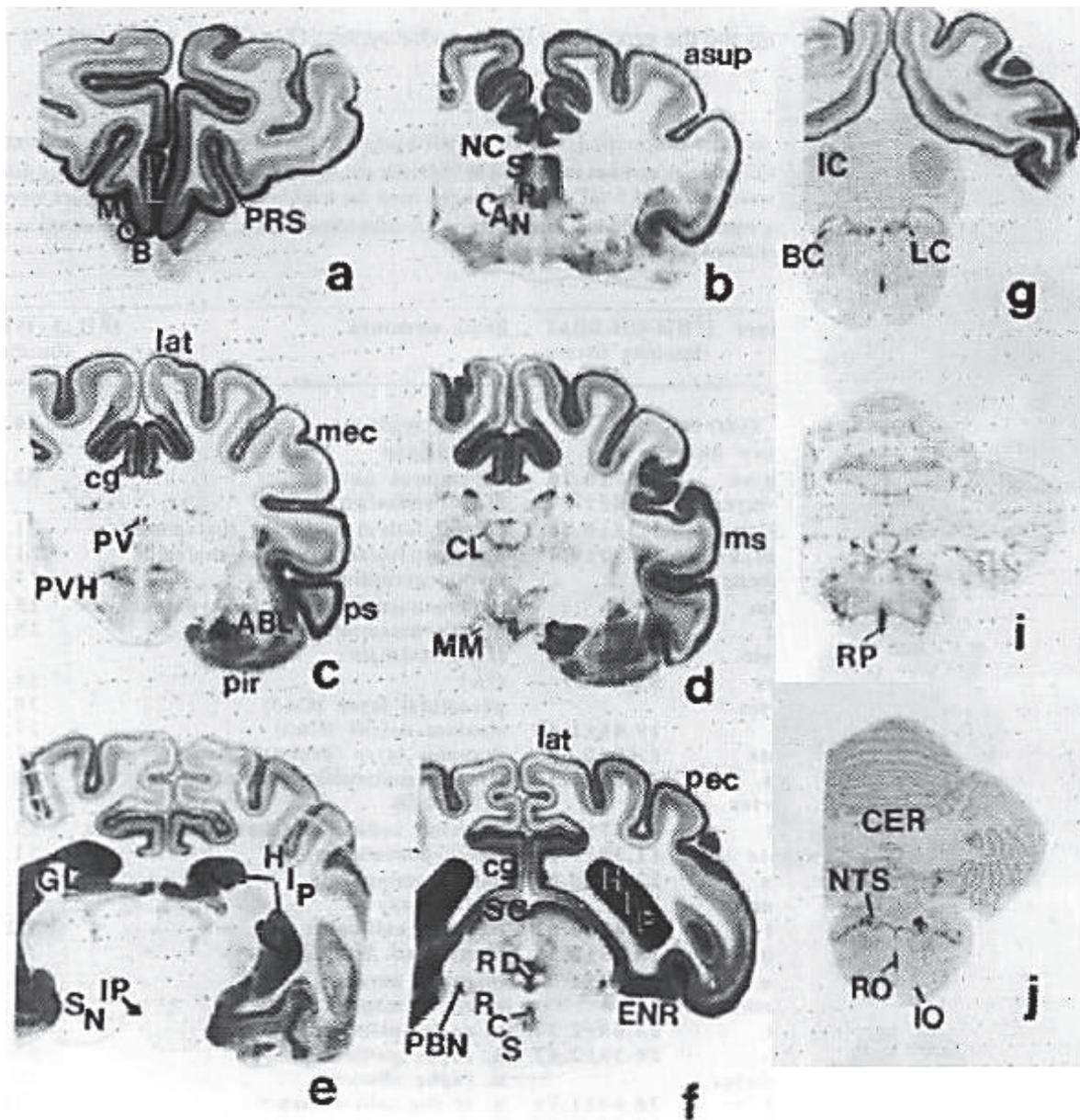


Figure 10 : Distribution cérébrale *in vitro* du récepteur 5-HT_{1A} chez le chat en autoradiographie, visualisée avec le [³H]8-OH-DPAT (Charnay et al., 1997). ABS : noyau basolatéral de l'amygdale ; asup : gyrus suprasylvien antérieur ; BC : brachium conjunctivum ; CAN : commissure antérieure ; CER : cervelet ; cg : cortex cingulaire ; CL : noyau central latéral du thalamus ; ENR : cortex entorhinal ; GL : corps géniculé latéral ; HIP : hippocampe ; IC : colliculus inférieur ; IO : noyau olivaire inférieur ; IP : noyau interpédonculaire ; lat : gyrus latéral ; LC : locus coeruleus ; mec : gyrus ectosylvien médian ; MM : noyau mamillaire ; ms : gyrus sylvien médian ; MOB : bulbe olfactif ; NC : noyau caudé ; NTS : noyau du tractus solitaire ; PBN : noyau parabigéminale ; pec : gyrus ectosylvien postérieur ; pir : cortex piriforme ; PRS : sulcus présylvien ; ps : gyrus sylvien postérieur ; PV : noyau paraventriculaire du thalamus ; PVH : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; RCS : noyau du raphé médian ; RD : noyau du raphé dorsal ; RO : noyau du raphé obscur ; RP : noyau du raphé pallidus ; SC : colliculus supérieur ; SN : substance noire ; SP : septum.

La distribution de l'ARNm des récepteurs 5-HT_{1A} a également été étudiée par des techniques d'hybridation *in situ* à l'aide de sondes spécifiques marquées au [³²P] (Miquel *et al.*, 1992 ; Pompeiano *et al.*, 1992 ; Lanfumey et Hamon, 2000). Elle est globalement assez proche de celle des sites de fixation, avec une présence d'ARNm majoritaire dans l'hippocampe, le cortex entorhinal, les noyaux du raphé et le septum latéral. On peut noter toutefois une distribution particulière dans l'hippocampe, où les ARNm sont présents majoritairement dans la couche pyramidale de l'aire CA1 et la couche granulaire du gyrus denté, et absents des couches plus internes contrairement aux récepteurs (figure 11). Cette différence s'explique facilement en considérant l'organisation des dendrites des cellules de l'hippocampe (Bayer, 1985), qui est parallèle à la distribution des récepteurs 5-HT_{1A}. Il est donc probable que les récepteurs 5-HT_{1A} soient exprimés au niveau dendritique, contrairement aux ARNm qui sont présents dans les corps cellulaires (Pompeiano *et al.*, 1992).

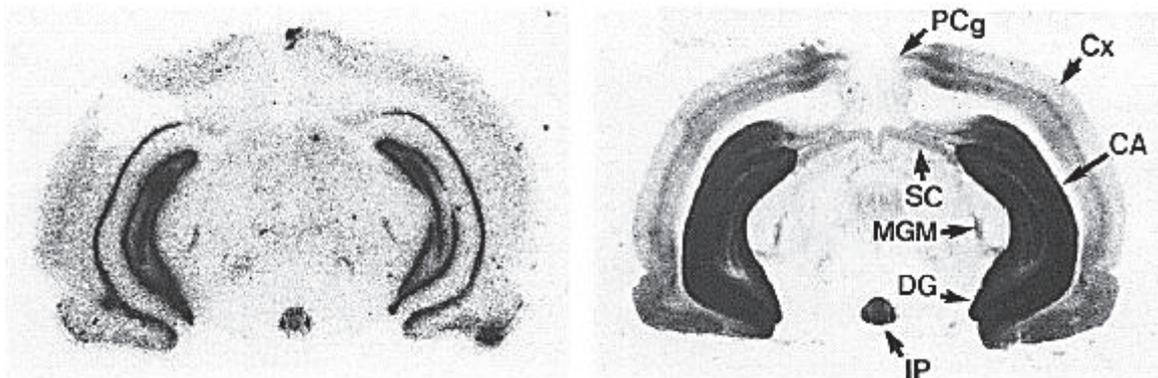


Figure 11 : Distribution au niveau hippocampique des ARNm (à gauche) et des sites de fixation (à droite) des récepteurs 5-HT_{1A} chez le rat en autoradiographie (Pompeiano *et al.*, 1992). CA : corne d'Ammon ; Cx : néocortex ; DG : gyrus denté ; IP : noyau interpedonculaire ; MGM : noyau géniculé médian ; PCg : cortex cingulaire postérieur ; SC : colliculus supérieur.

Des expériences d'autoradiographie et d'hybridation *in situ* après lésion des neurones sérotoninergiques par la 5,7-DHT ont permis de montrer que les 5-HT_{1A} dans les aires de projections sont des hétérorécepteurs localisés au niveau postsynaptique, tandis que les 5-HT_{1A} présents dans les noyaux du raphé (mésencéphaliques comme médullaires) sont des autorécepteurs somato-dendritiques (Miquel *et al.*, 1992 ; Vergé *et al.*, 1985 ; Radja *et al.*, 1991).

La mise au point d'anticorps polyclonaux dirigés contre la troisième boucle intracellulaire du récepteur du rat a contribué à préciser encore la cartographie des 5-HT_{1A} par immunohistochimie (El Mestikawy *et al.*, 1990). Les plus hautes densités de marquage se sont révélées en accord avec les résultats obtenus par autoradiographie et hybridation *in situ* (Miquel *et al.*, 1991 ; Kia *et al.*, 1996c). Des expériences de double immuno-marquage et de microscopie électronique ont permis d'établir avec précision la localisation des récepteurs au niveau cellulaire (Riad *et al.*, 2000 ; Descarries et Riad, 2012). On a ainsi pu confirmer la nature d'autorécepteurs somatodendritiques des récepteurs du raphé (Sotelo *et al.*, 1990). Dans le reste du cerveau, les récepteurs sont portés par des neurones pyramidaux dans le cortex, des neurones pyramidaux et granulaires dans l'hippocampe (Francis *et al.*, 1992 ; Burnet *et al.*, 1995), des neurones cholinergiques dans le septum, ou encore des interneurons GABAergiques (Francis *et al.*, 1992 ; Kia *et al.*, 1996a ; Riad *et al.*, 2000 ; Santana *et al.*, 2004 ; Luttgen *et al.*, 2005). Certaines études ont rapporté la présence de 5-HT_{1A} sur des cellules gliales (Azmitia *et al.*, 1996 ; Whitaker-Azmitia *et al.*, 1993) mais ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres (Santana *et al.*, 2004, Palchaudhuri et Flugge, 2005). Enfin, le récepteur peut être présent au niveau synaptique comme extra synaptique (Kia *et al.*, 1996b ; Riad *et al.*, 2000 ; Descarries et Riad, 2012).

1.4.1.3 Propriétés pharmacologiques et fonctionnelles

Propriétés au sein du système nerveux central

Les récepteurs 5-HT_{1A} possèdent de multiples rôles au sein du système nerveux central, qui reflètent la diversité de neurones qui les expriment. Ils sont classiquement distingués en deux classes de fonctions distinctes, les autorécepteurs et les hétérorécepteurs. Les autorécepteurs situés au niveau somatodendritique des noyaux du raphé (Riad *et al.*, 2000) exercent un rétrocontrôle inhibiteur important sur le système sérotoninergique, c'est-à-dire que leur stimulation induit une hyperpolarisation des neurones à 5-HT s'accompagnant d'une diminution du taux de décharge (Sprouse et Aghajanian, 1987 ; pour revue Altieri *et al.*, 2013). La sérotonine endogène responsable de la stimulation locale des autorécepteurs 5-HT_{1A} provient de collatérales axonales ou d'une libération somatodendritique (pour revue, Andrade *et al.*, 2015).

L'activation des hétérorécepteurs entraîne également une hyperpolarisation des neurones concernés, avec diminution de l'excitabilité neuronale et du taux de décharge (Hamon *et al.*, 1990 ; Beck *et al.*, 1992). Ils possèdent des effets nombreux compte tenu des différentes populations neuronales exprimant ces hétérorécepteurs (glutamatergiques, GABAergiques ou cholinergiques, comme évoqué dans la section précédente) et sont impliqués dans la modulation d'autres systèmes de neurotransmission. Il a notamment été montré que les récepteurs 5-HT_{1A} du cortex préfrontal médian modulent la libération de dopamine (Diaz-Mataix *et al.*, 2006 ; Diaz-Mataix *et al.*, 2005 ; Sakaue *et al.*, 2000). Des effets mixtes peuvent exister au sein des même régions, comme dans l'hippocampe ou le cortex préfrontal où l'activité des neurones pyramidaux est diminuée par la stimulation directe des récepteurs 5-HT_{1A} exprimés par ces neurones (Tada *et al.*, 2004 ; Hajos *et al.*, 1999), ou indirectement augmentée par la stimulation de récepteurs présents sur les interneurones GABAergiques (Schmitz *et al.*, 1995 ; Llado-Pelfort *et al.*, 2012). Les récepteurs 5-HT_{1A} des neurones pyramidaux du cortex préfrontal médian sont également impliqués dans la régulation du système sérotoninergique, via des projections directes vers le raphé dorsal (Hajos *et al.*, 1998) ou des projections indirectes impliquant des interneurones GABAergiques dans le tronc cérébral (Varga *et al.*, 2001 ; Altieri *et al.*, 2013).

Mécanismes de transduction

Le couplage des récepteurs 5-HT_{1A} aux protéines G_{i/o} leur confère un caractère inhibiteur (De Vivo et Maayani, 1986). L'activation de ces protéines entraîne une inhibition de l'adénylate cyclase (Figure 12), se traduisant par une diminution de la production d'AMPC et induisant ainsi une réduction de l'activité de la protéine kinase A et de la phosphorylation de nombreuses protéines (Cooper et Londos, 1982 ; pour revue Polter et Li, 2010). La stimulation des récepteurs 5-HT_{1A} entraîne aussi une activation des canaux potassiques « GIRKs » (G-protein coupled inwardly-rectifying potassium) ce qui a pour conséquence une hyperpolarisation rapide du neurone et une inhibition de la décharge neuronale (Polter et Li, 2010). On peut aussi observer une diminution de l'influx calcique (Polter et Li, 2010 ; Cheng *et al.*, 1998).

En réalité, les mécanismes de transduction des récepteurs 5-HT_{1A} sont encore plus complexes et variables en fonction de la localisation des récepteurs. Ainsi, les

hétérorécepteurs sont capables d'inhiber l'adénylate cyclase, mais pas les autorécepteurs présents au niveau du raphé (Clarke *et al.*, 1996). De plus, ces autorécepteurs se montrent beaucoup plus sensibles à des processus de désensibilisation (Le Poul *et al.*, 2000 ; Mannoury la Cour *et al.*, 2001 ; Chaput *et al.*, 1986). Ces variations peuvent s'expliquer par un couplage à différentes isoformes de la sous-unité α de la protéine G selon les régions cérébrales. Une étude a ainsi montré que chez le rat, les autorécepteurs du raphé sont couplés exclusivement à la protéine $G_{\alpha i3}$, tandis que les récepteurs hippocampiques sont couplés préférentiellement à $G_{\alpha 0}$ et faiblement à $G_{\alpha i3}$. Au niveau cortical, les récepteurs sont couplés de manière comparable aux deux sous-types de protéines G, et dans l'hypothalamus, d'autres isoformes α sont également impliquées (Mannoury la Cour *et al.*, 2006). A noter que contrairement à l'inhibition de l'adénylate cyclase, l'activation des canaux GIRKs a lieu aussi bien dans le raphé (Bayliss *et al.*, 1997 ; Katayama *et al.*, 1997) que dans l'hippocampe (Oleskevich *et al.*, 1995), ce mécanisme impliquant les sous-unités bêta et gamma plutôt que de la sous unité alpha des protéines $G_{i/o}$ (Kovoor et Lester, 2002).

En plus de ces voies de transduction dites canoniques, les récepteurs 5-HT_{1A} régulent d'autres voies de signalisation, comme celles des facteurs de croissance MAPK (pour mitogen-activated protein kinases) et Akt (pour revue Polter et Li, 2010). Parmi les MAPK, ERK est particulièrement affectée (figure 12). Cette voie implique des récepteurs à la tyrosine kinase dont la stimulation active la GTPase Ras, qui elle-même active la protéine Raf1 pour aboutir par cascade à la phosphorylation et l'activation du facteur de croissance ERK 1/2, ce qui résulte en la modulation de l'activité de nombreux récepteurs et canaux, de la neuroplasticité et de l'expression de divers gènes (Samuels *et al.*, 2009 ; Sweatt, 2004). La modulation de la voie ERK par les récepteurs 5-HT_{1A} fait intervenir le couplage à la protéine $G_{i/o}$ (Garnovskaya *et al.*, 1996 ; Millan *et al.*, 2001) et varie selon la localisation des récepteurs, car dépend de leur densité et du sous-type de protéine G (Mendez *et al.*, 1999 ; Lin *et al.*, 2002). Ainsi, l'administration systémique d'agonistes 5-HT_{1A} induit une augmentation transitoire de la phosphorylation ERK dans l'hypothalamus, et une diminution dans l'hippocampe (Sullivan *et al.*, 2005 ; Buritova *et al.*, 2009 ; Newman-Tancredi *et al.*, 2009).

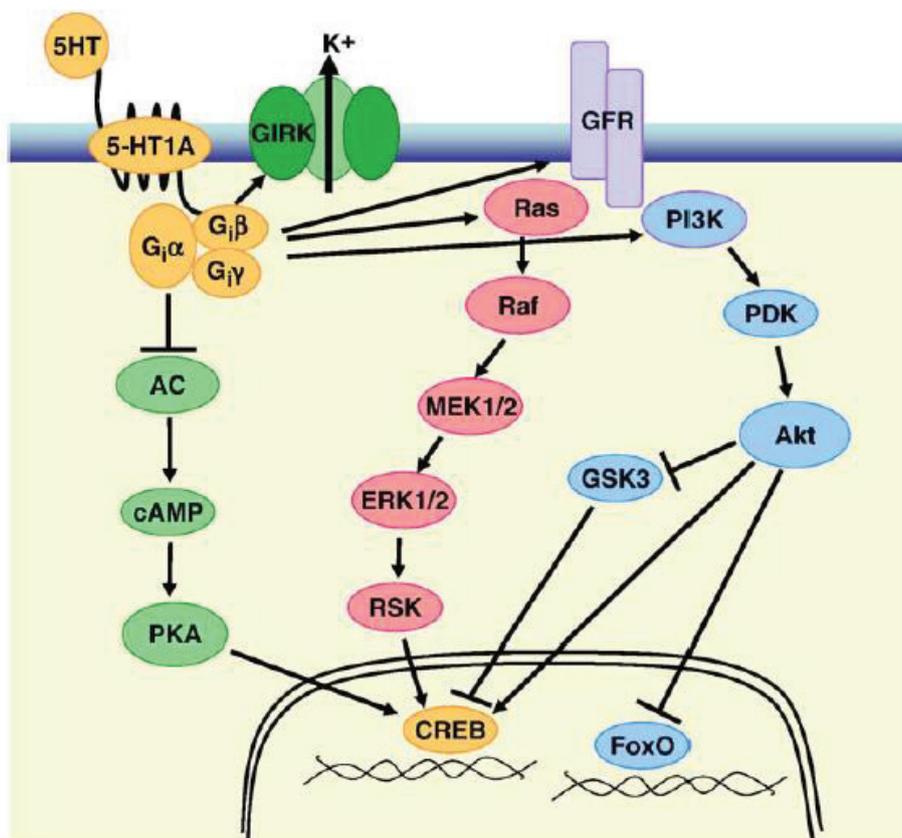


Figure 12 : Différentes voies de transduction du signal médiées par les récepteurs 5-HT_{1A} (Polter et Li, 2010). AC, adénylate cyclase ; AMP, adénosine monophosphate cyclique; GIRK, canaux « G protein-coupled inward rectifying potassium » ; GFR, récepteur de facteur de croissance; PKA, protéine kinase A; CREB, « cAMP response element binding protein »; MEK1/2, MAP et ERK kinase 1/2; ERK 1/2, « extracellulaire signal-régulée kinase ½ »; RSK, kinase ribosomale S6; PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase; PDK, kinase phosphoinositide-dépendante; GSK3, glycogène synthase kinase-3; FoxO, facteurs de transcription « forkhead box O. »

1.4.2 Implications physiopathologiques

Le rôle du récepteur 5-HT_{1A} a été très largement étudié tant chez des modèles animaux que chez l'homme. On a pu mettre en évidence son importance dans la régulation des processus comportementaux, cognitifs et mnésiques, ce qui en fait une cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement de désordres psychiatriques, neurodégénératifs ou neurodéveloppementaux, dont quelques exemples seront décrits ci-après.

1.4.2.1 Anxiété

L'implication du récepteur 5-HT_{1A} dans l'anxiété est connue depuis longtemps et supportée par de nombreuses études précliniques et cliniques (Akimova *et al.*, 2009). L'agoniste partiel buspirone est d'ailleurs utilisé en clinique comme anxiolytique. Les souris knock-out (KO) pour les récepteurs 5-HT_{1A} présentent une anxiété accrue dans différents tests comportementaux (Heisler *et al.*, 1998 ; Parks *et al.*, 1998). A l'inverse, une surexpression du récepteur est associée à une réduction des symptômes d'anxiété dans un modèle de souris transgénique (Kusserow *et al.*, 2004). Les récepteurs postsynaptiques des aires limbiques (hippocampe, amygdale, septum latéral) semblent cruciaux dans la régulation de l'anxiété. L'hippocampe et l'amygdale constituent un centre de contrôle des fonctions psycho-émotionnelles, tandis que le septum latéral assure le relais jusqu'à l'hypothalamus, déclenchant une réponse du système nerveux autonome (Lacivita *et al.*, 2012). Le cortex préfrontal est également impliqué, avec un effet bénéfique de l'activation des récepteurs présents sur les neurones pyramidaux et un effet délétère de l'activation des récepteurs présents sur les interneurons GABAergiques induisant une stimulation indirecte des neurones pyramidaux (Albert *et al.*, 2014). L'implication des autorécepteurs est moins claire : l'expression des 5-HT_{1A} dans l'hippocampe et le cortex, mais pas dans les noyaux du raphé, est suffisante pour restaurer le phénotype normal chez la souris KO (Gross *et al.*, 2002).

1.4.2.2 Dépression

Similairement, de nombreuses données supportent l'implication des récepteurs 5-HT_{1A} dans la dépression. Chez un modèle de souris avec une surexpression des autorécepteurs de 30%, il y a une diminution de la libération de sérotonine accompagnée d'une augmentation du comportement caractéristique de la dépression (Richardson-Jones *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'implication directe de ces autorécepteurs dans la réponse antidépressive est bien connue : en administration aigüe, les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (ISRS) provoquent une libération accrue de sérotonine, mais cet effet est neutralisé par un rétrocontrôle négatif exercé via ces autorécepteurs (Altieri *et al.*, 2013 ; Sharp *et al.*, 2007). Un traitement chronique supérieur à 3 semaines est réputé nécessaire pour une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A}, permettant ainsi une augmentation

du taux de décharge des neurones et une libération de sérotonine suffisante en corrélation avec les améliorations cliniques (Albert et Lemonde, 2004). Les agonistes 5-HT_{1A} partiels comme la buspirone et la gespirone présentent des propriétés antidépressives, possiblement en favorisant la désensibilisation des autorécepteurs (Kishi *et al.*, 2014). De plus, les souris KO pour les récepteurs 5-HT_{1A} ne répondent pas au traitement à la fluoxétine, suggérant une mise en jeu des récepteurs postsynaptiques dans la réponse thérapeutique aux ISRS (Santarelli *et al.*, 2003). Ces données sont supportées par l'action antidépressive du F15599, un agoniste très spécifique des récepteurs 5-HT_{1A} mais ciblant préférentiellement les hétérorécepteurs (Newman-Tancredi, 2011), dont nous décrivons plus en détail les propriétés. Par ailleurs, plusieurs études d'imagerie se sont intéressées à la proportion de récepteurs 5-HT_{1A} chez les dépressifs en imagerie de tomographie par émission de positons (TEP) ou en autoradiographie postmortem. Les résultats dans leur globalité sont en faveur de modifications des récepteurs au cours de la pathologie, mais présentent des discordances concernant le niveau d'altération et les régions atteintes (Shrestha *et al.*, 2012 ; Savitz *et al.*, 2009).

1.4.2.3 Schizophrénie

Le rôle du récepteur 5-HT_{1A} dans la physiopathologie de la schizophrénie a été suggéré par des études postmortem qui ont montré une augmentation de la densité de récepteurs dans le cortex préfrontal et d'autres régions corticales (Burnet *et al.*, 1996). Cette hyperdensité de récepteurs 5-HT_{1A} est retrouvée dans des modèles animaux de schizophrénie (Wedzony *et al.*, 1997). De plus, il est postulé que la schizophrénie est due en partie à un déséquilibre de la transmission dopaminergique, avec des symptômes positifs (délires, hallucinations) provoqués par une hyperactivité de la voie mésolimbique, et des symptômes négatifs (désordres comportementaux, atteinte cognitive) imputés à une hypoactivité de la voie mésocorticale (Toda et Abi-Dargham, 2007). La libération de dopamine induite par la stimulation des récepteurs 5-HT_{1A} dans le cortex préfrontal pourrait permettre d'améliorer les symptômes négatifs (Newman Tancredi, 2010). Il a aussi été suggéré que les agonistes 5-HT_{1A} sont capables de diminuer l'incidence des symptômes extrapyramidaux induits par le blocage des récepteurs dopaminergiques D2 par les antipsychotiques utilisés en clinique (Newman-Tancredi et Kleven, 2011). Certains

antipsychotiques atypiques possédant des propriétés d'agonistes partiels 5-HT_{1A} en plus d'être des antagonistes D2 (comme l'aripiprazole ou la cariprazine) semblent en effet apporter des bénéfices thérapeutiques, notamment vis-à-vis des déficits cognitifs, et une réduction des syndrômes extrapyramidaux comparé aux antipsychotiques sans composante 5-HT_{1A} (Newman-Tancredi, 2010).

1.4.2.4 Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par des troubles cognitifs et une atteinte importante des systèmes de neurotransmission. Les déficits cognitifs précoces observés au cours de la pathologie concernent notamment la mémoire épisodique et sont accompagnés de la présence de neurofibrilles dans l'hippocampe (Dubois *et al.*, 2007), structure où les récepteurs 5-HT_{1A} sont présents en très forte densité et impliqués directement dans la mise en place de la mémoire épisodique (Sarnyai *et al.*, 2000). Une étude en imagerie TEP *in vivo* effectuée à Lyon a montré une surexpression des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'hippocampe à un stade précoce de la maladie (MCI pour Mild Cognitive Impairment) et une réduction de la densité de ces mêmes récepteurs à des stades plus avancés (voir figure 13 - Truchot *et al.*, 2007). Ce récepteur apparaît donc comme une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la maladie. Le lecozotan, un antagoniste 5-HT_{1A}, est capable d'augmenter la libération de glutamate et d'acétylcholine dans l'hippocampe et a été proposé comme traitement des troubles cognitifs chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Schechter *et al.*, 2005). L'utilisation d'agonistes a aussi été suggérée pour traiter les symptômes comportementaux et psychotiques associés aux démences (Sato *et al.*, 2007). Les mécanismes précis entre cognition et 5-HT_{1A} restent toutefois à élucider et les différences de résultats en fonction des molécules semblent impliquer différentes sous-populations de récepteurs : la buspirone, agoniste partiel 5-HT_{1A}, provoque une baisse des performances mnésiques, tandis que la tandospirone semble améliorer les performances (Meneses, 2015), de même que le F15599, agoniste entier mais préférentiellement postsynaptique (Depoortere *et al.*, 2010). La neurogénèse dans le gyrus denté est stimulée par l'activation 5-HT_{1A}, ce qui pourrait expliquer les effets promnésiques rapportés pour certains agonistes (Santarelli *et al.*, 2003 ; Schreiber et Newman-Tancredi, 2014).

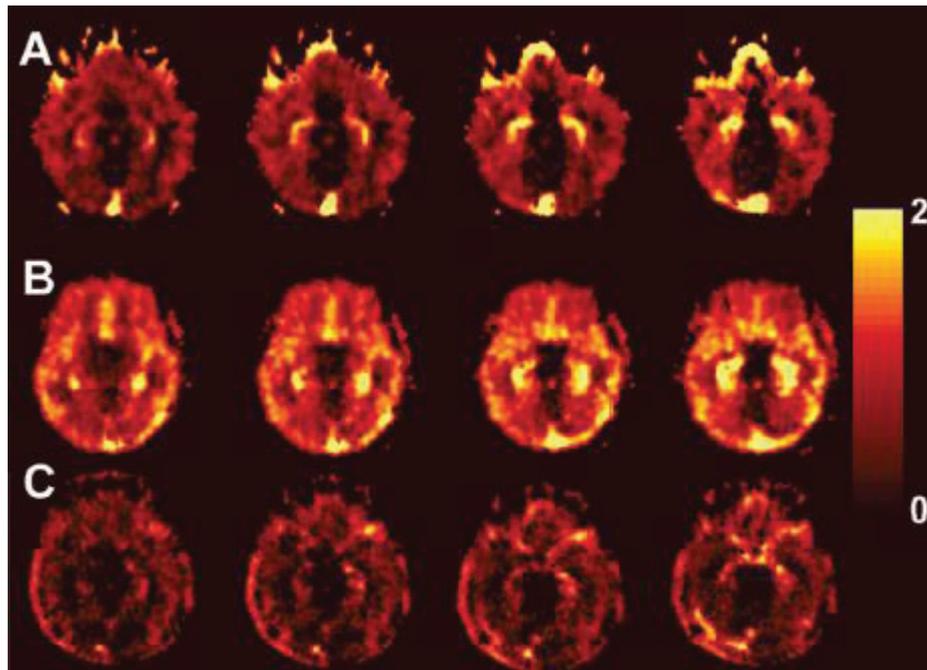


Figure 13 : Evolution des récepteurs 5-HT_{1A} au cours de la maladie d'Alzheimer en imagerie TEP avec le radiotracer [¹⁸F]MPPF (Truchot *et al.*, 2007). A : Patient contrôle ; B : Patient au stade MCI ; C : Patient à un stade avancé de la MA.

1.4.2.5 Maladie de Parkinson

L'intérêt thérapeutique des récepteurs 5-HT_{1A} dans le traitement de la maladie de Parkinson est de découverte plus récente (Shimizu et Ohno, 2013). L'administration d'agonistes 5-HT_{1A} améliore les symptômes moteurs extrapyramidaux induits expérimentalement chez l'animal par une dénervation dopaminergique ou une déplétion de la dopamine cérébrale (Ishibashi et Ohno, 2004 ; Dupre *et al.*, 2008). Dans le modèle du rat ayant subi une hémilésion du système dopaminergique par l'administration de 6-hydroxydopamine, les agonistes provoquent un comportement de rotation controlatérale (Ilderberg *et al.*, 2015a). Comme décrit précédemment, ils peuvent aussi atténuer les symptômes extrapyramidaux induits par le déficit de stimulation des récepteurs D2 (Newman-Tancredi et Kleven, 2011). L'injection bilatérale de 8-OH-DPAT dans le cortex et le striatum diminue significativement la catalepsie induite par les antagonistes D2 chez le rat, suggérant un effet thérapeutique médié en partie par les récepteurs postsynaptiques dans le cortex et le striatum (Shimizu *et al.*, 2010). De plus, le principal traitement utilisé pour traiter la maladie consiste à administrer de la L-DOPA pour compenser la perte de dopamine cérébrale. A long terme, ce traitement induit de sérieux effets secondaires dyskinésiques

(LIDs) dont la prévalence est estimée entre 30 et 80% (Fabbrini *et al.*, 2007). Plusieurs arguments précliniques et cliniques suggèrent que les terminaisons sérotoninergiques projetant au niveau du striatum contribuent à la physiopathologie des LIDs, en convertissant la L-DOPA en dopamine et en la libérant de manière anarchique (Bishop *et al.*, 2009 ; Politis *et al.*, 2014). Chez les animaux traités de manière chronique par L-DOPA, les agonistes 5-HT_{1A} inhibent efficacement les dyskinésies (Tomiya *et al.*, 2005 ; Iderberg *et al.*, 2015a ; Iderberg *et al.*, 2015b).

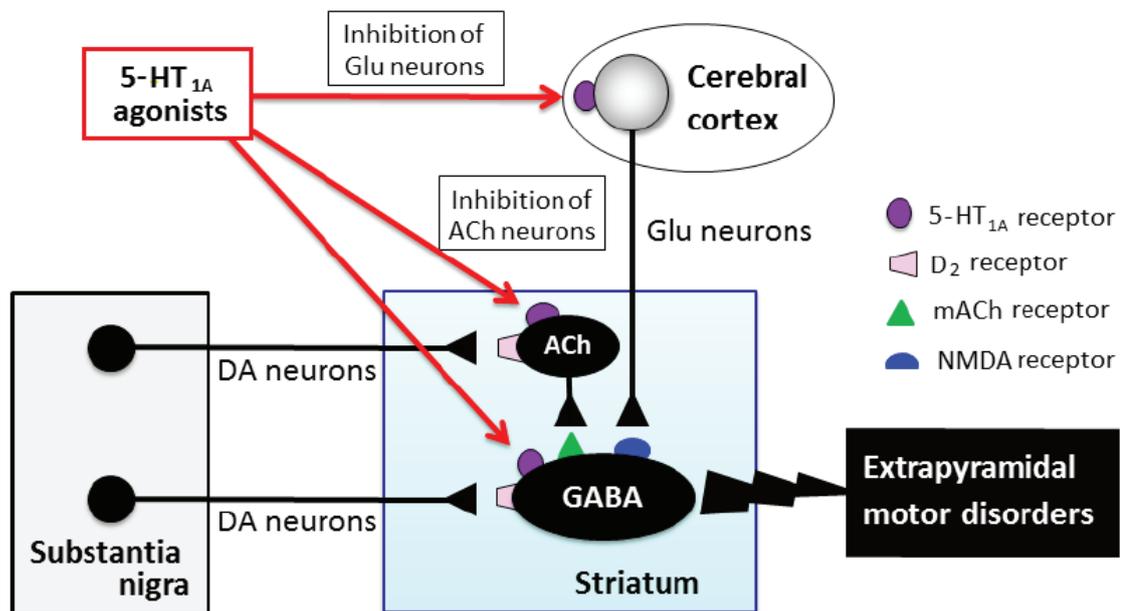


Figure 14 : Mécanismes responsables de l'activité antiparkinsonienne des agonistes 5-HT_{1A} (Shimizu et Ohno, 2013).

1.4.2.6 Troubles respiratoires

Le tronc cérébral possède un rôle crucial dans le maintien des fonctions cardiovasculaire et respiratoire, notamment par des mécanismes impliquant le système sérotoninergique (voir figure 15 - pour revue, Kinney *et al.*, 2009). De nombreuses études montrent une sensibilité des neurones 5-HT médullaires aux variations de pH et de pCO₂ artériel (Richerson, 2004 ; Corcoran *et al.*, 2009). Des études postmortem ont rapporté une altération de plusieurs populations d'autorécepteurs et d'hétérorécepteurs 5-HT_{1A} du tronc cérébral dans le syndrome de mort subite du nourrisson (Paterson *et al.*, 2006, Duncan *et al.*,

2010), qui impliqueraient une incapacité du tronc à maintenir l'homéostasie face à une hypoxie ou une hypercapnie (Kinney *et al.*, 2009). L'administration d'agonistes 5-HT_{1A} est capable de lever la dépression respiratoire induite par des opioïdes (Dutschmann *et al.*, 2009 ; Ren *et al.*, 2015) et peut améliorer fortement les désordres respiratoires observés chez un modèle de souris transgénique du syndrome de Rett (Abdala *et al.*, 2010 ; Levitt *et al.*, 2013). Le syndrome de Rett est une pathologie neurologique provoquée par une anomalie du gène MEPC2 situé sur le chromosome X (Roux et Villard, 2010). Cette maladie rare touche environ une femme sur 10000 et se caractérise par un développement normal jusqu'à l'âge de 6 à 18 mois, où l'on voit apparaître des signes de retards psychomoteurs sévères avec gestes stéréotypés, troubles du sommeil, troubles cognitifs et comportementaux. Des difficultés respiratoires très invalidantes se manifestant par des hyperventilations et des apnées s'observent également dans la plupart des cas (Nomura, 2001). Les récepteurs 5-HT_{1A} constituent donc une cible thérapeutique potentielle dans cette pathologie, et l'administration d'agonistes pourrait aussi permettre d'améliorer les symptômes cognitifs et les troubles du sommeil (Abdala *et al.*, 2014).

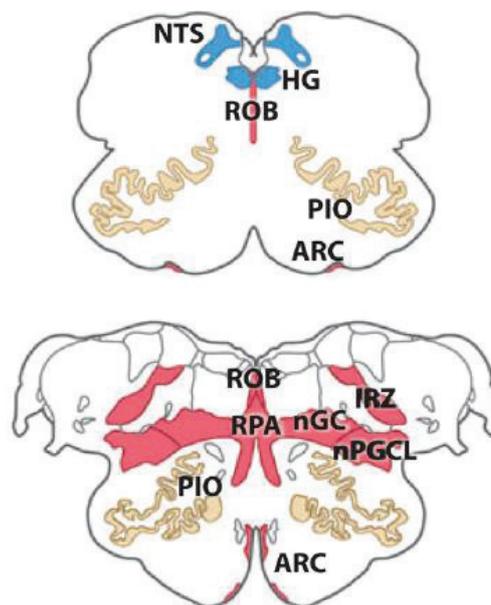


Figure 15 : Diagrammes montrant la distribution du système sérotoninergique du tronc cérébral (Kinney *et al.*, 2009). Les noyaux en rouge représentent les sites contenant des corps cellulaires sérotoninergiques, correspondant au raphé et à d'autres régions ventrales et extra-raphé. Le noyau du tractus solitaire et le noyau hypoglossal sont représentés en bleu et correspondent aux sites de projections sérotoninergiques médullaires. Abréviations : ARC, noyau arqué ; IRZ, zone réticulaire intermédiaire ; nGC, noyau gigantocellulaire ; nPGCL, noyau paragigantocellulaire ; ROB, raphé obscurus ; RPA, raphé pallidus.

II – Apports de l'imagerie *in vivo* pour l'exploration du système sérotoninergique

2.1 La tomographie par émission de positons (TEP)

2.1.1 Généralités

La tomographie par émission de positons ou TEP est une technique d'imagerie fonctionnelle permettant de suivre des processus physiologiques à l'échelle moléculaire, grâce à l'injection d'une molécule marquée par un isotope radioactif émetteur de positons (ou « radiotracer »). La TEP permet d'accéder à des mesures quantitatives et dynamiques de paramètres biochimiques *in vivo*. La cancérologie constitue le principal domaine d'application de l'imagerie TEP, mais c'est également une technique d'un grand intérêt en neuroimagerie. La TEP est une technique non invasive, qui présente donc l'avantage d'être une technique translationnelle utilisable du rongeur à l'humain, et qui permet de suivre des processus physiopathologiques ou l'effet d'un traitement chronique au cours d'études longitudinales (Lancelot et Zimmer, 2010 ; Zimmer et Luxen, 2012).

2.1.2 Principes physiques et instrumentaux

Les émetteurs de positons sont des éléments instables caractérisés par un excès de charges positives dans leur noyau. Ils se désintègrent spontanément vers un état stable par la transformation d'un proton en neutron, entraînant l'émission d'un positon (e^+) et d'un neutrino. Ce phénomène est appelé désintégration β^+ . Les principaux radioéléments β^+ utilisés en TEP sont le carbone 11 (^{11}C), le fluor 18 (^{18}F), l'azote 13 (^{13}N) et l'oxygène 15 (^{15}O). Une caractéristique avantageuse du ^{18}F est la durée de sa demi-vie (110 minutes, contre 20 minutes pour le ^{11}C), qui permet son utilisation sur un site distant du site de production.

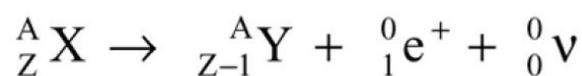


Figure 16 : Réaction nucléaire de désintégration de type β^+ .

Lorsqu'il est incorporé dans une matière organique, le positon émis par désintégration radioactive parcourt une distance de l'ordre du millimètre et s'annihile en interagissant avec un électron de la matière pour émettre deux photons gamma de 511 KeV à 180°. Ces photons sont détectés simultanément par deux détecteurs opposés de la caméra TEP (figure 17). Celle-ci est constituée d'une couronne de cristaux scintillateurs permettant l'interception des photons gamma et leur conversion en photons lumineux beaucoup moins énergétiques. Ces cristaux sont couplés à amplificateurs de lumière (photomultiplicateur, photodiode à avalanche ou photomultiplicateur semi-conducteur) permettant l'amplification du signal et la transformation en énergie électrique. L'enregistrement de ces paires de photons provenant de la même annihilation sur une ligne reliant deux détecteurs constitue le signal brut de la TEP, stocké de manière matricielle sous forme de sinogrammes ou en mode liste par ordre d'arrivée. La constitution de l'image quantitative 3D de la distribution de la radioactivité dans l'organisme s'effectue par reconstruction tomographique.

Il faut noter que l'imagerie TEP apporte des informations à l'échelle moléculaire mais ne permet pas (ou peu) le repérage anatomique des zones fortement concentrées en radioactivité. Pour cette raison, entre autres, les caméras TEP peuvent être couplées à des techniques d'imagerie apportant des informations anatomiques, comme le tomodensitomètre à rayons X (scanner), constituant la TEP/TDM (ou PET/CT pour Positron Emission Tomography/Computed Tomography). Plus récemment des appareils de TEP ont été couplés à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), en un seul appareil (IRM-TEP).

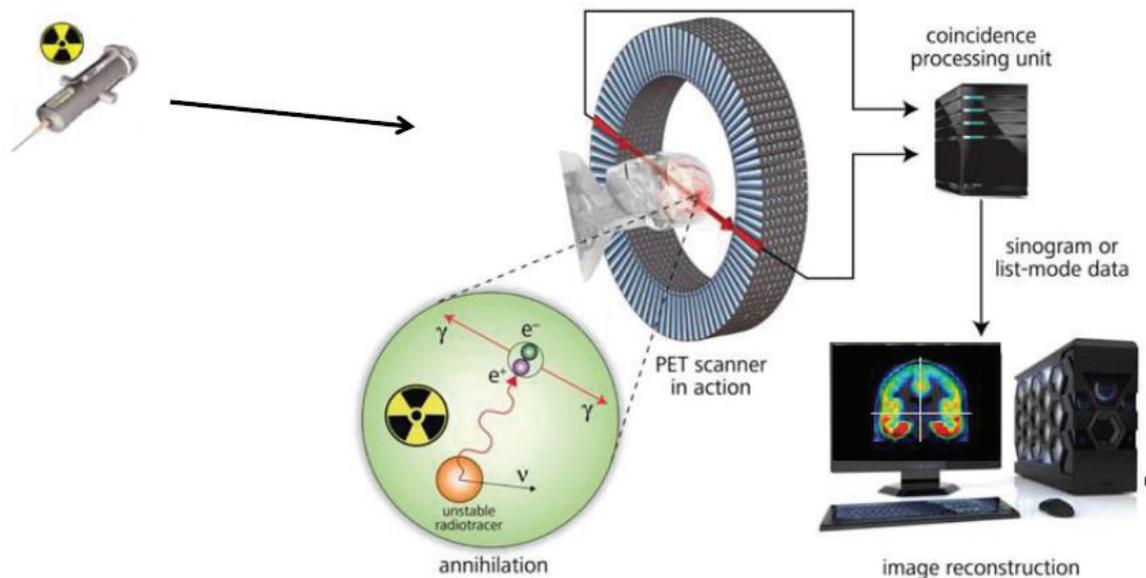


Figure 17 : Principe d'une acquisition TEP

(d'après <http://www.sepscience.com/Sectors/Pharma/Articles/429-/Radio-IC-for-Quality-Control-in-PET-Diagnostics>)

2.1.3 Radiosynthèse

La synthèse du radiotracer requiert au préalable de disposer d'un précurseur. Il s'agit d'une molécule dont la structure est proche de celle du traceur, sur laquelle est présent un groupement substituable par l'élément radioactif.

La première étape de la radiosynthèse à proprement parler est la production de l'isotope d'intérêt. On utilise pour cela un accélérateur de particules de type cyclotron, qui fonctionne grâce à l'action combinée d'un champ électrique et d'un champ magnétique. Les particules sont des ions H^- provenant de gaz d'hydrogène saturé en électron. Confinés dans un espace restreint sous l'influence du champ magnétique, les ions suivent une trajectoire en spirale et sont accélérés par le champ électrique alternatif. Le faisceau d'ions hydrures traverse ensuite une fine couche de carbone, qui arrache les électrons pour produire des protons H^+ . L'irradiation d'une cible par les protons ainsi accélérés permet l'obtention du radioisotope.

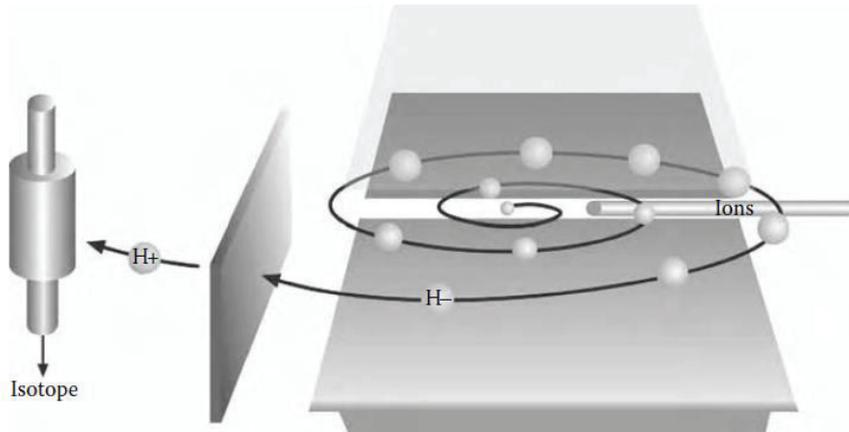


Figure 18 : Principe de fonctionnement d'un cyclotron (*Radiotracers in Drug Development, Lappin et Temple, 2006*)

L'isotope radioactif est ensuite transféré, via des tubulures blindées et sous flux d'azote, dans un « automate » assurant la radiosynthèse par des réactions chimiques simples et rapides permettant l'obtention du radiotraceur à partir du radioisotope et du précurseur.

A la fin de la radiosynthèse, le produit est purifié puis un contrôle de qualité pharmaceutique est assuré essentiellement par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) afin de s'assurer de la bonne pureté chimique et radiochimique du traceur (absence de précurseur, de solvants résiduels ou de sous-produits radioactifs de non intérêt). L'activité spécifique (activité radioactive par quantité de molécules) doit être assez élevée pour une injection à dose dite « traceuse », c'est-à-dire que pour une dose radioactive donnée (quelques centaines de mégabecquerels) la masse injectée doit être faible (quelques nanogrammes) pour permettre une visualisation de la cible d'intérêt sans induire d'effet pharmacologique (Passchier *et al.*, 2002). Il est à noter que ce radiotraceur prend le statut de médicament lorsqu'il est injecté à l'homme (radiopharmaceutique), avec des niveaux élevés d'exigence et de contrôle pharmaceutique pour assurer la stérilité et l'absence d'endotoxines.

La radiochimie doit tenir compte de plusieurs contraintes, à savoir la nature de la molécule produite par le cyclotron (dioxyde de carbone pour le ^{11}C et ion fluorure pour le ^{18}F), la demi-vie courte des radioisotopes (le temps de synthèse ne doit pas dépasser une heure pour le ^{11}C et 4 heures pour le ^{18}F), l'activité spécifique élevée nécessaire pour l'imagerie TEP (nécessitant d'éviter toute dilution avec des molécules non radiomarquées) et la toxicité de nombreux réactifs classiques en chimie organique (Zimmer et Luxen, 2012). Les stratégies de radiomarquage sont donc restreintes. Pour le fluor 18, on utilise souvent des dérivés aliphatiques ou aromatiques pour réaliser une substitution nucléophile.

2.1.4 Applications pour l'étude de la neurotransmission sérotoninergique

Depuis le début des années 1980, le développement de centaines de radiotraceurs cérébraux a grandement contribué à la compréhension du cerveau et des pathologies psychiatriques ou neurologiques. L'imagerie TEP a notamment été utilisée pour évaluer indirectement l'activité neuronale en mesurant la consommation de glucose grâce à l'analogue fluoré [^{18}F]FDG, au cours de l'épilepsie et de pathologies neurodégénératives (Zimmer et Luxen, 2012 ; Herholz, 2010). Mais la plupart des radiotraceurs cérébraux sont des ligands spécifiques de protéines, notamment d'enzymes, de transporteurs et de récepteurs de neurotransmetteurs comme la dopamine, l'acétylcholine ou la sérotonine (Zimmer et Luxen, 2012 ; voir aussi la base de données MICAD pour « Molecular Imaging and Contrast Agent Database »). Cette section sera dédiée à illustrer les exemples d'application de la TEP pour l'étude du système sérotoninergique.

De nombreux radiotraceurs spécifiques ont été développés pour l'imagerie des récepteurs à la sérotonine, dont quelques-uns ont été validés chez l'homme et sont détaillés ci-après (Zimmer et le Bars, 2013 ; Kumar et Mann, 2014 ; Paterson *et al.*, 2014). On peut noter que parmi la diversité de récepteurs existants, plusieurs sous-types ne disposent pas encore de radiotraceur spécifique. En plus des récepteurs sérotoninergiques, des radiotraceurs spécifiques du transporteur SERT ont été développés, comme le [^{11}C]DASB. Deux traceurs permettent aussi de mesurer la synthèse de sérotonine, les analogues du tryptophane [^{11}C]AMT et [^{11}C]HTP (Visser *et al.*, 2011).

Tableau 2. Radiopharmaceutiques TEP validés pour l'imagerie du système sérotoninergique, indiquant le nombre d'études réalisées chez l'animal et chez l'humain, et le nombre d'institutions de recherche utilisant chaque traceur (d'après Paterson *et al.*, 2014).

Target	Radioligand	First in man	Animal studies	Human studies	Research institutions
5-HT _{1A}	[¹¹ C]WAY-100635	1995	10	80	12
	[¹⁸ F]MPPF	2000	27	21	6
	[¹⁸ F]FCWAY	2000	7	11	1
	[¹¹ C]CUMI-101	2008 ^a	2	1 ^a	1
5-HT _{1B}	[¹¹ C]AZ10419369	2008	3	1	1
	[¹¹ C]P943	2009	1	3	1
5-HT _{2A}	[¹⁸ F]setoperone ^b	1990	3	36	7
	[¹⁸ F]altanserine	1994	5	51	10
	[¹⁸ F]deuteroaltanserine	1998	2 ^a	5 ^a	1
	[¹¹ C]MDL100907	1998	5	6	5
5-HT ₄	[¹¹ C]SB207145	2008	3 ^a	3 ^a	2
5-HT ₆	[¹¹ C]GSK215083	2008	1	2	1
SERT	[¹¹ C]DASB	2000	17	48	16
	[¹¹ C]MADAM	2005	1	7	2
5-HT synthesis	[¹¹ C]-AMT	1997	2 ^c	17 ^d	2
	[¹¹ C]-HTP	1991	4	10	3

Ces différents traceurs ont permis d'établir la cartographie de récepteurs sérotoninergiques *in vivo* chez le sujet sain (pour revue Paterson *et al.*, 2014 ; Savli *et al.*, 2012 ; Saulin *et al.*, 2012). De nombreuses études se sont aussi intéressées aux variations de densité de récepteurs et du transporteur au cours de troubles psychiatriques et comportementaux (Lin *et al.*, 2014 ; Spies *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2016 ; Selvaraj *et al.*, 2014, Drevets *et al.*, 2007) ainsi qu'au cours de pathologies neurodégénératives (Politis et Niccolini, 2015 ; Truchot *et al.*, 2007 ; Marner *et al.*, 2012 ; Madsen *et al.*, 2011).

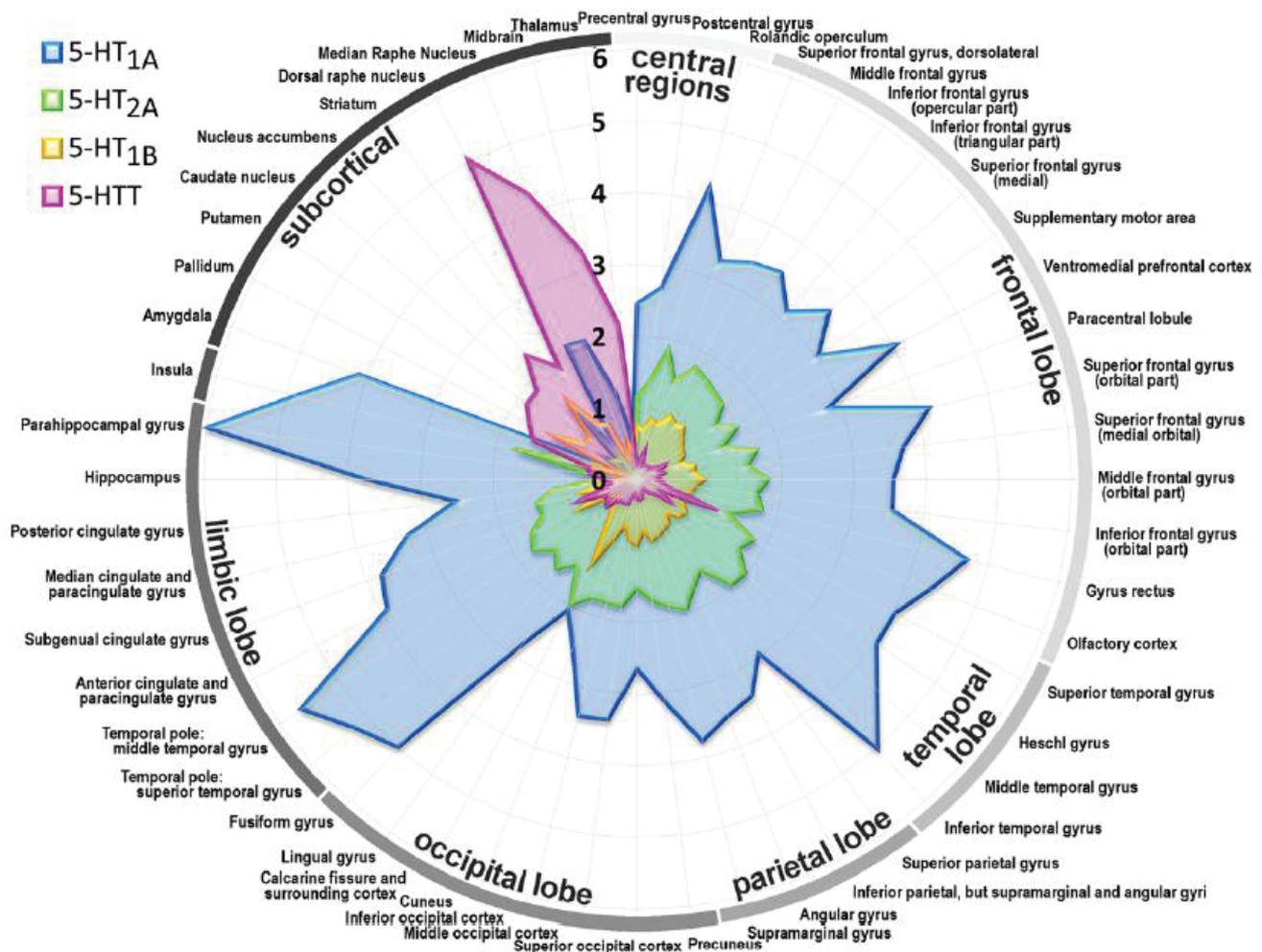


Figure 19 : Base de données normative établie chez 95 sujets sains en TEP, illustrant les différentes topologies des récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} et du transporteur 5-HTT dans le cerveau humain (Savli et al., 2012). Les valeurs sont rapportées en potentiel de liaison (BP).

Outre ces applications, on s'est également intéressé à utiliser les radioligands sérotoninergiques pour mesurer la libération de sérotonine endogène (pour revue Paterson et al., 2010 ; Tyacke et Nutt, 2015). En effet, d'après le modèle classique de compétition en pharmacologie (figure 20), le nombre de récepteurs spécifiques occupés par le neurotransmetteur endogène augmente avec sa concentration locale, ce qui résulte en un nombre réduit de récepteurs disponibles pour un radioligand affin pour le même récepteur que le neurotransmetteur endogène (Laruelle, 2000 ; Ginovart, 2005 ; Paterson et al., 2010). Ce type d'approche a été utilisé avec succès pour l'étude du fonctionnement du système dopaminergique au cours de pathologies (addictions, schizophrénie...) en combinant des radiotraceurs comme le [¹¹C]raclopride ou le [¹¹C]PHNO et des challenges pharmacologiques

pour augmenter la libération de dopamine (pour revues Volkow *et al.*, 2009 ; Finnema *et al.*, 2015 ; Egerton *et al.*, 2009). Même des variations subtiles et physiologiques de dopamine endogène sont potentiellement mesurables (Egerton *et al.*, 2009).

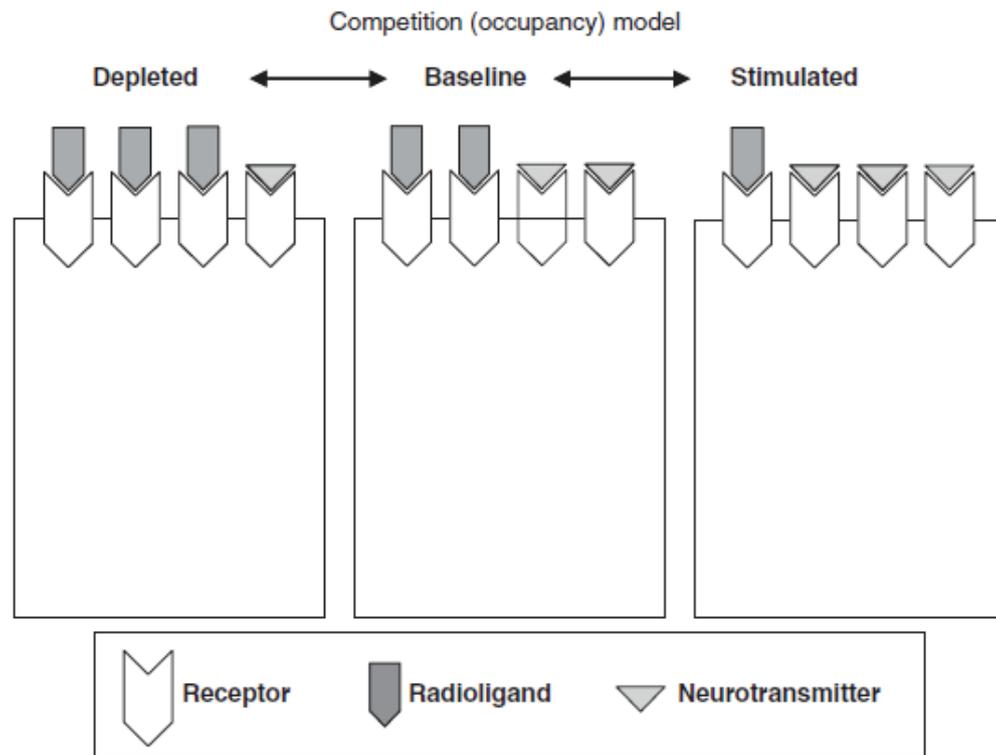


Figure 20 : Représentation schématique du modèle de compétition (Paterson *et al.*, 2010, d'après Laruelle, 2000). Si deux ligands ayant une affinité pour le même récepteur sont présents simultanément dans la synapse (comme un neurotransmetteur endogène et un radiotracteur), ces deux ligands sont en compétition pour occuper la même cible moléculaire. En conditions basales, un équilibre est atteint. En conditions de challenge, les niveaux synaptiques de neurotransmetteur sont augmentés, moins de récepteurs sont disponibles pour le radioligand, résultant en une diminution du potentiel de liaison (BP). A l'inverse, plus de récepteurs sont disponibles pour le radioligand en cas de déplétion de neurotransmetteur endogène.

Malheureusement, étendre cette approche à l'étude du système sérotoninergique s'est révélé plus difficile et parmi les radioligands testés, peu se sont montrés sensibles à des fluctuations de libération de sérotonine de manière aussi avérée (Paterson *et al.*, 2010). Ces difficultés s'expliquent possiblement par un taux d'occupation de récepteurs basal bien plus

réduit pour la sérotonine que pour la dopamine. Certains radiotraceurs présentent toutefois des propriétés encourageantes, comme le [¹¹C]Cimbi-36, la [¹⁸F]altansérine ou le [¹¹C]AZ10419369 (Paterson *et al.*, 2010 ; Finnema *et al.*, 2015).

Le développement de radioligands spécifiques de récepteurs cérébraux permet aussi la quantification du taux d'occupation de récepteurs par une molécule exogène comme un médicament, basé sur le même modèle de compétition classique (Laruelle, 2000). Ce type d'études permet de connaître le taux d'occupation d'une cible à atteindre pour optimiser les effets thérapeutiques et réduire les effets indésirables et, ainsi, d'adapter la posologie pour atteindre ce taux d'occupation optimal. Dans le cadre du système sérotoninergique, cette approche a été utilisée pour mesurer le taux d'occupation du SERT par des ISRS nécessaire pour atteindre l'effet antidépresseur (Meyer, 2007), ou encore le taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{2A} par des antipsychotiques atypiques (Seeman, 2002).

2.1.5 L'imagerie TEP des récepteurs 5-HT_{1A}

Il existe actuellement un certain nombre de radiotraceurs spécifiques des récepteurs 5-HT_{1A} utilisables en imagerie TEP. Les radiotraceurs antagonistes 5-HT_{1A} ayant été évalués chez l'homme seront décrits ci-après.

[¹¹C]WAY-100635

Le WAY-100635 est un antagoniste qui possède une affinité subnanomolaire pour les récepteurs 5-HT_{1A}, avec un K_d de 0,2 nM (Fletcher *et al.*, 1996). La spécificité de la molécule est élevée par rapport aux autres récepteurs sérotoninergiques. Elle présente toutefois une affinité notable pour les récepteurs D4 (Chemel *et al.*, 2006), mais compte tenu de la faible densité de ces récepteurs comparée à celle des récepteurs 5-HT_{1A}, les conséquences de cette composante D4 sont minimales. Des autoradiographies *in vitro* avec la molécule initialement radiomarquée au tritium ont montré une distribution comparable à la distribution connue des récepteurs (Gozlan *et al.*, 1995). Les premières études TEP ont été réalisées avec le [O-méthyl-¹¹C]WAY-100635, qui présentait l'inconvénient de produire un métabolite radioactif assez lipophile pour passer la BHE et augmenter le marquage non spécifique (Osman *et al.*, 1996). Le radiomarquage au niveau du groupement carbonyle s'est avéré plus convaincant, les radiométabolites du [carbonyl-¹¹C]WAY-100635 ne traversant pas la barrière hémato

encéphalique (Pike *et al.*, 1996). Aujourd'hui, il constitue le radioligand 5-HT_{1A} le plus utilisé en TEP, avec de nombreuses études chez l'humain au cours de troubles neurologiques ou psychiatriques (Borg, 2008 ; Passchier et van Waarde, 2001). Il possède toutefois l'inconvénient d'être rapidement métabolisé dans le plasma (Zimmer et Le Bars, 2013). De plus, il ne permet pas de détecter des fluctuations du taux de sérotonine cérébral et se montre peu sensible à la compétition avec des agonistes à doses cliniquement active, limitant son intérêt pour ce type d'applications (Passchier et van Waarde, 2001 ; Paterson *et al.*, 2010 ; Bantick *et al.*, 2004b).

[carbonyl-¹¹C]DWAY

Le desméthyl-WAY (DWAY) est un métabolite du WAY-100635. Le [carbonyl-¹¹C]DWAY montre des caractéristiques radiopharmacologiques similaires à celles du [carbonyl-¹¹C]WAY-100635 avec une meilleure intensité du signal radioactif à doses égales (Andree *et al.*, 2002). Toutefois, son utilisation est restée très limitée, probablement à cause d'une radiosynthèse plus complexe que celle du [¹¹C]WAY-100635.

[¹⁸F]MPPF

Le MPPF est un antagoniste présentant une bonne affinité et sélectivité pour les récepteurs 5-HT_{1A}, avec un K_d de 0,34 nM (Kung *et al.*, 1996). La molécule radiomarquée au fluor 18 s'est avérée être un radioligand 5-HT_{1A} prometteur pour l'imagerie TEP (Shiue *et al.*, 1997). La procédure de radiomarquage fut optimisée en une seule étape, facile à automatiser et présentant un bon rendement et une activité spécifique élevée (Le Bars *et al.*, 1998). Chez le rat, le chat, le primate non humain et l'humain, la fixation du [¹⁸F]MPPF est réversible et spécifique, et il est possible d'utiliser le cervelet comme région de référence pour quantifier les paramètres de fixation (pour revue Aznavour et Zimmer, 2007 ; Costes *et al.*, 2005). Des études cliniques ont été réalisées avec le [¹⁸F]MPPF chez des patients souffrant d'épilepsies, de migraines, de la maladie d'Alzheimer ou de la maladie de Parkinson (Truchot *et al.*, 2007 ; Merlet *et al.*, 2004 ; Demarquay *et al.*, 2011 ; Ballanger *et al.*, 2012). Des études chez le rongeur ont suggéré une sensibilité du [¹⁸F]MPPF à des augmentations importantes de concentration extracellulaire de sérotonine (Zimmer *et al.*, 2002b). Toutefois, cette observation n'a pas été confirmée avec des variations plus modestes et chez le singe rhésus et l'humain (Udo de Haes *et al.*, 2005 ; Udo de Haes *et al.*,

2006 ; Praschak-Rieder *et al.*, 2004). Le [^{18}F]MPPF est un substrat de la P-gp, ce qui limite sa concentration cérébrale, notamment chez le rat (Lacan *et al.*, 2008).

[^{18}F]FCWAY

Des analogues fluorés du WAY-100635 ont été développés dans le but d'accéder à des radiotraceurs similaires au [^{11}C]WAY-100635 avec une demi-vie plus longue (Lang *et al.*, 1999). Parmi ces dérivés, le [^{18}F]4-trans-FCWAY possède les propriétés les plus intéressantes, avec une haute affinité ($K_i=0,25$ nM) et un très bon ratio de fixation hippocampe/cervelet. Ce traceur a été utilisé pour quantifier les récepteurs 5-HT $_{1A}$ chez les patients épileptiques ou souffrants de troubles paniques (Liew *et al.*, 2009 ; Neumeister *et al.*, 2004). Il présente toutefois l'inconvénient de subir une défluorination du ^{18}F *in vivo* par le cytochrome P450 2E1 (Tiptre *et al.*, 2006).

Vers un radiotraceur agoniste des récepteurs 5-HT $_{1A}$?

Similairement à d'autres récepteurs métabotropiques comme les récepteurs D2, on a suggéré à partir d'observations *in vitro* que les récepteurs 5-HT $_{1A}$ peuvent exister sous deux états de haute et basse affinité vis-à-vis des agonistes (Mongeau *et al.*, 1992). D'après cette hypothèse, les récepteurs de haute affinité sont des récepteurs dont le couplage aux protéines G est effectif tandis que les récepteurs de basse affinité se trouvent sous forme découplée. A l'inverse des agonistes qui ciblent préférentiellement les récepteurs couplés, les antagonistes se lient avec une affinité comparable aux récepteurs, qu'ils se soient sous forme couplée ou non couplée (voir figure 21, et Gozlan *et al.*, 1995 ; Burnet *et al.*, 1997).

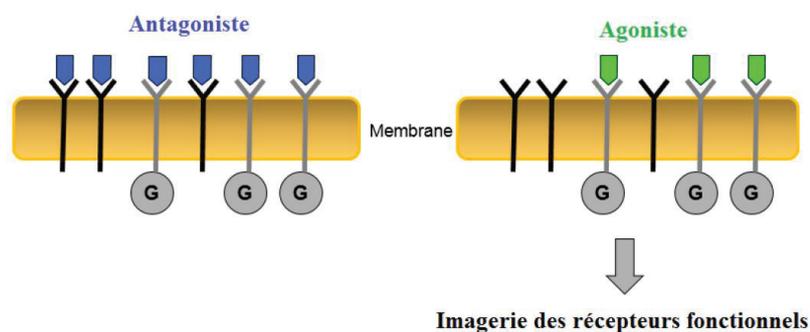


Figure 21 : Schéma représentant les différences de couplage constatées entre antagonistes et agonistes des récepteurs 5-HT $_{1A}$ *in vitro*, soutenant l'utilisation de radiotraceurs agonistes pour visualiser les récepteurs fonctionnels en imagerie.

Comme décrit précédemment, la grande majorité des radiotraceurs disponibles pour l'imagerie des récepteurs 5-HT_{1A} sont des antagonistes. Ils permettent donc de quantifier la densité totale de récepteurs, mais ne permettent pas de connaître l'état de couplage des récepteurs 5-HT_{1A} (Watson *et al.*, 2000). Disposer d'un radiotracer agoniste pour l'imagerie moléculaire des récepteurs 5-HT_{1A} pourrait donc apporter une information complémentaire et essentielle pour l'interprétation des données obtenues avec des traceurs antagonistes. La possibilité de déterminer un ratio *in vivo* des récepteurs couplés/non couplés est susceptible d'apporter des informations inédites sur la physiopathologie de divers troubles neuropsychiatriques (Watson *et al.*, 2000 ; Aznavour et Zimmer, 2007 ; Becker *et al.*, 2014). Pour illustration, de plus en plus d'arguments attestent de l'implication de l'état de couplage des RCPGs dans la pathogénie et le traitement de troubles de l'humeur (Avisar et Schreiber, 2006) et de troubles neurodégénératifs (Thathiah et De Strooper, 2011).

Compte tenu de ces différents états de couplage des récepteurs, l'intérêt de l'utilisation de radiotraceurs antagonistes pour mesurer des fluctuations de libération de sérotonine apparaît limité. En tant qu'agoniste endogène, la sérotonine n'entre en compétition avec le radiotracer qu'au niveau des récepteurs de haute affinité, c'est-à-dire une fraction des sites de fixation de l'antagoniste (Paterson *et al.*, 2010, Laruelle, 2002). Un radiotracer agoniste 5-HT_{1A} présente donc une sensibilité accrue à la sérotonine endogène, qui entre en compétition avec le traceur sur l'ensemble de ses sites de fixation (figure 22). Cette constatation a été largement discutée dans la littérature concernant les radiotraceurs des récepteurs dopaminergiques D2 mais le même raisonnement peut s'appliquer aux récepteurs 5-HT_{1A} (Laruelle, 2000 ; Skinbjerg *et al.*, 2011).

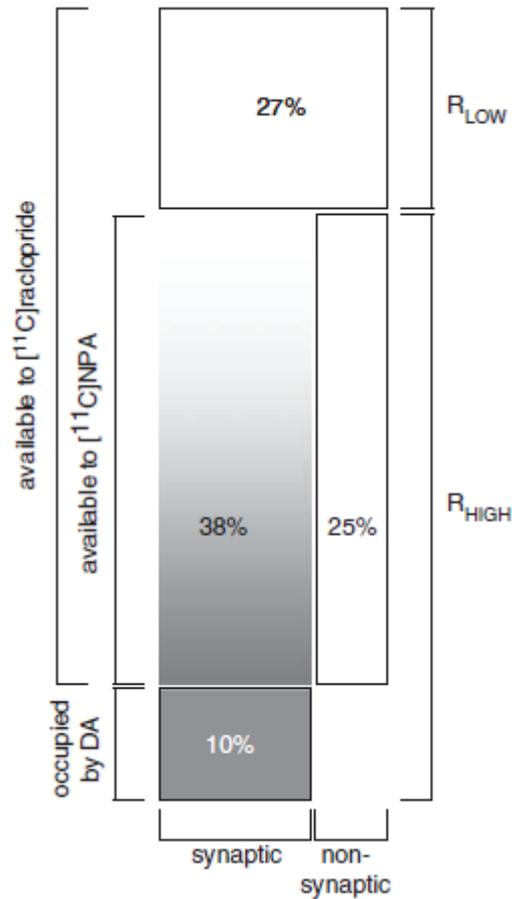


Figure 22 : Représentation schématique des récepteurs D2 disponibles pour l'antagoniste [¹¹C]raclopride et l'agoniste [¹¹C]NPA (Paterson et al., 2010 ; d'après Laruelle et al., 2000 et Narendran et al., 2004). Le [¹¹C]raclopride se fixe aux récepteurs de basse affinité, ce qui correspond à une fraction de 27% de récepteurs non sensibles à la libération de l'agoniste endogène, la dopamine. L'agoniste [¹¹C]NPA cible préférentiellement les récepteurs de haute affinité, correspondant à une fraction déplaçable par la dopamine plus importante que l'antagoniste. A noter qu'une partie de la fixation de l'agoniste n'est pas occupée par la dopamine, correspondant probablement à des sites de fixation non synaptiques. Le même schéma peut s'appliquer (avec des proportions différentes) pour les récepteurs 5-HT_{1A}, justifiant l'intérêt de radiotraceurs agonistes.

Les radiotraceurs 5-HT_{1A} antagonistes actuels se montrent en effet peu sensibles à la compétition avec la sérotonine endogène (Paterson et al., 2010). La plupart des études précliniques réalisées avec le [¹¹C]WAY-100635 et ses analogues fluorés [¹⁸F]FP-WAY et [¹⁸F]-FCWAY ont montré une absence de modification de fixation de ces traceurs malgré des challenges pharmacologiques importants augmentant par 5 à 15 fois la quantité de sérotonine libérée (Paterson et al., 2010 ; Hume et al., 2001 ; Maeda et al., 2001 ; Jagoda et

al., 2006). D'autres études chez le rongeur ont suggéré que la fixation du [¹⁸F]MPPF était sensible à des variations massives de la concentration de sérotonine extracellulaire (Zimmer *et al.*, 2002b ; Udo de Haes *et al.*, 2005) mais ces résultats n'ont pas été confirmés chez le primate non humain et l'homme (Udo de Haes *et al.*, 2006 ; Udo de Haes *et al.*, 2002 ; Praschak-Rieder *et al.*, 2004).

Pour des raisons probablement similaires, les études visant à mesurer le taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par des médicaments agonistes à des doses cliniquement actives et utilisant des radiotraceurs antagonistes se sont montrées peu concluantes (Rabiner *et al.*, 2002 ; Bantick *et al.*, 2004a ; Bantick *et al.*, 2004b). Ce point constitue une limite lors du développement de médicaments agonistes dont on voudrait calculer le taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{1A}.

Tous ces arguments sont en faveur du développement de radiotraceurs agonistes spécifiques des récepteurs 5-HT_{1A}. De nombreuses tentatives ont eu lieu, incluant des analogues du 8-OH-DPAT, des dérivés de l'apomorphine, de l'arylpipérazine et de la thiochromine, globalement infructueuses pour une utilisation *in vivo* (pour revue Kumar et Mann, 2007 ; Mathis *et al.*, 1997 ; Thorell *et al.*, 1995 ; Suehiro *et al.*, 1998 ; Fujio *et al.*, 2002 ; Hwang *et al.*, 2001a et b ; Vandecapelle *et al.*, 2004 ; Zimmer *et al.*, 2003). Plus récemment, le [¹¹C]CUMI-101 s'est avéré plus prometteur pour une utilisation *in vivo*, avec des caractéristiques radiopharmacologiques favorables pour une utilisation chez le rat, le singe et l'homme (Kumar *et al.*, 2007 ; Milak *et al.*, 2010). Le [¹¹C]CUMI-101 semble relativement sensible à des variations massives de sérotonine extracellulaire, mais probablement pas assez pour explorer des conditions physiologiques, avec des résultats divergents en fonction des espèces et des challenges pharmacologiques utilisés (Milak *et al.*, 2011 ; Palner *et al.*, 2011 ; Pinborg *et al.*, 2012 ; Selvaraj *et al.*, 2012). De plus, ses propriétés d'agonistes ont été récemment remises en question (Hendry *et al.*, 2011) car chez le rat la molécule se comporte comme un antagoniste *in vitro* (ce qui est cohérent avec sa structure chimique, proche de celle du WAY-100635). Une autre étude a démontré que le [¹¹C]CUMI-101 se comporte comme un antagoniste chez le singe, et que chez le rat, le singe et l'humain, le [¹¹C]CUMI-101 se fixe significativement aux récepteurs α_1 , à la fois *in vitro* et *in vivo* (Shrestha *et al.*, 2014). Enfin, plus récemment il a été montré qu'il se fixe également aux récepteurs α_1 *in vivo* dans le cervelet chez l'humain (Shrestha *et al.*, 2016). L'intérêt de ce

traceur pour l'imagerie des récepteurs 5-HT_{1A} couplés semble donc limité et justifie la recherche de nouveaux traceurs, notamment fluorés.

2.2. L'imagerie par résonance magnétique pharmacologique (pharmaco-IRM)

2.2.1 Généralités

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie non invasive, basée sur les différences de propriétés magnétiques des tissus et permettant d'acquérir des images des tissus mous d'une résolution spatiale élevée. Il s'agit d'une technologie versatile capable de générer des images très différentes en fonction du contraste utilisé, offrant ainsi la possibilité d'explorer de nombreux phénomènes biologiques (Plewes et Kucharczyk, 2012). De plus c'est une modalité d'imagerie non ionisante, ce qui permet des scans répétés sans impact négatif connu. Tous ces avantages en ont fait une technique de choix pour l'imagerie cérébrale.

2.2.2 Principes physiques et instrumentaux

L'IRM se base sur le phénomène complexe de résonance magnétique nucléaire, qui sera brièvement décrit ici. La résonance magnétique nucléaire peut s'observer avec certains noyaux à nombre de protons ou de neutrons impairs, notamment le noyau d'hydrogène ubiquitaire dans l'organisme. Ce noyau constitué d'un seul proton est caractérisé par une charge et un spin non nuls, ce qui lui confère des propriétés paramagnétiques dû au fait que le proton tourne autour de son axe avec un certain moment angulaire (Plewes et Kucharczyk, 2012).

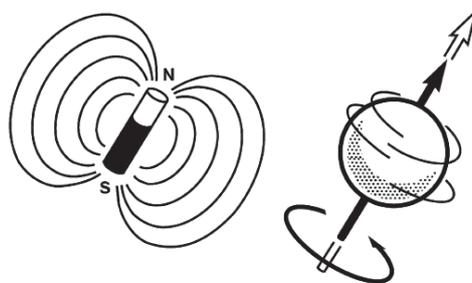


Figure 23 : Représentation schématique du proton, dont les propriétés conférées par le spin peuvent être assimilées à un dipôle magnétique (De Figueiredo et al., 2011).

Si les protons d'un échantillon biologique sont placés dans un très fort champ magnétique, ils tendent à s'orienter parallèlement à ce champ, avec une fréquence de précession des spins dépendant de l'intensité du champ. Si l'on applique à l'échantillon biologique une onde électromagnétique à une certaine radiofréquence grâce à une antenne excitatrice, l'orientation des protons s'écarte de l'axe de départ pour se placer perpendiculairement au champ magnétique. Pendant la phase de relaxation qui s'ensuit, les moments magnétiques vont progressivement revenir à leur état initial en émettant un signal oscillant à la même fréquence que l'onde excitatrice. C'est ce signal qui est mesuré au moyen d'une antenne réceptrice et qui permet de générer des images des tissus, selon un traitement complexe. L'intensité du signal dépend du nombre de protons, et l'apparence de l'image est déterminée par les différences de microenvironnements de ces protons dans les différents tissus. Les diverses séquences utilisées permettent d'obtenir des images selon différents contrastes, notamment en fonction du temps de relaxation des tissus. On peut ainsi réaliser des images anatomiques à haute résolution spatiale, visualiser les faisceaux de matière blanche par technique dite de tenseur de diffusion (DTI), mesurer la perfusion des tissus et le flux sanguin cérébral par technique d'ASL (arterial spin labeling) ou encore les variations du taux d'oxygénation par IRM fonctionnelle (De Figueiredo *et al.*, 2011).

Le cœur du fonctionnement de l'appareil IRM est l'aimant, qui doit être capable de générer un champ magnétique compris en général entre 1,5T et 3T pour les caméras cliniques, voire davantage pour des IRM de recherche. La plupart des appareils actuels utilisent un aimant supraconducteur, constitué d'une bobine d'alliage de métaux comme le niobium-titane baignée constamment dans de l'hélium liquide à environ -269°C. Le reste de l'appareil est constitué par les antennes volumiques et surfaciques permettant l'émission et la réception des ondes de radiofréquence, ainsi que des correcteurs de champ magnétique ou « shims » disposés le long de l'aimant.

2.2.3 L'IRM pharmacologique : application de l'IRM fonctionnelle à la neuropharmacologie

2.2.3.1 Principe de l'IRM fonctionnelle

La technique d'IRM fonctionnelle (IRMf) a révolutionné la recherche en neurosciences depuis son apparition il y a une vingtaine d'années (Buxton, 2013). L'IRMf

permet d'étudier indirectement des fluctuations d'activité cérébrale par la détection de variations hémodynamiques (figure 24). La clé de la technique repose sur le phénomène de couplage neuro-vasculaire, qui permet l'adaptation du flux sanguin cérébral en fonction de l'activité des neurones et des besoins métaboliques. Il faut noter que malgré la large utilisation de l'IRMf, les mécanismes précis du couplage neuro-vasculaire sont encore mal élucidés (pour revues Buxton, 2013 ; Arthurs et Boniface, 2012).

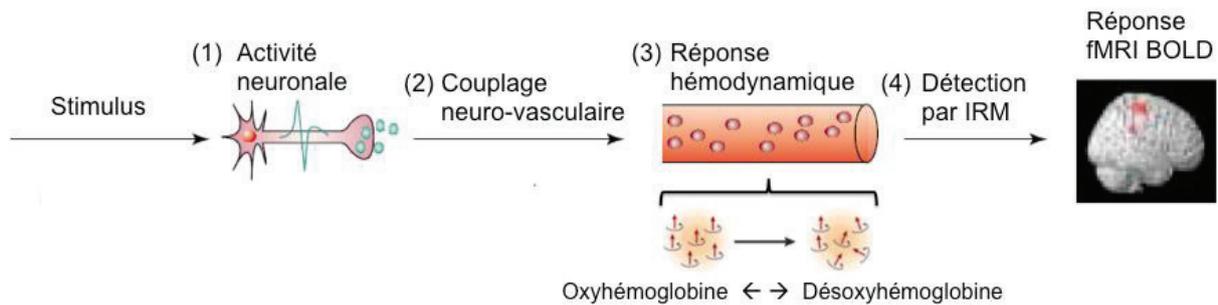


Figure 24 : Schéma illustrant le principe de l'IRMf, consistant à détecter la réponse hémodynamique survenant lors de fluctuations d'activité neuronale (d'après Arthurs et Boniface, 2012).

On peut mesurer différents paramètres hémodynamiques en IRMf, comme le débit sanguin cérébral ou CBF, le volume sanguin cérébral CBV et le signal BOLD (pour « blood oxygen level dependent ») qui dépend de la concentration locale en désoxyhémoglobine.

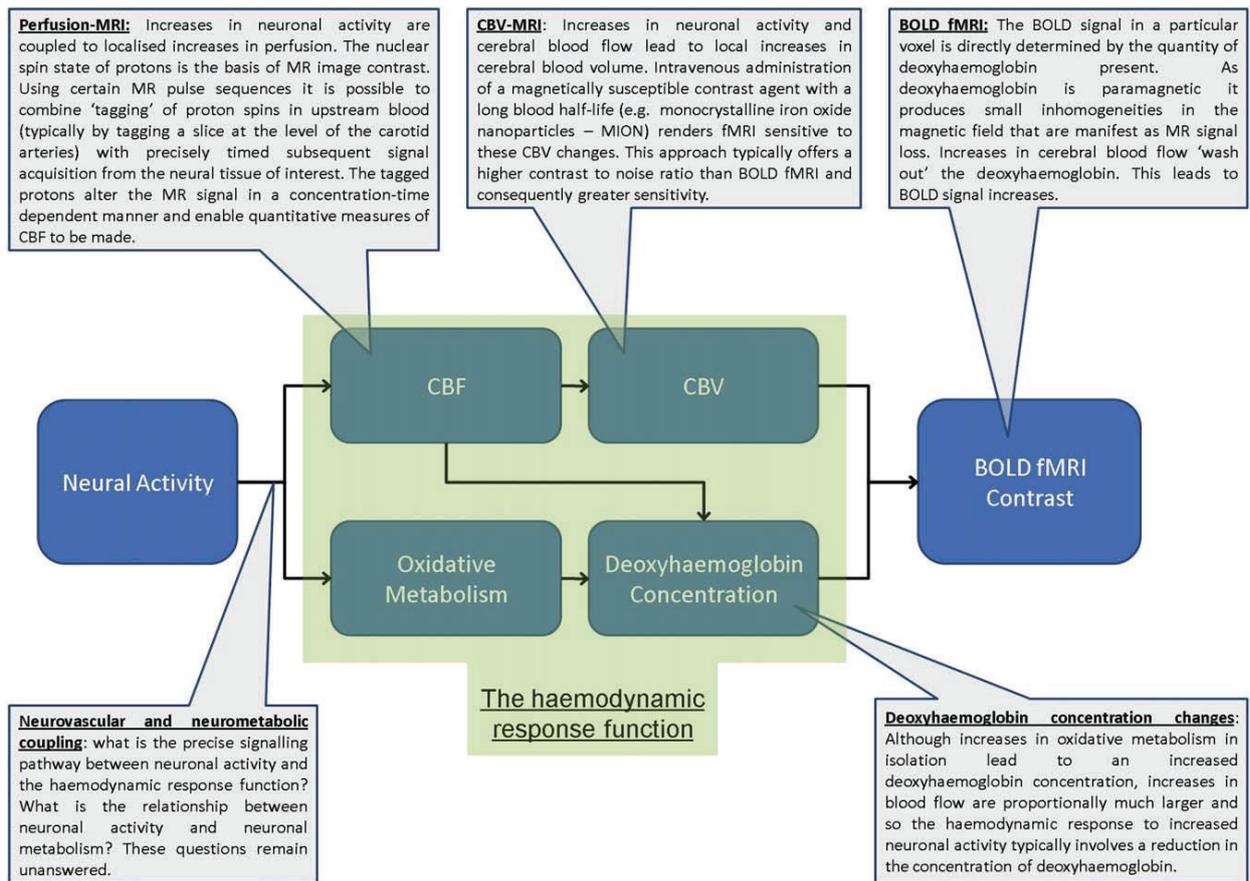


Figure 25 : Schéma illustrant la relation entre activité neuronale, variations hémodynamiques et paramètres mesurables en IRMf (Martin et Sibson, 2008).

Le CBF est mesuré par IRM de perfusion, dite ASL, qui consiste à utiliser le sang artériel comme agent de contraste endogène afin de mesurer sa vitesse de perfusion dans un tissu (Detre *et al.*, 2012). Le CBV est estimé par rapport aux variations d'intensité du signal local en utilisant des agents de contrastes comme des nanoparticules de fer. Enfin, le signal BOLD ne nécessite pas d'agent de contraste et dépend de la quantité locale de désoxyhémoglobine. Celle-ci est en effet paramagnétique et produit des inhomogénéités de signal. Lorsque l'activité neuronale augmente, l'augmentation de flux sanguin cérébral « lave » cette désoxyhémoglobine en apportant de l'oxyhémoglobine en proportion bien supérieure à l'augmentation de désoxyhémoglobine due au métabolisme neuronal. En conséquence, cela provoque une augmentation du signal BOLD (Martin et Sibson, 2008).

2.2.3.2 Principe de l'IRM fonctionnelle

L'approche classique des études d'IRMf consiste à utiliser un stimulus pour provoquer les variations d'activité neuronale. Ces stimuli sont généralement de nature visuelle, auditive, olfactive, cognitive ou motrice. Le terme plus spécifique d'IRM pharmacologique ou « pharmaco-IRM » (phIRM) a été introduit pour désigner l'utilisation d'agents pharmacologiques à visée centrale, soit comme stimulus direct, soit comme pharmaco-modulateur agissant sur l'activation induite par un stimulus classique (Jenkins, 2012). Depuis la fin des années 1990 (Chen *et al.*, 1997), de nombreuses études de phIRM ont été réalisées avec des ligands variés (dopaminergiques, sérotoninergiques, cholinergiques, opioïdes, neuropeptides) chez l'animal et chez l'homme.

2.2.4 La pharmaco-IRM pour l'étude du système sérotoninergique

La pharmaco-IRM a permis l'exploration du système sérotoninergique selon plusieurs angles (Martin et Sibson 2008, Anderson 2008). Certaines études ont visé à décrire l'anatomie fonctionnelle du système en utilisant des ligands spécifiques de certains sous-types de récepteurs. L'agoniste 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT induit par exemple une diminution du CBV dans des régions riches en récepteurs comme l'hippocampe, le septum et le cortex cingulaire. Ces effets sont bloqués par l'antagoniste WAY-100635, démontrant que ces effets sont spécifiques à la stimulation des récepteurs 5-HT_{1A} (Scanley *et al.*, 2001). On a également cartographié l'effet de la stimulation des récepteurs 5-HT₇ par le 8-OH-DPAT (Canese *et al.*, 2011). D'autres études ont comparé les modifications du signal BOLD induites par le mCPP, un agoniste mixte 5-HT_{1B}/5-HT_{2C}, avec les variations de métabolisme glucidique mesurées par autoradiographie ou l'activation c-Fos en immunohistochimie (Houston *et al.*, 2001, Stark *et al.*, 2006). Dans ces deux exemples, les patterns d'activation BOLD obtenus étaient bien corrélés avec les résultats obtenus par les autres techniques, la pharmaco-IRM présentant l'avantage d'être non invasive, dynamique, et plus sensible à des variations transitoires. De plus elle permet de détecter des activations ou des diminutions du signal, contrairement à l'immunohistochimie. Cette approche permet aussi d'identifier des régions ou des circuits neuronaux impliqués dans les effets comportementaux d'une molécule (Stark *et al.*, 2006).

D'autres études se sont focalisées sur l'effet BOLD de la sérotonine elle-même par l'administration de citalopram chez l'humain (McKie *et al.*, 2005) ou de fenfluramine chez le rat (Preece *et al.*, 2009). Dans cette dernière étude, les effets de la fenfluramine étaient réduits par un prétraitement à l'inhibiteur de synthèse de la sérotonine p-CPA, suggérant que la pharmaco-IRM pourrait constituer une alternative intéressante à la TEP pour détecter des fluctuations de sérotonine endogène.

Il existe de nombreuses façons d'analyser les données d'IRM fonctionnelle et la pharmaco-IRM n'y fait pas exception (Jenkins, 2012). La plupart des études s'intéressent aux augmentations ou diminutions du signal BOLD induites par des molécules centrales, mais il est aussi possible de mesurer comment le signal est corrélé entre différentes zones pour établir des cartes de connectivité fonctionnelle, et évaluer si la façon dont les régions sont connectées varie sous l'influence d'une molécule. Dans une approche dite « seed-based », une étude a ainsi mesuré quelle était la corrélation entre le signal BOLD dans le noyau du raphé dorsal et le reste du cerveau sous l'influence de fluoxétine chez le rat, et montré que les voxels présentant une corrélation significative avec cette région « seed » correspondaient aux principales aires de projection du système sérotoninergique (Schwarz *et al.*, 2007).

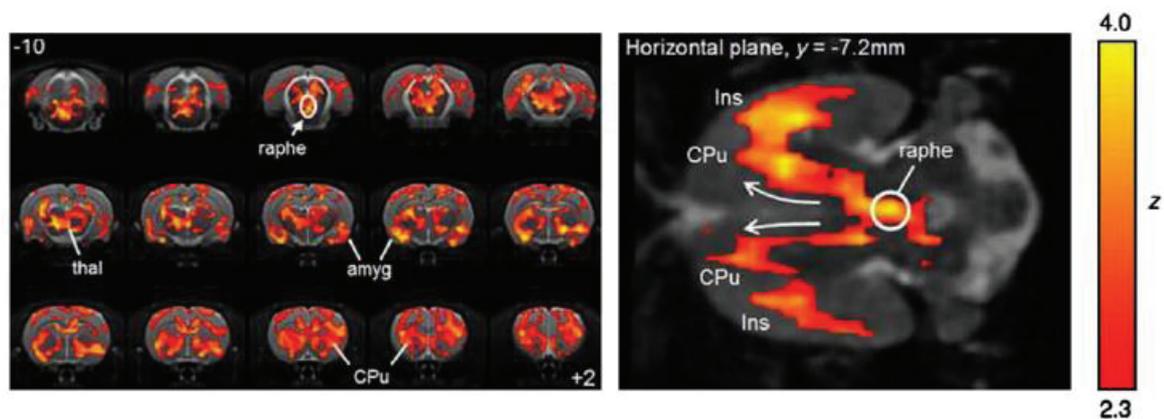


Figure 26 : Connectivité fonctionnelle avec les noyaux du raphé après injection de fluoxétine chez le rat (Schwarz *et al.*, 2009). Les voxels significatifs sont corrélés en termes de variation de volume sanguin cérébral avec le raphé. Amyg = amygdale ; CPu = caudé putamen ; Ins = insula ; Thal = thalamus.

Il est également possible d'identifier de véritables réseaux fonctionnels mis en jeu par l'injection d'une molécule en établissant des matrices de corrélation du signal IRMf entre de multiples régions d'intérêt, une approche utilisée pour décrire les effets du 8-OH-DPAT chez la souris (Razoux *et al.*, 2013).

Actuellement, peu d'études ont tiré parti de l'IRM pharmacologique pour caractériser l'altération du système sérotoninergique au cours de pathologies (Martin et Sibson, 2008), malgré le caractère translationnel de cette technique et les possibilités illustrées par des travaux sur le système dopaminergique (Chen *et al.*, 1997 ; Jenkins, 2012). De même, la phIRM est encore peu utilisée comme outil d'aide au développement de nouveaux médicaments. Dans ce cadre, une étude a été réalisée dans notre laboratoire pour comparer l'effet de différents agonistes biaisés 5-HT_{1A} (Becker *et al.*, 2016), une problématique que nous allons décrire plus en détail dans la section suivante.

III – L'agonisme biaisé, une révolution en pharmacologie ?

3.1 Principe

Aujourd'hui, plus de 30% des médicaments ciblent des récepteurs appartenant à la superclasse des récepteurs couplés aux protéines G, soulignant leur intérêt majeur comme cible thérapeutique (Luttrell *et al.*, 2015). Classiquement, la pharmacologie a défini les ligands selon deux grandes propriétés, leur affinité vis-à-vis de cibles moléculaires, ainsi que leur efficacité c'est-à-dire leur capacité à induire une réponse biologique. Un ligand présentant une affinité importante pour un récepteur donné est classé comme agoniste, agoniste partiel, antagoniste ou agoniste inverse selon la réponse biologique induite par la fixation à ce récepteur (Stephenson, 1956 ; Berg et Clarke, 2006). L'efficacité de différents agonistes d'un récepteur peut donc varier mais sans conséquence sur la nature des effets intracellulaires mis en jeu, puisqu'il s'agit du même récepteur. Le développement de nouveaux médicaments a progressé selon ce paradigme, avec pour objectif de découvrir des molécules de plus en plus spécifiques pour les sous types de récepteurs connus.

Il y a une vingtaine d'années, on a commencé à entrevoir la complexité de la pharmacologie des RCPG en démontrant qu'un même récepteur est capable de se coupler à des sous-familles de protéines G différentes (Offermanns *et al.*, 1994 ; Laugwitz *et al.*, 1996), notamment en fonction de sa localisation dans différents tissus (Jin *et al.*, 2001). Un nombre croissant de données expérimentales tendent à présent à montrer que des agonistes sont capables de stimuler spécifiquement certaines voies de transduction parmi les nombreuses voies associées à un sous-type de récepteur (Berg et Clarke, 2006 ; Luttrell *et al.*, 2015 ; Kenakin, 2015).

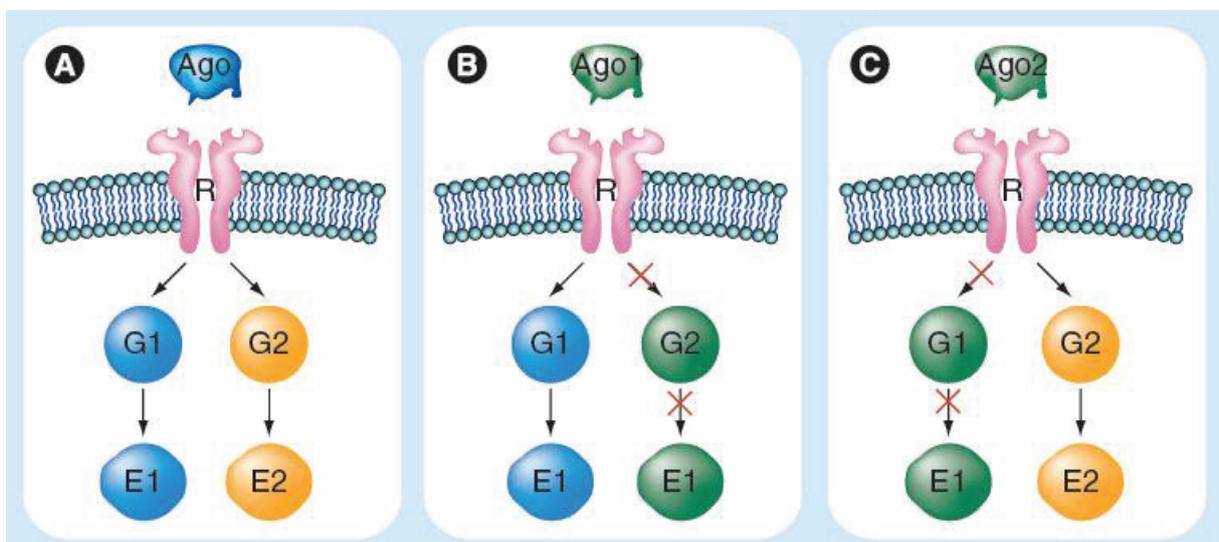


Figure 27 : Schéma illustrant le concept d'agonisme biaisé, aussi appelé sélectivité fonctionnelle (Newman-Tancredi, 2011). Ce concept postule que différents agonistes (Ago1 et Ago2) sont capables d'activer préférentiellement certaines voies de transduction (ici différentes protéines G couplées à différents effecteurs). Le concept d' « activité intrinsèque » proposé initialement postulait qu'un agoniste active indifféremment toutes les voies de transduction couplées à un récepteur.

Pour un même récepteur, plusieurs agonistes peuvent donc stimuler des voies de signalisation intracellulaires différentes, avec une signature fonctionnelle particulière. Ce phénomène, appelé sélectivité fonctionnelle ou agonisme biaisé, ajoute un niveau de complexité supplémentaire à la caractérisation des ligands et ouvre la voie vers des thérapies médicamenteuses plus efficaces et présentant moins d'effets indésirables.

En 1995, Kenakin est le premier à formuler l'hypothèse que les agonistes peuvent être caractérisés par une efficacité « relative » stipulant que cette efficacité peut fortement varier selon la réponse mesurée, contrairement à l'efficacité « intrinsèque » qui implique

que l'agoniste stimule uniformément les différentes voies d'activation associées à un récepteur (Kenakin, 1995 ; Berg et Clarke, 2006). Cette théorie qu'il dénomme « agonist-directed trafficking of receptor stimulus » (que l'on pourrait traduire par « guidage de la signalisation intracellulaire d'un récepteur par la stimulation d'un agoniste ») est possible si l'on considère que le récepteur est capable d'exister sous plusieurs états conformationnels possibles, résultant en différentes interactions avec les protéines des voies de signalisation (Berg et Clarke, 2006 ; Kenakin et Christopoulos, 2013). En d'autres termes, le récepteur n'existerait pas seulement selon deux états de haute affinité et basse affinité, mais également selon un certain nombre d'états intermédiaires interagissant de manière plus ou moins préférentielle avec certaines voies de transduction.

Selon cette théorie, un agoniste biaisé peut donc activer préférentiellement un récepteur selon un certain état, couplé à une protéine de signalisation particulière. La base de la sélectivité fonctionnelle est l'allostérie, la conformation du récepteur étant susceptible de varier en fonction de son interaction à la fois avec différentes protéines intracellulaires, et avec des agonistes de différentes structures (Kenakin, 2014). Ainsi, il a été montré expérimentalement avec les récepteurs adrénergiques β_2 que différents agonistes biaisés peuvent stabiliser des états conformationnels différents du récepteur (Ghanouni *et al.*, 2001 ; Swaminath *et al.*, 2004 ; Yao *et al.*, 2006). Réciproquement, l'affinité d'un agoniste biaisé pour un récepteur est susceptible de varier en fonction de l'environnement intracellulaire, par exemple en fonction du couplage à différents sous types de protéines G (Kenakin, 2014). Cette considération importante est illustrée par des expériences de cristallographie par rayons X, qui ont montré des différences structurales entre le récepteur β_2 adrénergique sous forme couplée ou non couplée à un anticorps simulant une protéine G (Rasmussen *et al.*, 2011a et b). Une étude réalisée sur nanodisques lipidiques comportant des récepteurs à la ghréline a montré de claires modifications de conformation des récepteurs après ajout de la protéine G_q aux nanodisques (Mary *et al.*, 2012). Les conséquences sur l'affinité d'un agoniste spécifique peuvent être majeures ; on a notamment montré que l'affinité de la salvinorine A pour les récepteurs κ est modifiée d'un facteur 18 selon que le récepteur soit couplé à la protéine $G_{\alpha 16}$ ou $G_{\alpha 12}$, ce qui s'explique par des changements de conformation des domaines transmembranaires 6 et 7 (Yan *et al.*, 2008).

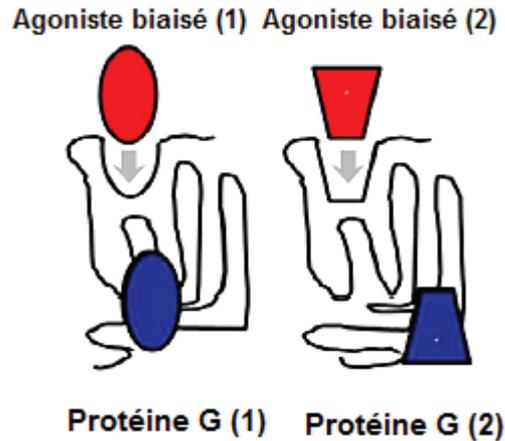


Figure 28 : Schéma illustrant un mécanisme possible de l'agonisme biaisé : l'interaction entre le récepteur et les molécules impliquées dans différentes voies de transduction du signal (en bleu) stabilisent des états conformationnels du récepteur différents, pour lesquels les ligands spécifiques (en rouge) présentent des affinités différentes (d'après Kenakin, 2014).

De nombreuses données démontrent l'existence de phénomènes de sélectivité fonctionnelle notamment en neuropharmacologie. Parmi les différents axes prometteurs, on peut citer le développement d'agonistes biaisés des récepteurs μ opioïdes, résultant de l'observation que les phénomènes de désensibilisation et certains effets indésirables des morphiniques sont dûs à l'activation de la voie arrestine-3 (pour revue, Luttrell, 2015). De même, les effets indésirables des agonistes des récepteurs κ (potentiellement intéressants comme analgésiques) semblent médiés par des voies intracellulaires impliquant les arrestines, encourageant le développement d'agonistes biaisés ne stimulant pas ce composant de la signalisation intracellulaire du récepteur κ (Luttrell, 2015). Peu après la formulation de la théorie par Kenakin, des phénomènes de sélectivité fonctionnelle ont également été observés avec le système sérotoninergique. Ainsi, comparés à la sérotonine, certains agonistes 5-HT_{2C} sont capables d'activer préférentiellement la voie de la phospholipase C, tandis que d'autres composés activent majoritairement la voie de la phospholipase A₂ (Berg *et al.*, 1998). De même, la désensibilisation paradoxale des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} s'observant suite à des traitements chroniques avec des antagonistes ou des agonistes inverses pourrait s'expliquer par cette théorie, un ligand étant potentiellement capable de bloquer une certaine voie fonctionnelle mais d'activer des processus de régulation négative (Gray et Roth, 2001).

3.2 Implications et challenges

Même si l'existence de ligands biaisés est désormais certaine, le potentiel thérapeutique de la sélectivité fonctionnelle n'est pas encore bien établi. En effet, la découverte des agonistes biaisés repose sur des études *in vitro* et ces dernières ne sont pas toujours prédictives de l'action de la molécule *in vivo* étant donné les multiples variables pouvant impacter la réponse physiologique au sein d'un organisme entier (Luttrel, 2015). La plupart des études *in vivo* des agonistes biaisés sont réalisées de manière empirique. L'objectif est donc de développer des méthodes d'analyses *in vivo* permettant de déterminer l'impact du caractère biaisé d'une molécule par rapport à un ligand classique. Contrairement aux études *in vitro*, des effets non spécifiques au récepteur d'intérêt peuvent être observés si l'agoniste étudié ou ses métabolites possèdent une affinité notable pour d'autres récepteurs, ce qui constitue un challenge majeur (Zhou et Bohn, 2014). Dans ce domaine, des progrès importants ont été réalisés grâce au développement de souris génétiquement modifiées, par exemple pour exprimer des tags fluorescents au niveau du récepteur d'intérêt et visualiser son internalisation en réponse à différents agonistes (Scherrer *et al.*, 2009 ; Pradhan *et al.*, 2009), une propriété fonctionnelle corrélée à certains effets comportementaux. D'autres études se sont focalisées sur la mesure des changements de phosphorylation des protéines ou de transcription d'ARN messagers dans les tissus après administration d'agonistes biaisés chez l'animal (Zhou et Bohn, 2014).

Compte tenu de l'intérêt thérapeutique potentiel des agonistes biaisés, il apparaît un manque de méthodes translationnelles pour caractériser les propriétés de ces ligands. Développer de telles méthodes apparaît d'autant plus crucial que le phénomène de sélectivité fonctionnelle souligne à quel point l'activité d'un agoniste est dépendante de l'environnement cellulaire du récepteur, susceptible de varier en fonction des tissus et des espèces (Berg et Clarke, 2006). Il faut donc pouvoir disposer de techniques permettant l'exploration *in vivo* de l'agonisme biaisé chez l'homme et pas seulement chez l'animal.

3.3 Les agonistes biaisés des récepteurs 5-HT_{1A}

La pharmacologie des récepteurs 5-HT_{1A} est complexe et ce sont les récepteurs sérotoninergiques possédant la plus grande diversité de voies de signalisation intracellulaire

(Raymond *et al.*, 2001). Comme décrit précédemment, il est important de souligner que les propriétés fonctionnelles des récepteurs 5-HT_{1A} sont variables selon leur localisation cérébrale, ces récepteurs pouvant se coupler préférentiellement à différents sous types de protéines G en fonction des régions (Mannoury la Cour *et al.*, 2006). Les effets des agonistes 5-HT_{1A} sur la phosphorylation de la protéine ERK 1/2 dépendent également des régions (Buritova *et al.*, 2009). Ces données suggèrent que développer des agonistes biaisés des récepteurs 5-HT_{1A} offrirait l'opportunité de cibler en priorité les récepteurs de certaines régions cérébrales. Cette problématique est pertinente compte tenu de la vaste distribution des récepteurs 5-HT_{1A} et de l'intérêt à distinguer les différentes populations neuronales en thérapeutique (Newman-Tancredi, 2011).

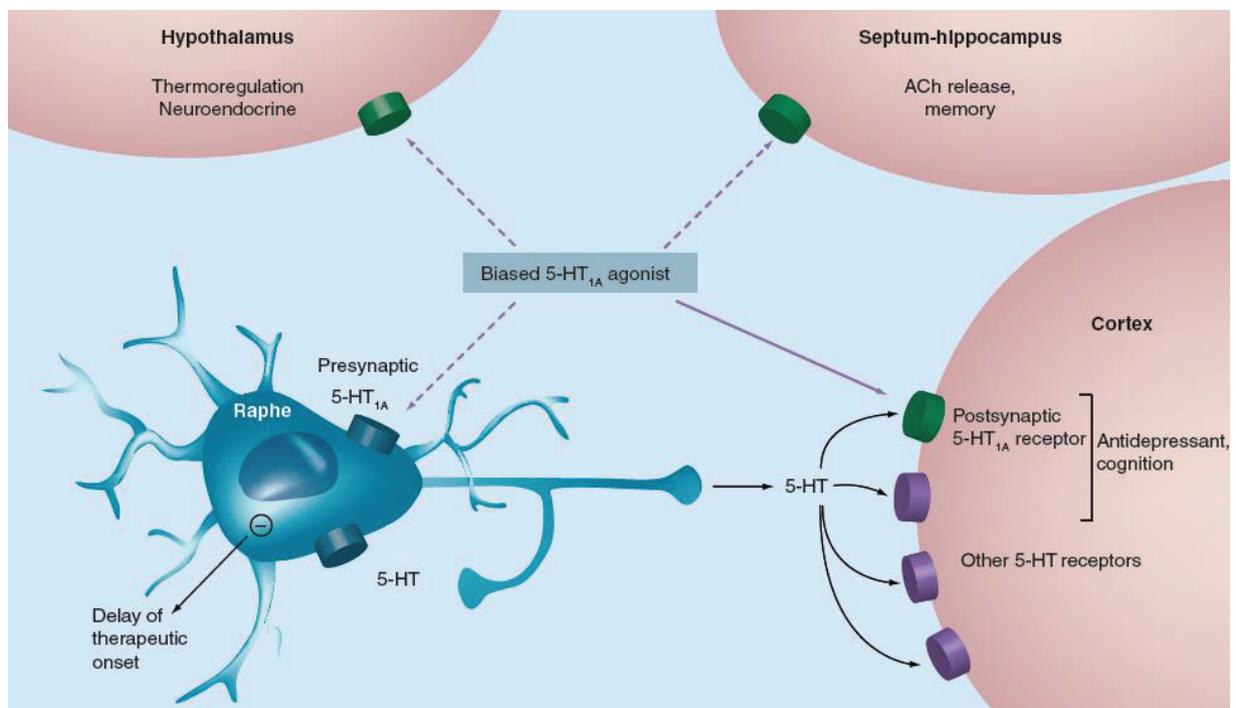


Figure 29 : Schéma illustrant l'intérêt potentiel d'un agoniste biaisé avec une activité préférentielle pour les récepteurs 5-HT_{1A} postsynaptiques corticaux dans le cadre d'une thérapie antidépressive (Newman-Tancredi, 2011). L'activation des récepteurs corticaux est responsable de l'effet thérapeutique, tandis que l'activation des récepteurs présynaptiques du raphé est impliquée dans le délai d'action des antidépresseurs classiques. Les récepteurs de l'hypothalamus sont impliqués dans le contrôle des fonctions neuroendocrines et la thermorégulation, tandis que les récepteurs du septum et de l'hippocampe participent à la régulation des processus mnésiques.

Depuis de nombreuses années et avant même la formulation de la théorie de l'agonisme biaisé, on a remarqué que les agonistes 5-HT_{1A} produisent des réponses différentes en stimulant les autorécepteurs ou les hétérorécepteurs (Sprouse et Aghajanian, 1988 ; pour revue Chilmoneyk *et al.*, 2015). L'inhibition de la synthèse d'inositol phosphate induite par l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} par le 8-OH-DPAT et le flesinoxan a été décrite dans le raphé mais pas l'hippocampe (Johnson *et al.*, 1997). De plus, la stimulation des récepteurs du raphé par le 8-OH-DPAT et la flibansérine n'induit pas d'inhibition de l'adénylate cyclase, en opposition avec les hétérorécepteurs de l'hippocampe (Clarke *et al.*, 1996). Ces observations dépendent des agonistes utilisés, soutenant l'existence d'un agonisme biaisé des récepteurs 5-HT_{1A}. En effet, et contrairement aux agonistes précédents, la buspirone est capable d'inhiber l'adénylate cyclase au niveau des autorécepteurs (Marazziti *et al.*, 2012 ; Valdizan *et al.*, 2010). Il faut également remarquer que la flibansérine active les récepteurs postsynaptiques préférentiellement par rapport aux récepteurs présynaptiques (Stahl *et al.*, 2011 ; Marazziti *et al.*, 2002 ; Borsini *et al.*, 2002). Toutefois l'interprétation de ces données est sujette à caution car cette molécule interagit aussi avec les récepteurs 5-HT_{2A} et D4 (Newman Tancredi, 2011). Enfin, l'aripiprazole, un antipsychotique atypique peu sélectif mais présentant une composante agoniste 5-HT_{1A}, stimule les récepteurs du cortex frontal à des doses 10 fois inférieures à celles inhibant la libération de sérotonine (Bortolozzi *et al.*, 2007), tandis qu'une préférence inverse est observée avec le 8-OH-DPAT (Ago *et al.*, 2003).

Plusieurs expériences démontrent plus formellement l'existence d'agonistes biaisés 5-HT_{1A}, en comparant les profils d'activation *in vitro* de différents ligands dans les mêmes conditions (pour revue Newman-Tancredi, 2011). Dans des oocytes de xénope, la sérotonine et les agonistes L694247 et F13714 stimulent les courants GIRKs via les récepteurs 5-HT_{1A} avec une efficacité comparable. En revanche le L694247 est capable d'induire des courants non dépendants des protéines G (« smooth inward current ») avec une efficacité supérieure à la sérotonine, tandis que le F13714 se comporte comme un antagoniste pour cette réponse, comparativement au WAY-100635 (Heusler *et al.*, 2005). De même, une étude utilisant une lignée cellulaire clonée a montré que différents agonistes peuvent activer différemment G_{αi2} et G_{αi3}, l'ipsapirone étant moins efficace que la sérotonine et le 8-OH-DPAT pour activer G_{αi3} (Gettys *et al.*, 1994). Enfin, dans une lignée de cellules ovarienne la

stimulation des récepteurs 5-HT_{1A} par la sérotonine entraîne l'activation de plusieurs sous-types de protéines G, tandis que le pindolol n'active que les récepteurs couplés aux protéines G_{α13} (Newman-Tancredi *et al.*, 2002). Cela suggère un couplage préférentiel du pindolol aux récepteurs couplés aux protéines G_{α13}, une possible explication de sa capacité à cibler principalement les récepteurs du raphé en imagerie TEP (Hirani *et al.*, 2000 ; Martinez *et al.*, 2001).

Il faut noter que de légères variations structurelles entre différents ligands sont susceptibles d'influer de manière importante la sélectivité fonctionnelle des agonistes 5-HT_{1A}. Ainsi, les agonistes F15599, F13714 et F13640 appartiennent à la même famille de composés extrêmement sélectifs et actifs vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{1A} (Colpaert *et al.*, 2002 ; Maurel *et al.*, 2007) mais différent en termes de profils de signalisation *in vitro* (Newman-Tancredi *et al.*, 2009). Dans une étude détaillée comparant F15599, F13714, sérotonine et 8-OH-DPAT, les quatre agonistes présentent des différences notables en terme de puissance pour différentes réponses (activation des protéines G, inhibition de l'adénylate cyclase, phosphorylation de ERK 1/2, et internalisation). Le F15599 possède une puissance importante pour la phosphorylation ERK 1/2 (EC₅₀ = 15 nM), environ 10 fois supérieure aux autres réponses (EC₅₀ de 100 à 350 nM), tandis que la sérotonine induit préférentiellement l'inhibition de l'adénylate cyclase (Newman Tancredi *et al.*, 2009). De même, la sérotonine active de manière comparable G_{αi} et G_{αo}, alors que le F15599 active préférentiellement G_{αi}, le 8-OH-DPAT et le F13714 présentant des profils intermédiaires. Dans une étude plus récente, le F13640 présente une efficacité comparable à la sérotonine et supérieure au 8-OH-DPAT et à la bupirone pour l'activation des protéines G, l'inhibition de l'adénylate cyclase, la phosphorylation ERK 1/2 et l'internalisation des récepteurs, mais avec une préférence pour la phosphorylation ERK (EC₅₀ = 3,9 nM). Contrairement au 8-OH-DPAT et à la bupirone, le F13640 présente une puissance accrue pour l'activation des protéines G_{αo} (Newman-Tancredi *et al.*, 2017).

Ces différences de sélectivité fonctionnelle *in vitro* se traduisent par des profils pharmacologiques différents *in vivo*. Une série d'études démontre que le F15599 possède une préférence pour les récepteurs postsynaptiques, notamment corticaux, avec une influence moindre sur les autorécepteurs présynaptiques (Newman-Tancredi *et al.*, 2009 ; Assié *et al.*, 2010 ; Depoortere *et al.*, 2010 ; Llado-Pelfort *et al.*, 2010). Le F13714 présente au

contraire une préférence pour les récepteurs présynaptiques, tandis que le F13640 possède un profil intermédiaire. En électrophysiologie, le F15599 est capable de stimuler les cellules pyramidales du cortex frontal à des doses 40 fois plus faibles que celles nécessaires pour inhiber le taux de décharge des neurones du raphé (Llado-Pelfort *et al.*, 2010), un profil différent d'autres agonistes comme le F13640, agissant à doses comparables sur tous les récepteurs pré et postsynaptiques (Llado-Pelfort *et al.*, 2012), ou le repinotan et le 8-OH-DPAT, agissant surtout au niveau présynaptique (Casanovas *et al.*, 2000). Les études de microdialyse donnent des résultats comparables : le F15599 injecté en intrapéritonéal chez le rat provoque une libération de dopamine dans le cortex préfrontal médian à des doses plus faibles que celles nécessaires pour inhiber la libération de sérotonine dans l'hippocampe (ED₅₀ de 0,03 mg/kg contre 0,24 mg/kg – Llado-Pelfort *et al.*, 2010), deux effets respectivement reliés à l'activation des récepteurs du cortex frontal (Diaz-Mataix *et al.*, 2005) ou du raphé (Assié *et al.*, 2005). L'ordre de préférence est inversé pour le F13714 (ED₅₀ de 0,16 mg/kg contre 0,04 mg/kg) et intermédiaire pour le F13640 (Newman-Tancredi, 2011). Dans d'autres expériences évaluant l'effet chronique d'agonistes 5-HT_{1A} administrés par pompe osmotique chez le rat, une dose faible de F13714 sur 3 jours est suffisante pour provoquer une désensibilisation des autorécepteurs. En comparaison, une dose 8 fois plus élevée de F15599 pendant 14 jours est nécessaire pour provoquer une telle désensibilisation, démontrant que le F15599 possède un effet peu marqué sur les récepteurs du raphé (Assié *et al.*, 2006 ; Newman-Tancredi, 2011). Des études *ex vivo* suggèrent également une préférence postsynaptique du F15599 par rapport aux autres composés. L'expression du gène c-Fos, un marqueur d'activation neuronale, est augmentée par le F15599 dans le cortex frontal mais très peu modifiée dans le raphé médian et dorsal. A l'inverse, le F13714 augmente fortement l'expression de c-Fos dans le raphé dorsal, à un niveau excédant l'activation dans le cortex frontal (Newman-Tancredi *et al.*, 2009 ; Newman-Tancredi, 2011). De plus, les profils d'activation *ex vivo* de la voie ERK 1/2 (mesurée par la quantification de la phosphorylation de la protéine par technique ELISA) sont différents. Le F13640, le F13714 et la buspirone inhibent la phosphorylation de ERK 1/2 dans l'hippocampe à des doses inférieures à celles qui augmentent la phosphorylation de la protéine dans le cortex préfrontal, soulignant une préférence présynaptique (cette inhibition étant interprétée comme une conséquence d'une baisse de libération de sérotonine dans l'hippocampe due à la stimulation du raphé), tandis que le 8-OH-DPAT et le F15599 agissent

à des doses comparables sur ces deux régions (Newman-Tancredi *et al.*, 2009 ; Buritova *et al.*, 2009). Enfin, une étude récente réalisée dans notre laboratoire a montré que le F15599, le 8-OH-DPAT et le F13714 induisent une augmentation du signal BOLD en pharmaco-IRM avec des patterns bien différents, l'effet du F15599 à 0,16 mg/kg étant réservé au cortex cingulaire durant les 15 premières minutes suivant l'administration, tandis que le 8-OH-DPAT et le F13714 recrutent d'autres régions (Becker *et al.*, 2016).

Ces claires différences *in vitro* et *in vivo* entre analogues structurels F15599, F13640 et F13714 se traduisent par des potentiels différents en thérapeutique. Le F13714 induit des signes comportementaux de syndrome sérotoninergique chez le rat dès les faibles doses et, par extrapolation, est difficilement utilisable en thérapeutique chez l'homme (Bardin *et al.*, 2003), malgré des effets anti-agressifs très marqués probablement dus à une forte activation des récepteurs présynaptiques (de Boer et Newman-Tancredi, 2016). En revanche, les propriétés du F15599 et du F13640 semblent intéressantes pour différentes indications.

Le F15599 présente des propriétés pro-cognitives et antidépressives dans différents modèles précliniques, un profil comportemental différent d'autres agonistes 5-HT_{1A} et probablement expliqué par sa préférence pour les récepteurs postsynaptiques corticaux (Assié *et al.*, 2010 ; Depoortere *et al.*, 2010 ; Van Goethem *et al.*, 2015). De plus, le F15599 à 0,1 mg/kg en intrapéritonéal améliore fortement la respiration en diminuant les apnées et en régularisant le rythme respiratoire chez les souris KO pour le gène *Mecp2*, un modèle murin du syndrome de Rett (Levitt *et al.*, 2013). Il est intéressant de noter que cette activité pro-respiratoire serait due à la stimulation des canaux GIRKs au niveau du raphé, malgré les données attestant de sa préférence pour les récepteurs postsynaptiques. Il est possible que le F15599 discrimine des sous-populations de récepteurs au sein du raphé, puisqu'il diminue très peu la libération de sérotonine comparé aux autres agonistes 5-HT_{1A} (Levitt *et al.*, 2013). Le F15599 apparaît donc comme un candidat potentiel pour le traitement du syndrome de Rett, à la fois en exerçant une action pro-cognitive au niveau des récepteurs corticaux et une action pro-respiratoire au niveau du raphé, sans inhiber la libération de sérotonine dans les aires de projections. Il est actuellement développé sous le nom de NLX-101 par Neurolixis dans cette indication.

Le F13640, ou befiradol, était initialement développé par Pierre Fabre comme antidouleur dans le traitement de neuropathies périphériques chez les diabétiques. En effet, ce composé induit une analgésie importante en traitement chronique dans plusieurs modèles de douleur chez le rat (Colpaert *et al.*, 2002 ; Colpaert *et al.*, 2006 ; Deseure *et al.*, 2003). Le mécanisme d'action de cette analgésie n'a pas été identifié précisément mais s'accompagne d'une augmentation de l'expression c-Fos au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Buritova *et al.*, 2003 ; Buritova *et al.*, 2005). Des données récentes montrent que le F13640 possède une activité anti-dyskinésique très marquée dans un modèle de rat hémiparkinsonien, probablement via stimulation des autorécepteurs du raphé (figure 30), permettant de stopper la libération anarchique de dopamine dans le striatum par les neurones sérotoninergiques (Ilderberg *et al.*, 2015b ; McCreary *et al.*, 2016). En comparaison, le F15599 présentait peu d'activité anti-dyskinésique dans une étude précédente (Ilderberg *et al.*, 2015a). On a également constaté que le F13640 augmente le comportement moteur et induit des rotations ipsilatérales dont le mécanisme d'action reste à élucider, mais est probablement lié à une libération de dopamine accrue dans le striatum du côté non lésé du cerveau (Ilderberg *et al.*, 2015b). De plus, dans cette même étude le F13640 a présenté des propriétés antidépressives et anxiolytiques possiblement intéressantes pour le traitement des symptômes non moteurs chez les patients parkinsoniens, et probablement grâce à la stimulation des récepteurs corticaux selon un mécanisme comparable au F15599 (figure 30). L'effet antidyskinésique du F13640 chez les rats hémiparkinsoniens est confirmé en traitement chronique de 14 jours sans apparition de phénomène de tolérance (McCreary *et al.*, 2016). Au vu de ces résultats prometteurs, le F13640 est actuellement développé comme antidyskinésique sous le nom de NLX-112 par Neurolix.

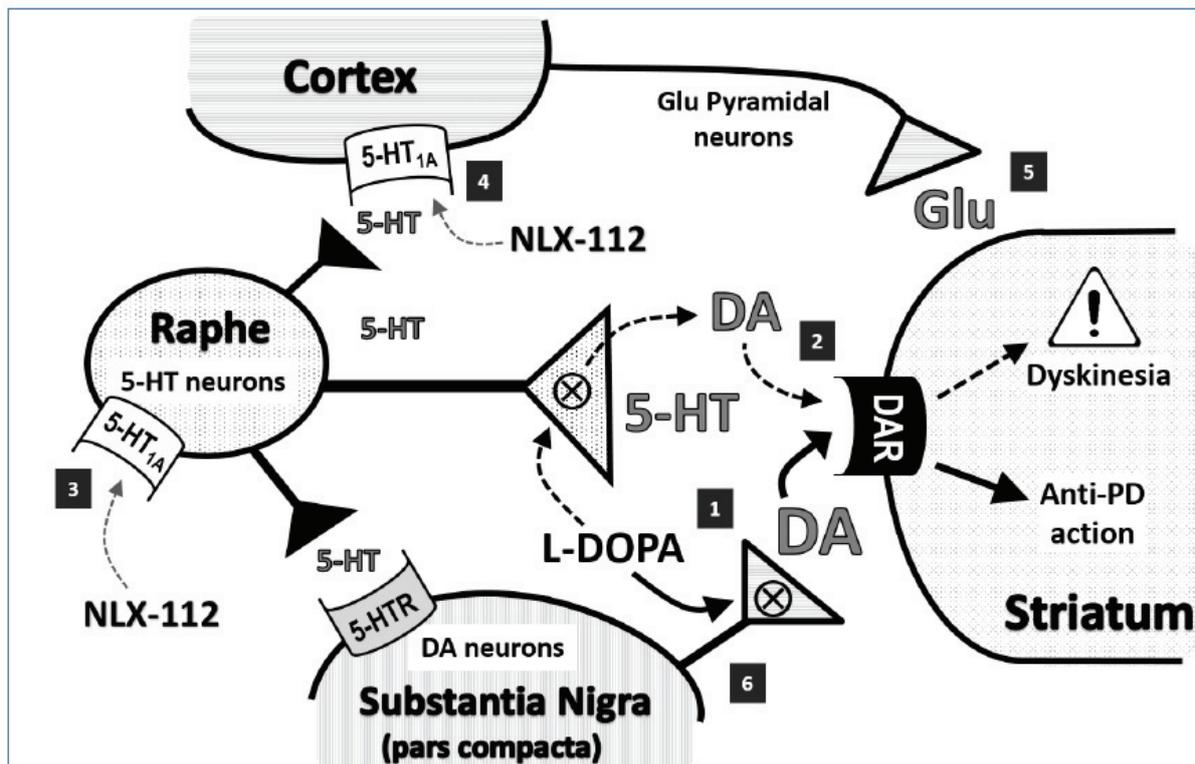


Figure 30 : Mécanisme d'action anti-dyskinésique du F13640 ou NLX-112 (Iderberg et al., 2015b). 1 – La L-DOPA capturée par les neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée et convertie en dopamine, expliquant l'effet anti-parkinsonien par action de la dopamine sur les récepteurs postsynaptiques du striatum. 2 – A un stade plus avancé, la L-DOPA est également capturée et convertie en dopamine par les neurones sérotoninergiques, qui libèrent la dopamine de manière incontrôlée, expliquant l'apparition des dyskinésies. 3 – Le F13640 active les autorécepteurs somatodendritiques du raphé, provoquant une inhibition des neurones sérotoninergiques et induisant une diminution de la libération de sérotonine et un blocage de la libération anarchique de dopamine après conversion de la L-DOPA. 4 – Le F13640 active aussi les récepteurs corticaux, avec des effets antidépresseurs, anxiolytiques et pro-cognitifs. 5 – L'inhibition de libération de glutamate par les neurones pyramidaux du cortex est également susceptible de réduire les dyskinésies, bien que non détectée dans l'étude. 6 – Le F13640 stimule les rotations ipsilatérales chez les rats hémiparkinsoniens, probablement en augmentant la libération de dopamine par les neurones nigrostriées.

OBJECTIFS

Depuis des années, l'imagerie TEP des récepteurs 5-HT_{1A} a permis une compréhension accrue du rôle physiopathologique de ces récepteurs, aussi bien chez l'animal que chez l'humain. Toutefois, les radiotraceurs actuels antagonistes ne permettent pas d'évaluer le couplage entre récepteurs 5-HT_{1A} et protéines G, susceptible d'être altéré au décours de processus pathologiques. Dans ce contexte, il est nécessaire de développer des outils permettant l'étude de la fonctionnalité des récepteurs 5-HT_{1A} *in vivo*, une information inédite et cruciale pour redéfinir le potentiel de ce récepteur comme biomarqueur et cible thérapeutique. Les travaux effectués au cours de cette thèse visent donc à promouvoir l'utilisation de techniques d'imageries non invasives et translationnelles pour explorer le couplage des récepteurs 5-HT_{1A} *in vivo*.

La première partie expérimentale consistera à évaluer un agoniste très spécifique des récepteurs 5-HT_{1A}, le F13640, comme potentiel radiotraceur en imagerie TEP permettant de cibler spécifiquement les récepteurs sous forme couplée aux protéines G. Les propriétés radiopharmacologiques du F13640 radiomarqué au fluor 18 seront caractérisées *in vitro* et *in vivo* du rat au primate, dans une démarche translationnelle.

La deuxième partie expérimentale consistera à faire la preuve de concept de l'intérêt de prendre en compte l'état de couplage des récepteurs 5-HT_{1A} au moyen de radiotraceurs agonistes dans un contexte pathologique. Les variations de densité de récepteurs couplés et de récepteurs totaux au cours de la maladie d'Alzheimer seront comparées en utilisant l'agoniste [¹⁸F]F13640 et l'antagoniste [¹⁸F]MPPF en autoradiographie postmortem chez les mêmes patients.

Dans la dernière partie expérimentale, nous complexifierons la problématique en nous focalisant sur le phénomène d'agonisme biaisé qui implique la possibilité de cibler différentes populations de récepteurs 5-HT_{1A} en fonction de leur couplage avec différentes voies de transduction. Le F13640 sera comparé au F15599, un autre agoniste 5-HT_{1A}, à doses pharmacologiques à la fois en imagerie TEP et en IRM fonctionnelle.

PARTIE 1 : EVALUATION PRECLINIQUE DU [¹⁸F]F13640 COMME RADIOTRACEUR AGONISTE DES RECEPTEURS 5-HT_{1A} POUR L'IMAGERIE TEP

I – Problématique

L'imagerie TEP des récepteurs 5-HT_{1A} a été vastement utilisée au cours des années et a permis une compréhension accrue du rôle fonctionnel de ces récepteurs, ainsi que de leur potentiel à la fois en tant que cible thérapeutique ou en tant que biomarqueur du système sérotoninergique. Actuellement, la quasi-totalité des radiotraceurs 5-HT_{1A} utilisés en clinique sont des antagonistes (Billard *et al.*, 2014). Or, il est bien établi *in vitro* que ces récepteurs peuvent exister sous forme de haute ou basse affinité en fonction de leur couplage effectif ou non aux protéines G (Mongeau *et al.*, 1995). Cette propriété implique que les agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} se fixent préférentiellement aux récepteurs de haute affinité, tandis que les antagonistes se fixent indifféremment aux récepteurs couplés ou non. Ainsi, utiliser un radiotracer agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} en imagerie TEP permettrait d'explorer l'état de couplage de ces récepteurs au cours de pathologies (Aznavour et Zimmer, 2007). Un tel radiotracer serait possiblement plus sensible à l'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par des agonistes exogènes ou la sérotonine (Paterson *et al.*, 2010). Jusqu'à maintenant, la plupart des tentatives de développer un radiotracer agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} pour l'imagerie *in vivo* se sont soldées par des échecs (Billard *et al.*, 2014 ; Mathis *et al.*, 1997). Pour l'heure, il n'existe pas d'agoniste 5-HT_{1A} présentant à la fois une efficacité, une affinité et une spécificité satisfaisantes pour l'imagerie TEP des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels chez l'humain. Notre équipe a précédemment radiomarké au fluor 18 et évalué chez l'animal deux agonistes entiers et très spécifiques des récepteurs 5-HT_{1A}, le [¹⁸F]F15599 et le [¹⁸F]F13714 (Lemoine *et al.*, 2010 ; Lemoine *et al.*, 2012). Malgré des résultats encourageants, ces deux candidats ne sont pas optimaux pour l'imagerie TEP, respectivement à cause d'un rapport signal/bruit trop faible ou d'une fixation irréversible. Dans ce contexte, nous avons choisi d'évaluer un autre agoniste de la même famille de composés, le F13640, qui présente également une haute efficacité et spécificité pour les

récepteurs 5-HT_{1A}, et une affinité intermédiaire comparée aux composés précédents (1 nM contre 2,24 nM pour le F15599 et 0,01 nM pour le F13714 ; Maurel *et al.*, 2007). Le F13640, aussi connu sous le nom de befiradol ou NLX-112, est actuellement en cours de développement comme potentiel médicament et ses propriétés sont très bien caractérisées *in vitro* et *in vivo* (comme décrit dans les rappels bibliographiques).

Dans cette partie, nous décrivons la radiosynthèse du [¹⁸F]F13640 et son évaluation préclinique chez le rat, le chat et le primate non-humain en vue d'une potentielle utilisation chez l'humain en TEP. Dans différentes expériences nous avons évalué la distribution, la spécificité et le métabolisme du traceur, ainsi que ses propriétés d'agoniste (sensibilité au découplage des récepteurs 5-HT_{1A} et à la sérotonine endogène) en comparaison avec un radiotracer antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A} bien caractérisé, le [¹⁸F]MPPF.

II - Matériel et méthodes

2.1 Radiosynthèse

2.1.1 Production du radioisotope

La production du fluor 18 est assurée par le cyclotron du CERMEP (modèle IBA Cyclone 18/9) par l'intermédiaire d'une réaction nucléaire de type $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$. Pour cela, de l'eau enrichie en oxygène 18 est bombardée par des protons de haute énergie cinétique. Le fluorure $^{18}\text{F}^-$ obtenu est concentré sur une cartouche d'extraction en phase solide avant d'être utilisé pour l'obtention du traceur fluoré à partir d'un précurseur.

2.1.2 Radiosynthèse des traceurs fluorés

La radiosynthèse est effectuée par un automate de fluoration en cellule blindée. Après séchage du fluor 18, une réaction de substitution nucléophile du groupement nitro du précurseur par le fluor 18 est réalisée dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) pendant 10 min en présence de Kryptofix 2.2.2, à 150°C ou 175°C selon la molécule.

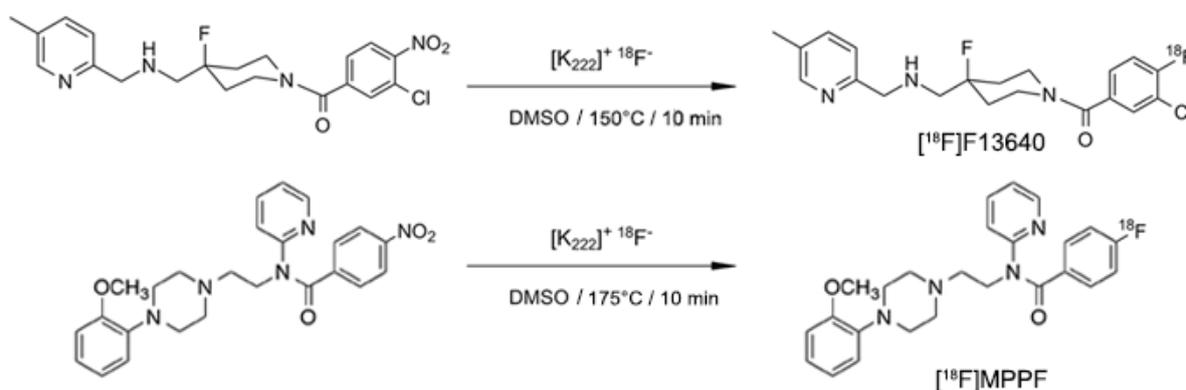


Figure 31 : Schémas réactionnels des radiosynthèses du $[^{18}\text{F}]$ F13640 et du $[^{18}\text{F}]$ MPPF par des réactions de substitution nucléophile.

Il y a ensuite une étape de pré-purification sur colonne, avant purification et collecte du produit final par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Le radiotracer est dilué dans du NaCl 0.9% pour une administration injectable, puis soumis à un contrôle qualité pharmaceutique correspondant à une CLHP avec détection UV et radioactivité (UV = 254 nm ; C18 Nucleodur 5 μm , colonne de 4.6 x250 mm [Macherey-Nagel]; élution avec un

solvant composé de 20 mM H₃PO₄/tétrahydrofurane/MeOH 77.5/9/13.5, à un débit de 1 mL.min⁻¹). Pour que le produit soit considéré comme conforme, les puretés chimiques et radiochimiques doivent être supérieures à 95%. L'activité spécifique doit être assez élevée pour injecter des doses traceuses, c'est-à-dire sans activité pharmacologique. On considère généralement que l'occupation des récepteurs par le traceur doit être inférieure à 5%, voire 1% (Hume *et al.*, 1998 ; Lancelot et Zimmer, 2010).

2.2 Animaux

Toutes les expérimentations animales ont été réalisées selon les directives du Conseil de la Communauté Européenne relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales (2010/63/EU), et après accord du comité d'éthique animale CELYNE de Lyon. Des rats mâles adultes de souche Sprague Dawley (Charles River Laboratories, France) pesant 300+/-50g ont été utilisés dans toutes nos expériences. Ils sont hébergés dans des conditions standardisées de température (22°C) et d'humidité (50%), et ont accès à l'eau et la nourriture ad libitum. La lumière est réglée pour un cycle jour/nuit de 12h.

Des chats mâles européens sont utilisés pour l'imagerie TEP. Leur hébergement se fait dans une pièce commune de stabulation (24°C et 50% d'humidité) avec une lumière artificielle de 7h à 19h, et nourriture et eau ad libitum.

Dans le cadre d'une collaboration avec MNI (Molecular Neuroimaging Inc), une femelle singe rhésus (*Macaca mulatta*) hébergée à l'Université de médecine de Yale (New Haven, CT) a été utilisée pour d'autres acquisitions TEP. L'animal était hébergé dans des conditions standardisées et les expériences ont été réalisées en accord avec la législation des Etats-Unis et avec accord de l'IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) de Yale University.

2.3 Traitements pharmacologiques

2.3.1 WAY-100635

Le WAY-100635, ((N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-ethyl]-N-(2-pyridinyl)-cyclohexacarboxamide-trihydrochloride, Sigma Aldrich, France), est un antagoniste

spécifique des récepteurs 5-HT_{1A}. Il est utilisé à une concentration de 1 à 5 mg/kg dilué dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour administration *in vivo*.

2.3.2 8-OH-DPAT

Le 8-OH-DPAT (8-hydroxy-2-(di-N-propylamino) tetraline, Tocris, Grande Bretagne) est un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A}. Il est utilisé à une concentration de 2 mg/kg dilué dans du sérum physiologique.

2.3.3 Gpp(NH)p

Le Gpp(NH)p (5'-guanylyl imido diphosphate, Sigma-Aldrich, France) est un analogue non hydrolysable du GTP (guanosine triphosphate) qui permet le découplage des récepteurs liés aux protéines G (Mongeau *et al.*, 1995).

2.3.4 Fenfluramine

La fenfluramine (N-Ethyl- α -methyl-m-[trifluorométhyl]phenethylamine hydrochloride, Sigma-Aldrich, France) est un dérivé amphétaminique induisant une augmentation de sérotonine extracellulaire par relargage des vésicules de stockage et inhibition de la recapture (Bonanno *et al.*, 1994). Elle est utilisée de 0,25 mg/kg à 5 mg/kg et diluée dans du sérum physiologique.

2.4 Autoradiographie

2.4.1 Principe

L'autoradiographie est une technique d'histochimie semi-quantitative permettant la détection d'une molécule couplée à un isotope radioactif sur des coupes de tissus. Les coupes sont mises au contact d'un film radiosensible, ce qui permet la visualisation des sites de liaison de la molécule d'intérêt. Le film utilisé est composé d'une fine couche de cristaux photostimulables déposée sur un support en polyester (BAS-MS 2325, Fujifilm). Lorsque les coupes de cerveau à analyser sont mises au contact du film, les émissions radioactives déplacent les électrons de certains cristaux vers un état transitionnel durable. Ces électrons, piégés de manière prolongée entre les bandes de valence et les bandes de conduction, sont

dans une situation de « transition interdite », créant ainsi une image des électrons excités. L'énergie est « mémorisée » par le film, selon la localisation du radiotracteur au sein du tissu. A l'aide d'un phospho-imageur, cette énergie est libérée par stimulation de l'écran avec un faisceau laser hélium-néon qui provoque une émission de lumière bleue captée par un photomultiplicateur. L'image est alors constituée, point par point, par balayage du film en quelques minutes. La finesse du faisceau laser et son pas de déplacement par rapport au plan des cristaux conditionnent la résolution finale de l'image (50 μm). Les films sont régénérables par une source secondaire de lumière.

2.4.2 Prélèvement des tissus

Les rats sont profondément anesthésiés par une induction « flash » à l'isoflurane, puis décapités. Les cerveaux sont prélevés et rincés à l'eau distillée puis congelés dans une solution d'isopentane (2-méthylbutane, Sigma-Aldrich, France) refroidi à -29°C avec de la carboglace. Ils sont ensuite stockés à -80°C pendant quelques jours, ou directement utilisés pour les expériences *ex vivo*. Des coupes coronales de 30 μm d'épaisseur réalisées à l'aide d'un cryostat à -20°C (Leica CM1850, Leica) au niveau des régions d'intérêts repérées grâce à un atlas stéréotaxique de rat (Paxinos et Watson, 1986) puis fixées par adhérence sur des lames de verre sèches (Starfrost). Pour l'autoradiographie *in vitro*, les lames sont conservées à -80°C au minimum pendant trois jours, afin d'augmenter leur adhérence avant utilisation.

2.4.3 Autoradiographie *in vitro*

Le jour de la synthèse du radiotracteur, les lames conservées au préalable à -80°C sont placées à température ambiante durant 30 minutes. Elles sont ensuite incubées pendant 20 min dans un tampon TBS-HCl à pH 7,5 (138 mM NaCl; 2,7 mM KCl, Sigma-Aldrich, France), contenant 37 kBq/mL du radiotracteur [^{18}F]F13640. Pour les expériences de compétitions, divers agents pharmacologiques sont préalablement ajoutés à ce bain d'incubation. La fixation non spécifique est déterminée par compétition avec la sérotonine (à 1 μM , 100 nM, 10 nM et 1 nM) et le WAY-100635 (100 nM, 10 nM et 1 nM). Pour vérifier la préférence du [^{18}F]F13640 pour les récepteurs couplés *in vitro*, des bains d'incubation sont préparés avec du Gpp(NH)p à 10 μM . Pour comparaison, ces expériences *in vitro* ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales avec le [^{18}F]MPPF. Après 20 min d'incubation, les lames

sont rincées dans du tampon TBS-HCl (pH 7,5) à 4°C pendant 90 secondes puis dans de l'eau ppi à 4°C pendant 90 secondes avant séchage. Le film radiosensible est ensuite apposé sur les lames, dans une cassette opaque, pendant une heure. Les images du film sont révélées en quelques minutes grâce au phospho-imageur (BAS-5000, Fuji). Les régions d'intérêts (cortex cingulaire, striatum, hippocampe, cortex entorhinal, noyau du raphé, tronc cérébral et cervelet) sont tracées manuellement avec le logiciel d'analyse (Multi Gauge, Fujifilm), après repérage sur l'atlas du cerveau de rat (Paxinos et Watson, 1986). Le signal non spécifique est soustrait à toutes les valeurs semi-quantitatives obtenues. Les densités optiques obtenues, proportionnelles aux concentrations radioactives, sont exprimées en psl/mm² («phospho stimulated luminescence » par unité de surface) et rapportées en pourcentage par rapport aux valeurs témoins dans chaque expérience, et pour chaque région. Ces pourcentages ont ensuite été moyennés entre toutes les expériences pour l'analyse statistique. Un test ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Dunnett a permis de vérifier l'influence de la concentration en WAY-100635 ou en sérotonine sur l'intensité de marquage dans les différentes régions d'intérêt par rapport au contrôle. Un test t de Student non apparié par rapport à une valeur témoin de 100% a été utilisé pour vérifier l'influence du Gpp(NH)p à 10 µM sur le marquage. Le seuil statistiquement significatif était fixé à p<0.05.

2.4.4 Autoradiographie *ex vivo*

Pour l'induction, les rats sont placés dans une boîte hermétique avec insufflation d'air respirable (1 L/min) et d'isoflurane (AErane, Baxter France) à 4%. L'anesthésie est ensuite maintenue pendant la durée de l'expérience avec un mélange d'air respirable (1 L/min) et d'isoflurane à 2%. Ce type d'anesthésie provoquant une hypothermie, les rats sont placés sur un tapis chauffant pour maintenir la température à 37 ± 0,2 °C. Pour permettre l'injection intraveineuse du radiotracteur, un cathéter est placé au niveau de la veine caudale (BD Insyte-W 24GA, Becton Dickinson Medical, France). Le radiotracteur est injecté à une dose d'environ 111± 11,1 KBq/g (soit 3±0.3 µCi/g) et le cerveau prélevé à différents temps après injection pour autoradiographie. Des coupes de 30 µm d'épaisseur sont réalisées selon la même méthode que pour l'autoradiographie *in vitro*. Les lames sont ensuite séchées et placées dans une cassette autoradiographique avec le film du phospho-imageur pendant 60

minutes. Puis, de la même manière, les images sont révélées et analysées. Pour évaluer la sensibilité du traceur à des fluctuations de sérotonine endogène, des rats ont reçu une injection de sérum physiologique ou de fenfluramine (0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg ou 5 mg/kg ; n=3 par condition) 20 minutes avant injection du traceur ($[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ ou $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ pour comparaison).

2.5 Distribution tissulaire

Les rats sont anesthésiés avec de l'uréthane (Sigma-Aldrich, France) en intrapéritonéal à 1,25 g/kg et cathétérisés au niveau de la veine caudale. L'anesthésie provoquant une hypothermie, l'animal est placé sur un tapis chauffant (CMA/microdialysis AB, Suède) pour maintenir sa température à $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Si l'uréthane permet une anesthésie longue (6h), il est hépatotoxique et doit être réservé à des anesthésies avec euthanasie à l'issue de l'expérience. Après injection du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ à environ 55.5 MBq (soit 1.5 mCi), les rats sont décapités à 15, 30, 45 et 60 minutes post-injection. Différents organes et tissus sont prélevés et rincés : cerveau, foie, coeur, estomac, rein, poumon, rate, intestin, muscle (triceps sural), et os (tibia). Les échantillons sont placés dans des tubes (3 tubes par tissu/organe), pesés, et leur radioactivité est mesurée par un compteur gamma automatique (Cobra II; Packard). On obtient ainsi le pourcentage de dose injectée par gramme de tissu en fonction du temps.

2.6 Analyse des métabolites cérébraux

Les rats sont anesthésiés à l'uréthane et cathétérisés selon la même procédure que précédemment. Après injection intraveineuse du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ à 55.5 MBq $\pm 10\%$, les rats sont décapités à 10, 20, 40 et 50 minutes post-injection. Les cerveaux sont prélevés, et chaque hémisphère est broyé avec un homogénéiseur à ultrasons (Bandelin, Sonopuls) dans 400 μL d'acide perchlorique à 0.4 mol/L (Sigma-Aldrich, France), puis centrifugé à 1000g pendant 10 minutes. Le surnageant est neutralisé dans 120 μL d'acétate de potassium à 4M (Sigma-Aldrich) et filtré à travers des pores de 0.45 μm (GE Water) avant passage en CLHP. Le système CLHP est composé d'une colonne C18 en phase inverse (Nucleodur [Macherey-Nagel], 7.8 x 300 mm), avec pour éluant un mélange à 20 mM de H_3PO_4 /tetrahydrofurane/MeOH 77.5/9/13.5), à un débit de 1 mL/min. Pendant l'élution, des

fractions de 2 minutes sont collectées (15 par hémisphère), et pour chacune la radioactivité est mesurée extemporanément par compteur gamma (Cobra II; Packard). On peut ainsi déterminer à chaque temps d'élution la proportion de radioactivité par rapport à la radioactivité totale sur 30 minutes d'élution, et connaître la proportion de radiotracer inchangé (correspondant au temps d'élution du [¹⁸F]F13640).

2.7 Analyse des métabolites artériels

Les rats sont anesthésiés à l'isoflurane à 4% pendant 5 minutes pour l'induction puis à 2% pour l'entretien de l'anesthésie et placés sur un tapis chauffant pour maintenir la température à 37±0,2 °C. Des cathéters sont placés au niveau de la veine caudale et de l'artère fémorale. Après injection intraveineuse du [¹⁸F]F13640 à environ 37 KBq/g, des échantillons de 200 µL de sang artériel sont collectés à 1, 5, 25, 40, 50 et 60 minutes post-injection. Pour chaque échantillon, 30 µL de sang total sont prélevés et analysés par compteur gamma, le reste étant centrifugé pendant 5 minutes à 5000g pour obtenir le plasma. 30 µL de plasma sont analysés au compteur gamma et 25 µL sont ajoutés à 75 µL d'acétonitrile et 50 µL de F13640 froid (concentration de 1 mg pour 100mL d'acétonitrile). Ce mélange est centrifugé pendant 5 minutes à 5000g et filtré à travers des pores de 0.45 µm avant passage en CLHP (mêmes conditions que dans l'analyse précédente). Pendant l'élution, des fractions de 1 minute sont collectées et pour chacune la radioactivité est mesurée par compteur gamma. Connaissant le temps d'élution du [¹⁸F]F13640, on obtient la fraction plasmatique de traceur inchangé à différents temps post-injection. Afin d'estimer la vitesse de métabolisation, la courbe moyenne des données a été modélisée par une fonction exponentielle (Graphpad, Prism 5).

2.8 Acquisitions microTEP chez le rat

La caméra microTEP utilisée au CERMEP (PET/CT Inveon, Siemens, Germany) est destinée à l'imagerie du petit animal. Le rat est anesthésié par induction à l'isoflurane à 4% pendant 5 minutes et un cathéter est posé au niveau de la veine caudale. Il est ensuite placé en décubitus ventral sur un lit adapté (Bruker Animal Handling Systems). L'anesthésie gazeuse est maintenue pendant toute la durée de l'examen à un taux de 2 % d'isoflurane. La fréquence respiratoire est surveillée grâce à un capteur de pression connecté à un

ordinateur (Biovet, USA). L'acquisition TEP démarre après un scanner de transmission X de 10 minutes. Le radiotracer est injecté en bolus à environ 37 kBq/g (1 μ Ci/g), via le cathéter implanté dans la veine caudale. La durée totale d'acquisition est de 60 minutes. Les images sont reconstruites en 3 dimensions sur une série de 24 « frames » de durée croissante de 20 secondes à 5 minutes. Les régions d'intérêts sont tracées automatiquement grâce à un multi-atlas neuroanatomique du rat (Lancelot *et al.*, 2014), après recalage manuel de l'image TEP sur le template de l'IRM anatomique dans le logiciel IRW (Inveon Research Workplace, Siemens). Les valeurs de radioactivité obtenues sont exprimées en Becquerel par unité volumique (Bq/cm³) puis en SUVs (Standard Uptake Value ; radioactivité normalisée par rapport au poids de l'animal et à la dose injectée) pour comparaison entre différentes acquisitions. Pour les expériences de compétition, deux rats ont été injectés avec du WAY-100635 (2 mg/kg, i.v), en coinjection avec le [¹⁸F]F13640. Deux autres rats ont été préinjectés avec du 8-OH-DPAT (2 mg/kg, i.v), 20 minutes avant l'acquisition. Pour évaluer la sensibilité du [¹⁸F]F13640 à la libération de sérotonine, deux rats ont reçu une injection de fenfluramine (1 mg/kg, i.v) 20 minutes avant ou 10 minutes après le début de l'acquisition.

2.9 Acquisitions TEP chez le chat

Les examens TEP des chats ont été réalisés sur une caméra PET/CT Biograph mCT (Siemens). L'induction de l'anesthésie se fait dans une boîte hermétique avec insufflation d'un mélange d'air respirable (3 L/min) et d'isoflurane à 5% pendant 5 min. L'anesthésie est maintenue avec un mélange d'air respirable à 2 L/min et 3 \pm 0,5% d'isoflurane. Pour l'injection du traceur, le cathéter (BD Insite-W 24GA, Becton Dickinson Medical, France) est inséré dans la veine de la patte antérieure après rasage. Une perfusion de NaCl 0,9% à bas débit est mise en place pour éviter la coagulation. Le chat est placé en décubitus ventral dans un cadre stéréotaxique en plexiglas, la tête maintenue dans le champ de la caméra TEP grâce à des barres d'oreilles. Durant tout l'examen, un tapis chauffant à circulation d'eau (Hamilton, Industries, Ohio, USA) maintient sa température à 38 \pm 0,2°C. Pour vérifier les constantes du chat (rythme cardiaque et saturation en oxygène), nous plaçons un oxymètre de pouls (Nonin 9847V, Nonin Medical Inc., Plymouth, USA) au niveau du bout de la patte arrière. Un scanner de transmission est réalisé durant 10 min grâce à la source de rayons X embarquée sur l'appareil. Le radiotracer est injecté en bolus de 74 MBq (2 mCi). La durée

d'acquisition est de 90 min, divisée en 31 « frames » séquentielles de durée croissante de 30 secondes à 10 minutes. Les images sont reconstruites et les régions d'intérêts sont tracées automatiquement grâce à un atlas importé dans IRW, après coregistration manuelle de l'image TEP sur l'IRM anatomique du même chat. Les courbes de radioactivité régionales sont exprimées en Becquerel par unité volumique (Bq.cm⁻³) et en SUVs. Des potentiels de fixation (ou BP, « Binding Potential ») ont été calculés en utilisant l'analyse graphique non-invasive de Logan (BP_{ND} par rapport au compartiment non déplaçable, estimé à l'aide d'une région de référence). Dans l'expérience de blocage, le chat a reçu une injection de WAY-100635 à 1 mg/kg en i.v, 30 minutes avant l'injection du traceur. Le taux d'occupation du WAY-100635 sur les sites de fixation du traceur a été estimé par la formule :

$$\text{Occupation (\%)} = \frac{\text{BP}_{\text{ND}}(\text{Contrôle}) - \text{BP}_{\text{ND}}(\text{WAY100635})}{\text{BP}_{\text{ND}}(\text{Contrôle})} \times 100$$

2.10 Acquisitions TEP chez le singe rhésus

Les acquisitions TEP chez le singe rhésus ont été réalisées par MNI à New Haven sur une caméra Focus 220 PET Scanner (Siemens). L'anesthésie de l'animal est induite par une injection intramusculaire de kétamine (10 mg/kg) et glycopyrrolate (0,01 mg/kg) deux heures avant injection du traceur, et l'animal est immédiatement intubé avec apport d'isoflurane à 2% pour l'entretien de l'anesthésie. Un cathéter est placé dans une veine de la patte pour l'injection du radiotracer. La température corporelle est maintenue à 37-38°C grâce à un tapis chauffant à circulation d'eau. Les signes vitaux tels que la fréquence cardiaque, la pression artérielle, la fréquence respiratoire, la saturation en oxygène et la température corporelle sont surveillés durant toute l'acquisition. Suite à l'injection intraveineuse de [¹⁸F]F13640 (175 ± 9 MBq), les données TEP dynamiques sont acquises en 3D continuellement pendant 180 minutes et reconstruites en séries de 45 « frames » comme suit : 6 x 0.5 min, 3 x 1 min, 2 x 2 min, 26 x 5 min. Les images TEP reconstruites sont analysées avec le logiciel Pmod (Pmod Technologies). L'image témoin de l'animal est normalisée sur un template IRM de cerveau de singe rhésus INIA19 (Rohlfing *et al.*, 2012). L'image en condition de préblocage est coregistrée à l'image témoin correspondante. Un atlas est appliqué afin d'extraire les cinétiques dans les différentes régions d'intérêt. La quantité de radioactivité est exprimée en Becquerel par unité volumique (Bq.cm⁻³) et en

SUVs. Des potentiels de fixation (ou BP, « Binding Potential ») ont également été calculés en utilisant l'analyse graphique non-invasive de Logan (BP_{ND} par rapport au compartiment non déplaçable, estimé à l'aide d'une région de référence). Dans l'expérience de blocage, le singe a reçu une injection de WAY-100635 à 2 mg/kg en i.v, 6 minutes avant l'injection du traceur. Le taux d'occupation du WAY-100635 sur les sites de fixation du traceur a été estimé par la même formule que précédemment.

III - Résultats

3.1 Radiosynthèse

Le $[^{18}F]F13640$ a été obtenu à partir du précurseur nitré avec un rendement radiochimique de 6% corrigé de la décroissance et une durée de radiosynthèse de 90 minutes. Aucune trace de produit radioactif contaminant n'a été observée et les conditions CLHP choisies ont permis la bonne séparation du traceur par rapport à son précurseur, confirmé par le contrôle qualité (figure 32). La pureté radiochimique obtenue était au moins supérieure à 95%. L'activité spécifique était comprise entre 9 et 80 GBq/ μ mol.

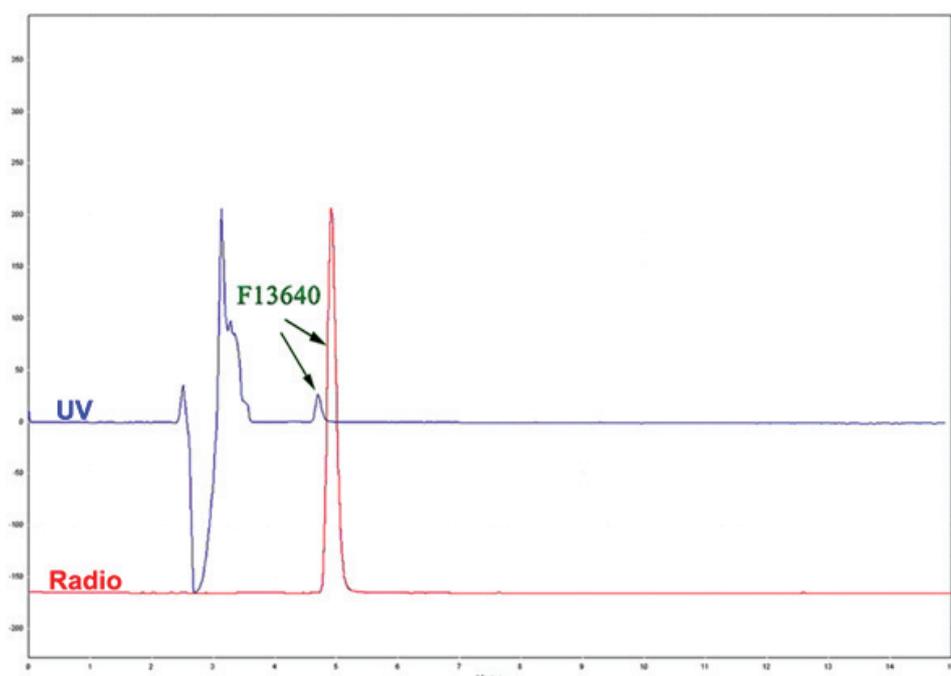


Figure 32 : Chromatogramme du contrôle qualité du $[^{18}F]F13640$. L'absorbance UV à 254 nm et la radioactivité permettent le calcul de la pureté radiochimique.

Pour les expériences de comparaison, le [^{18}F]MPPF a été synthétisé selon une procédure précédemment décrite (Le Bars *et al.*, 1998), avec un rendement radiochimique de 25% corrigé de la décroissance. La pureté radiochimique était supérieure à 98%. L'activité spécifique était comprise entre 37 et 111 GBq/ μmol .

3.2 Autoradiographie *in vitro*

3.2.1 Distribution *in vitro*

La distribution cérébrale du [^{18}F]F13640 a été évaluée par autoradiographie *in vitro* chez le rat et comparée avec l'antagoniste [^{18}F]MPPF (figure 33). La fixation la plus élevée se situe au niveau de l'hippocampe, particulièrement dans le gyrus denté et l'aire CA3, ainsi que dans le cortex entorhinal. Le marquage est également important dans le noyau du raphé dorsal, le septum latéral et le cortex cingulaire. En revanche la fixation est quasiment indétectable au niveau du striatum et du cervelet. De manière générale, les sites de fixations du [^{18}F]F13640 *in vitro* sont très proches de ceux de l'antagoniste [^{18}F]MPPF et fortement corrélés à la distribution établie des récepteurs 5-HT $_{1A}$.

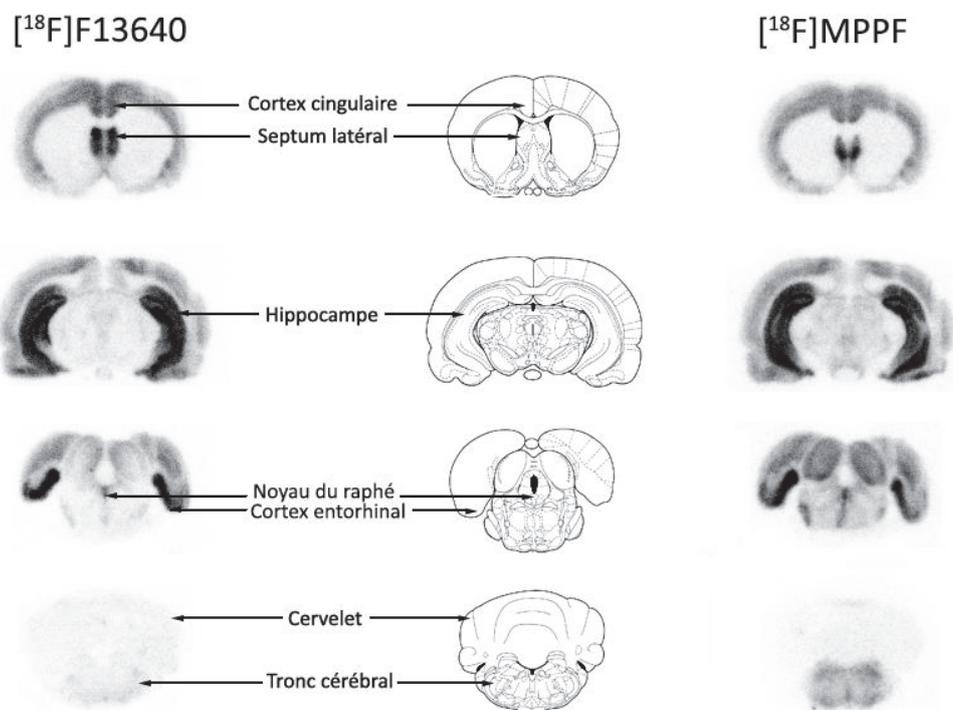


Figure 33 : Autoradiogrammes *in vitro* du [^{18}F]F13640 comparé au [^{18}F]MPPF chez le rat, et diagrammes anatomiques correspondant aux régions d'intérêt.

Dans l'hippocampe, la fixation du [^{18}F]F13640 est 9,4 fois plus élevée que dans le cervelet. Dans les régions corticales riches en récepteurs 5-HT $_{1A}$, ce ratio de fixation par rapport au cervelet oscille entre 4 et 5 (5,1 dans le cortex entorhinal et 4,4 dans le cortex cingulaire), ce qui est comparable avec le noyau du raphé dorsal (ratio de 4,6). Dans ces régions, le [^{18}F]MPPF présente des ratios deux fois plus élevés en moyenne (figure 34). Dans les régions peu marquées comme le striatum, ce ratio est proche de 1 pour les deux traceurs.

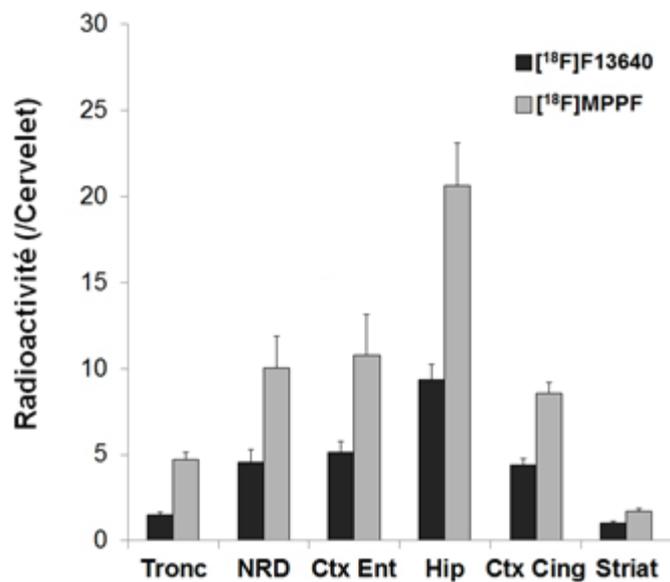


Figure 34 : Ratios de l'intensité du marquage en autoradiographie dans différentes régions d'intérêt par rapport au cervelet (\pm SEM), comparaison entre le [^{18}F]F13640 ($n=4$) et le [^{18}F]MPPF ($n=9$). Ctx Cing : cortex cingulaire, Ctx Ent : cortex entorhinal, Hip : hippocampe ventral, NDR : noyau du raphé dorsal, Striat : striatum, Tronc : tronc cérébral.

3.2.2 Compétitions *in vitro*

La fixation du [^{18}F]F13640 est diminuée proportionnellement à l'ajout de concentrations croissantes de l'antagoniste 5-HT $_{1A}$ WAY-100635 dans le bain d'incubation (figure 35). Cette compétition s'observe dans les aires fortement marquées comme l'hippocampe et le cortex cingulaire (-83% et -67% avec 100 nM de WAY-100635, respectivement) mais pas dans le cervelet, ni dans le striatum.

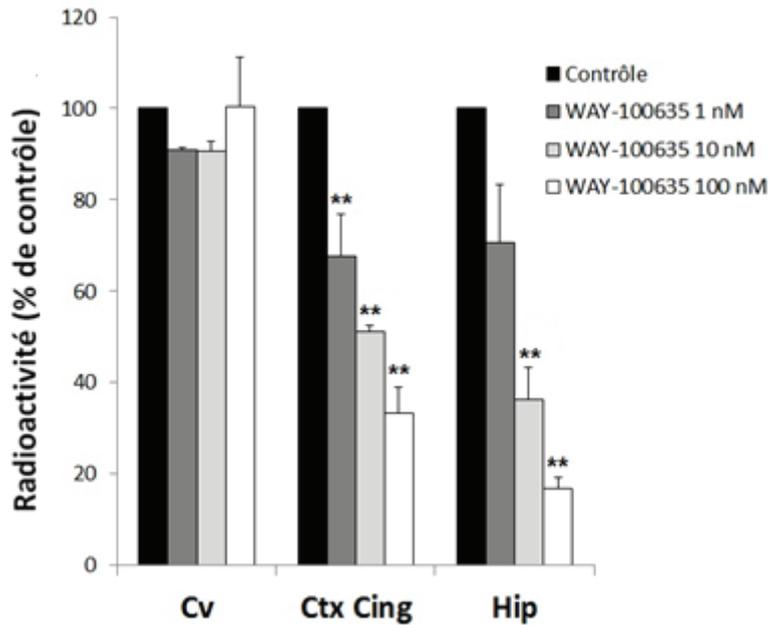


Figure 35 : Compétition *in vitro* chez le rat entre le $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ et le WAY-100635 à concentrations croissantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (\pm SEM). Ctx Cing: cortex cingulaire ; Cv : cervelet ; Hip : hippocampe ($n=3$, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

La sérotonine inhibe également la fixation du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ de manière concentration-dépendante (figure 36). La compétition est plus modeste qu'avec l'antagoniste WAY-100635 et significative à partir de 10 nM dans le cortex entorhinal (-57%, $p<0.001$), et 100 nM dans le raphé dorsal (-42%, $p<0.05$), et l'hippocampe (-54%, $p<0.001$).

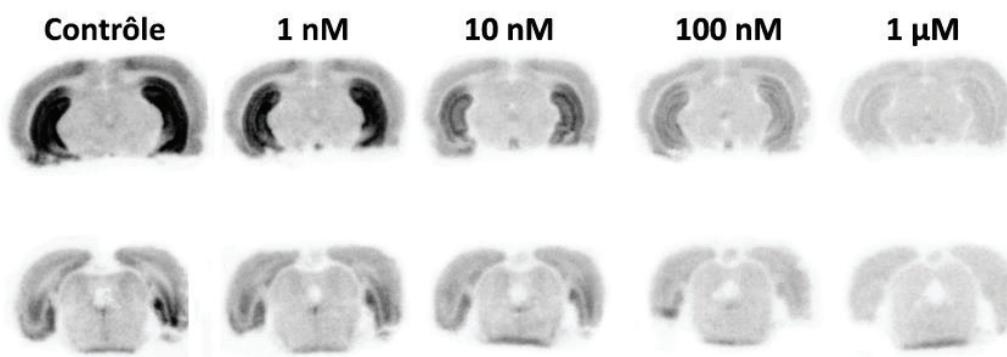


Figure 36 : Autoradiogrammes *in vitro* du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ sur coupes de cerveau de rat (hippocampe, raphé dorsal et cortex entorhinal) avec concentrations croissantes de sérotonine.

Pour comparaison, la figure 37 montre que le [^{18}F]MPPF présente une sensibilité à la sérotonine équivalente aux plus fortes concentrations, mais à 1 nM de sérotonine la fixation du [^{18}F]MPPF a tendance à augmenter, ce qui n'est pas observé avec le [^{18}F]F13640.

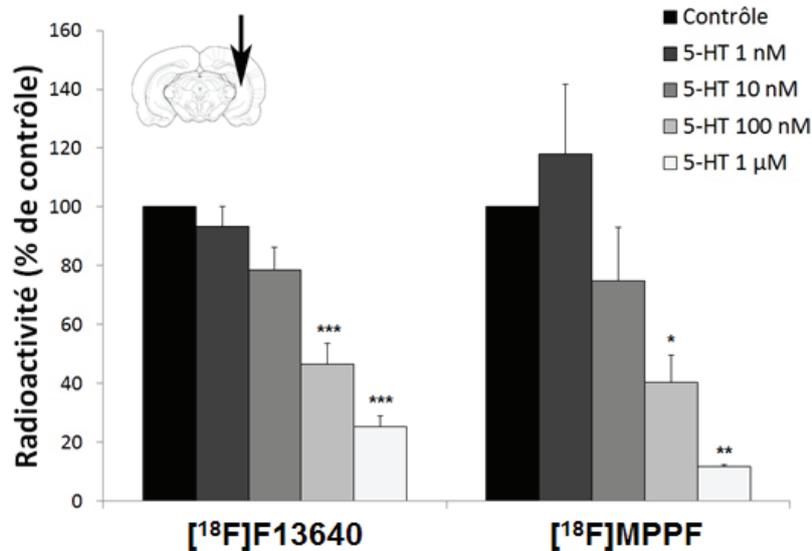


Figure 37 : Compétition *in vitro* entre le [^{18}F]F13640 ou le [^{18}F]MPPF et la sérotonine à concentrations croissantes dans l'hippocampe de rat (localisé par la flèche). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (\pm SEM). ($n=4$, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

L'effet d'un découplage *in vitro* des protéines G a été évalué par ajout de Gpp(NH)p à 10 μM dans le milieu d'incubation (Figure 38). Cela se traduit par une inhibition importante de la fixation du [^{18}F]F13640, particulièrement l'hippocampe et le cortex entorhinal (respectivement -50.7 % et -49.1%, $p<0.05$, test t de Student). En revanche, la fixation du [^{18}F]MPPF en présence de Gpp(NH)p est comparable à la condition témoin. On peut même noter au contraire une augmentation du marquage, bien que cette observation soit très variable en fonction des échantillons et non significative (+73 % dans le gyrus denté et +257 % dans le cortex entorhinal, $p>0.05$).

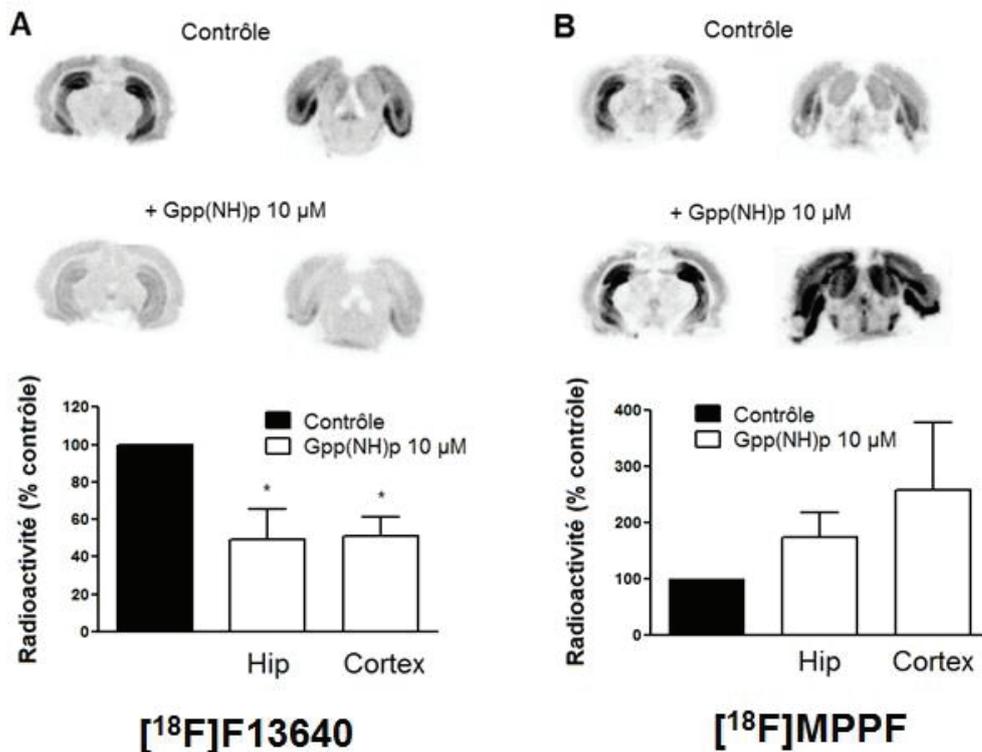


Figure 38 : Autoradiogrammes *in vitro* du $[^{18}\text{F}]$ F13640 et du $[^{18}\text{F}]$ MPPF obtenus en présence de 10 μM de Gpp(NH)p. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (\pm SEM). Hip : hippocampe ; Cortex : cortex entorhinal. A : Gpp(NH)p en présence de $[^{18}\text{F}]$ F13640 ($n=4$, $*p<0.05$). B : Gpp(NH)p en présence de $[^{18}\text{F}]$ MPPF ($n=3$).

3.3 Autoradiographie *ex vivo*

3.3.1 Distribution *ex vivo*

Les études autoradiographiques *ex vivo* réalisées après injection intraveineuse du traceur montrent une distribution sensiblement différente des résultats *in vitro*, avec un marquage plus uniforme et un écart moindre entre le signal dans le cervelet et dans les autres régions (Figure 39). La fixation est importante au niveau du raphé dorsal, du tronc cérébral et du thalamus (ratios respectifs par rapport au cervelet : 2,3 ; 2,28 ; 2,1), modérée dans l'hippocampe et le cortex cingulaire (ratios de 1,71 et 1,75) et plus faible dans le striatum (1,37). A noter que contrairement aux résultats *in vitro* le marquage dans l'hippocampe n'est pas uniforme et se situe surtout en périphérie, au niveau de la couche pyramidale.



Figure 39 : Autoradiogrammes *ex vivo* de coupes coronales de cerveau de rat, prélevées 20 minutes après injection de [¹⁸F]F13640.

3.3.2 Sensibilité à la sérotonine extracellulaire

Dans d'autres expériences d'autoradiographie *ex vivo*, les rats ont reçu une pré-injection de fenfluramine à différentes doses afin d'étudier la sensibilité du [¹⁸F]F13640 à la libération de sérotonine endogène. La fixation du traceur est inhibée proportionnellement à la dose de fenfluramine dans de nombreuses régions (figure 40). Dans l'hippocampe, le cortex cingulaire et le raphé dorsal, la compétition est significative dès la dose de 0,5 mg/kg (diminution de respectivement 28, 26 et 35% par rapport au contrôle) et maximale à la dose de 5 mg/kg (diminution 72,74 et 77% par rapport au contrôle). En comparaison, la fenfluramine n'induit pas de diminution significative de la fixation du [¹⁸F]MPPF dans les mêmes conditions, malgré une tendance observée à 5 mg/kg (figure 41).

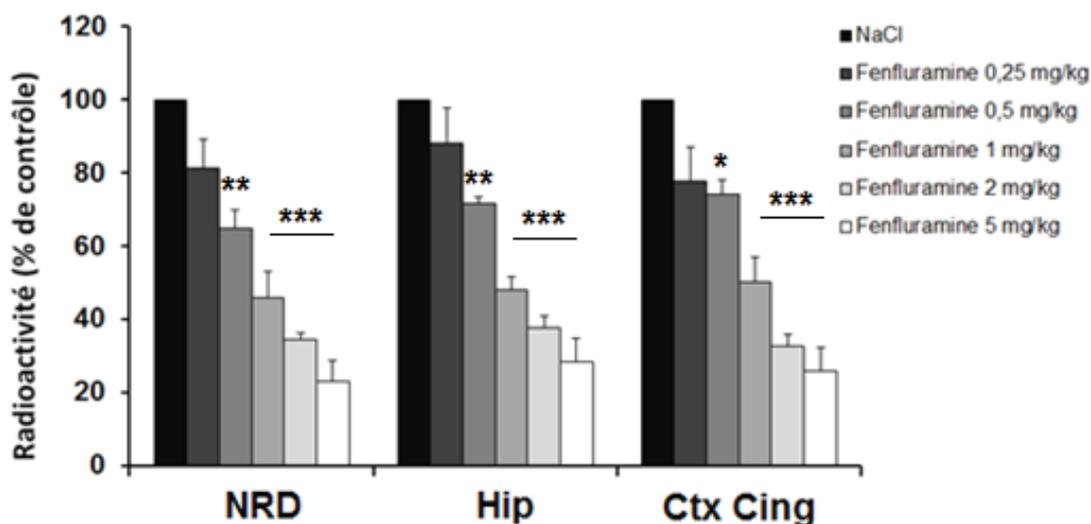


Figure 40 : Effets de la préinjection de doses croissantes de fenfluramine sur la fixation cérébrale du [¹⁸F]F13640 chez le rat (n=3). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (\pm SEM). Ctx Cing : cortex cingulaire ; Hip : hippocampe ; NRD : noyau du raphé dorsal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

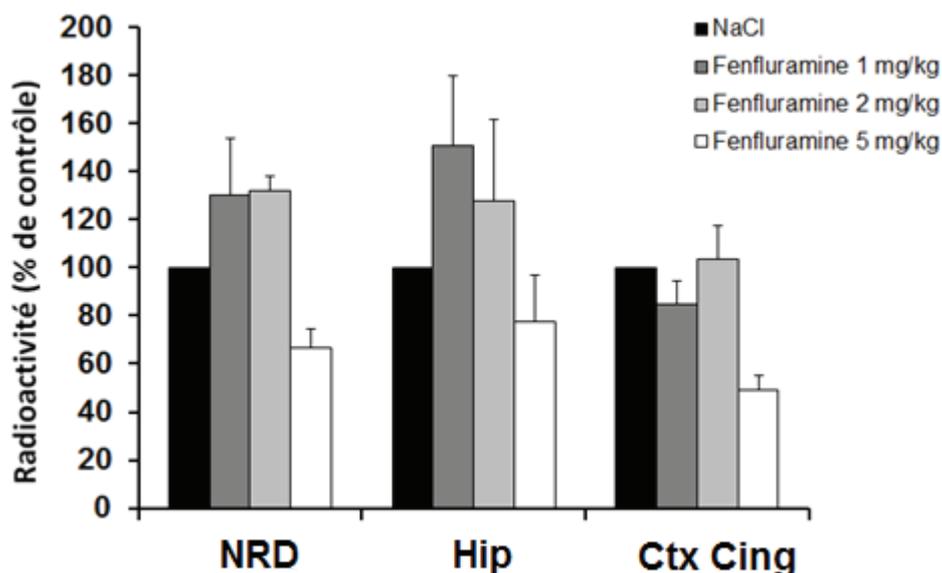


Figure 41 : Effets de la préinjection de doses croissantes de fenfluramine sur la fixation cérébrale du [¹⁸F]MPPF chez le rat (n=3). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (± SEM).

3.4 Biodistribution, métabolisme et pharmacocinétique du [¹⁸F]F13640 chez le rat

3.4.1 Distribution tissulaire

La distribution du traceur après injection intraveineuse chez le rat est variable selon les organes (figure 42). Dans le cerveau, le [¹⁸F]F13640 est présent à hauteur d'environ 0,7 % de la dose injectée par gramme de tissu après injection, puis diminue lentement au cours du temps avec encore plus de 0,5% de la dose injectée par gramme au bout d'une heure. La radioactivité est plus faible dans la plupart des autres tissus et organes comme les poumons, l'estomac ou la rate, où la quantité maximale est mesurée à 15 minutes post-injection et réduite de moitié au bout d'une heure. La radioactivité est la plus concentrée au niveau du foie et des reins, où elle représente 2 à 3% de la dose injectée par gramme de tissu pendant la première heure après injection.

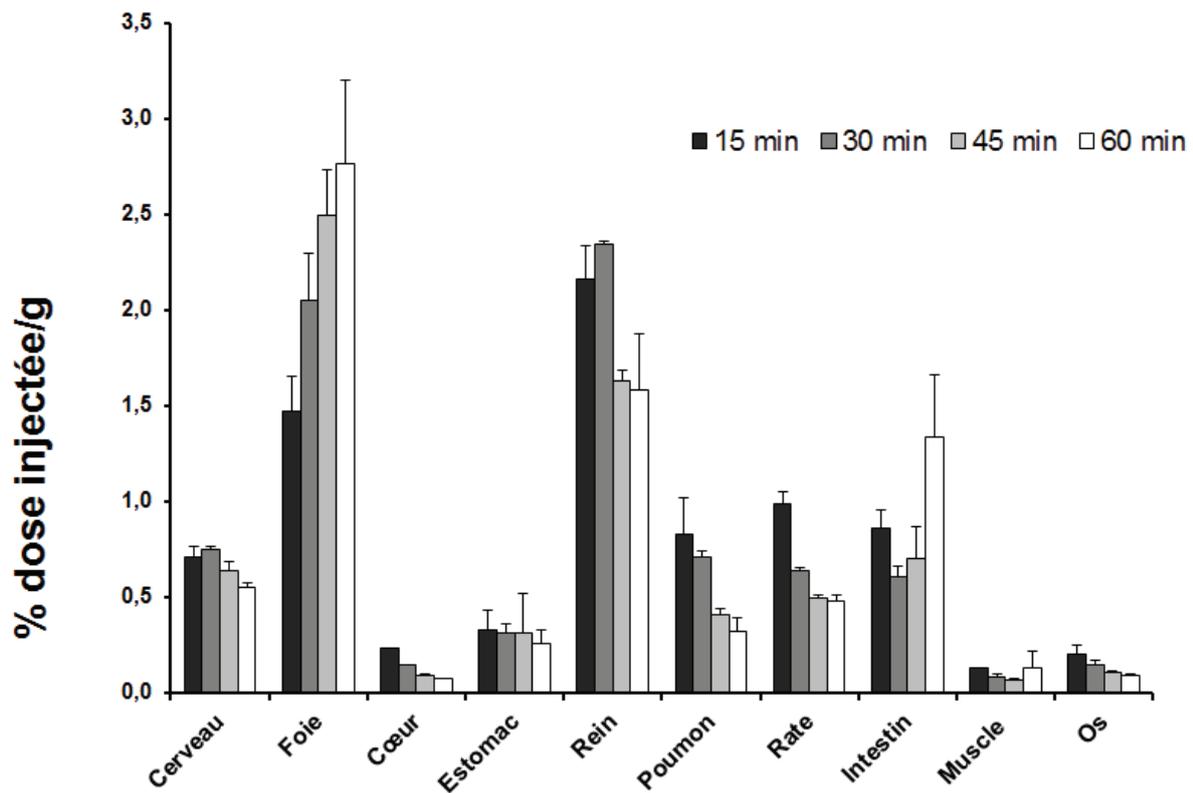


Figure 42 : Distribution tissulaire du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ de 15 à 60 minutes après injection i.v. chez le rat ($n=2$). Les résultats sont exprimés en pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (\pm SEM).

3.4.2 Métabolites cérébraux

De 10 à 50 minutes après injection du radiotracer, la proportion de radioactivité par rapport à la radioactivité totale sur 30 minutes d'élution est maximale au temps de rétention du F13640, entre 4 et 6 minutes d'élution (supérieure à 90 % jusqu'à 20 minutes, et supérieure à 85 % ensuite ; voir figure 43). Durant les 50 premières minutes après injection, une grande majorité de la radioactivité cérébrale correspond donc au $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ inchangé.

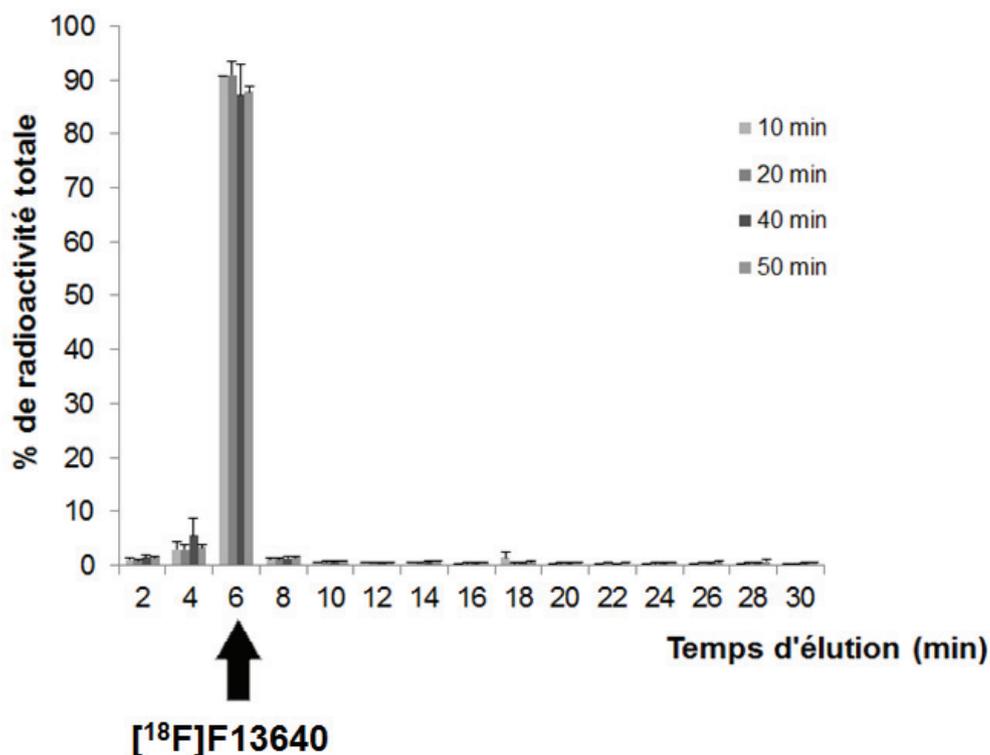


Figure 43 : Radiochromatogramme indiquant la proportion de $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ inchangé dans le cerveau de 10 à 50 minutes après injection i.v chez le rat ($n=2$). Les résultats sont indiqués en pourcentage par rapport à la radioactivité totale sur 30 minutes d'élution en CLHP (\pm SEM).

3.4.3 Métabolites artériels

Dans le plasma, le $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ inchangé correspond à plus de 90% de la radioactivité pendant les 5 premières minutes après injection i.v, pour atteindre une proportion de 50% plus d'une heure après injection (figure 44). La concentration plasmatique du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ inchangé au cours du temps peut être modélisé par une exponentielle décroissante d'ordre 1, d'équation $Y = 100e^{-0.009798X}$, où Y est la concentration plasmatique et X le temps en minutes ($R^2=0,9113$). Selon cette décroissance on estime la demi-vie du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ à 70,7 minutes (figure 45).

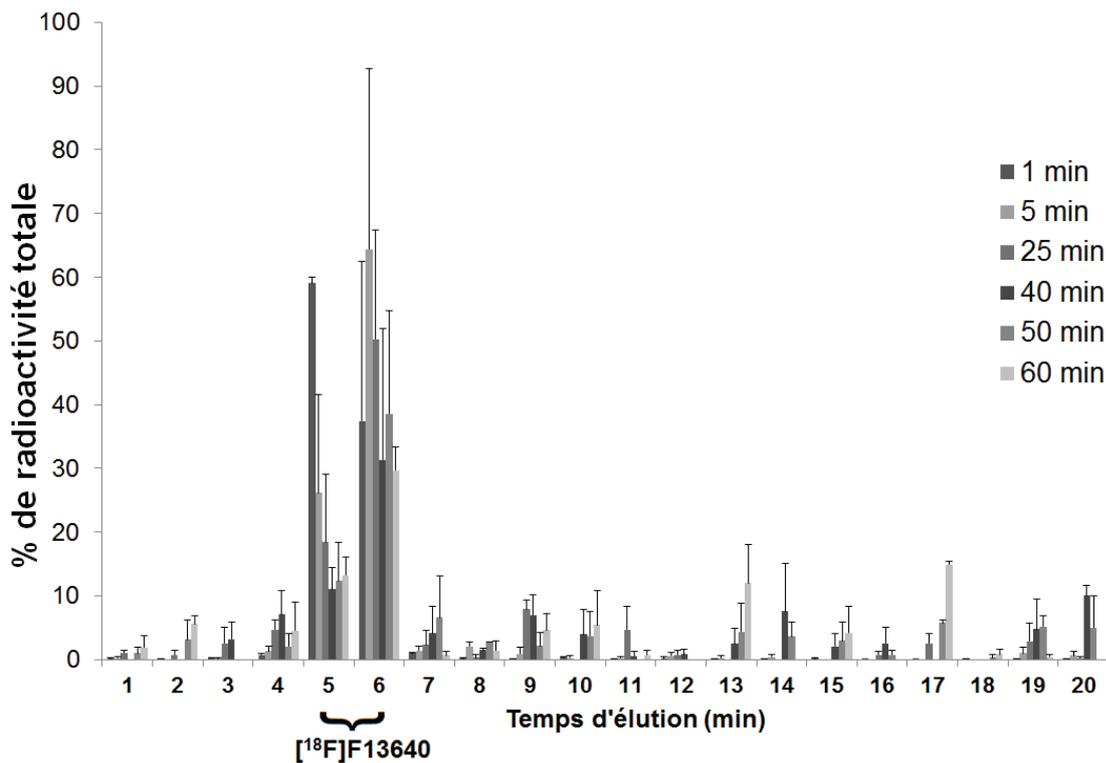


Figure 44 : Radiochromatogramme indiquant la proportion de [¹⁸F]F13640 inchangé dans le plasma de 1 à 60 minutes après injection i.v chez le rat (n=2). Les résultats sont indiqués en pourcentage par rapport à la radioactivité totale sur 20 minutes d'élution en CLHP (± SEM).

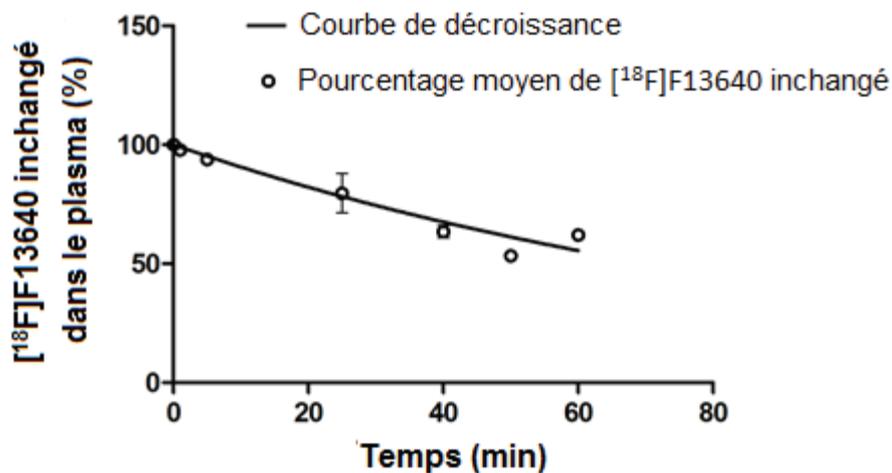


Figure 45 : Concentration plasmatique du [¹⁸F]F13640 après injection i.v chez le rat (n=2), et modélisation de la courbe de décroissance permettant le calcul de la demi-vie. Les points représentent les valeurs moyennes (± SEM).

3.5 MicroTEP chez le rat

3.5.1 Distribution *in vivo*

La cartographie *in vivo* du [¹⁸F]F13640 en microTEP chez le rat montre une fixation élevée au niveau du raphé dorsal, du tronc cérébral et du thalamus, intermédiaire dans l'hippocampe et le cortex cingulaire, et plus faible dans le cervelet (figure 46A). Les cinétiques indiquent une pénétration rapide et importante du traceur dans tout le cerveau suivi d'une élimination très lente, avec une intensité de marquage presque inchangée au bout d'une heure d'acquisition. Pour comparaison entre les régions, les SUVR ont été moyennés entre 10 et 60 minutes et des ratios ont été calculés par rapport au cervelet (SUVR). Ces ratios sont de 1,55 et 1,44 dans le raphé dorsal et le tronc cérébral, 1,26 dans le thalamus, et 1,2 dans l'hippocampe et le cortex cingulaire.

3.5.2 Blocage et compétition *in vivo*

L'injection i.v. de l'antagoniste 5-HT_{1A} WAY-100635 à 2 mg/kg en coinjection avec le [¹⁸F]F13640 induit une diminution de 30 à 45 % de la fixation du traceur. La compétition s'observe dans toutes les régions y compris le cervelet, résultant en des SUVR inchangés comparé aux acquisitions témoin (figure 46B).

La préinjection i.v. de l'agoniste 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT à 2 mg/kg 20 minutes avant le début de l'acquisition entraîne un blocage de la fixation du [¹⁸F]F13640 de 83 à 89% et augmente drastiquement la pente des courbes cinétiques : à la fin de l'acquisition, la radioactivité est quasi absente du cerveau. Les SUVR sont diminués (entre 1,1 et 1,2 pour les différentes régions d'intérêt ; figure 46B).

3.5.3 Sensibilité à la sérotonine endogène *in vivo*

Des expériences préliminaires ont été réalisées en microTEP pour évaluer la sensibilité du traceur à la libération de sérotonine. Chez un rat préinjecté avec une dose de 1 mg/kg de fenfluramine en i.v. 20 minutes avant l'acquisition, la fixation du [¹⁸F]F13640 est fortement réduite de 65 à 70% comparé à l'acquisition contrôle chez le même animal (figure 47A). Les SUVR sont toutefois peu modifiés car le signal est également réduit dans le

cervelet. L'injection de fenfluramine à la même dose chez un rat pendant l'acquisition induit une cassure de la pente des cinétiques dans toutes les régions d'intérêt (y compris le cervelet), traduisant un déplacement du traceur de ses sites de fixation (figure 47B).

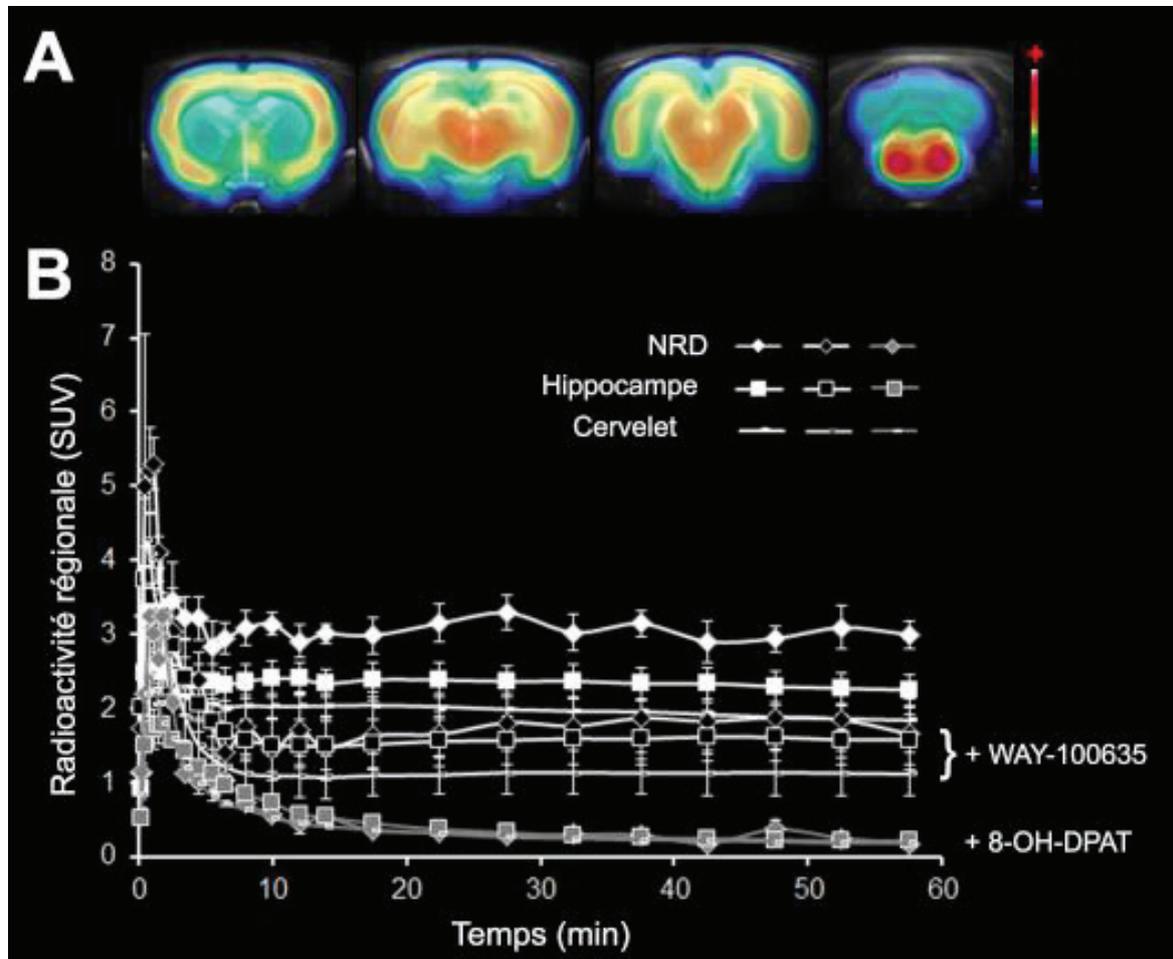


Figure 46 : A - Images microTEP du $[^{18}\text{F}]$ F13640 chez le rat en coupes coronales moyennées sur 60 minutes d'acquisition, superposées au template IRM. Echelle de couleurs proportionnelle à la radioactivité en SUVs (bleu = basse, rouge = élevée). B - Courbes cinétiques de la radioactivité moyenne (en SUVs \pm SEM) dans différentes régions d'intérêt au cours d'une heure d'acquisition ; groupe contrôle en blanc (n=4), co-injection de WAY-100635 à 2 mg/kg en noir (n=2), préinjection de 8-OH-DPAT à 2 mg/kg en gris (n=2).

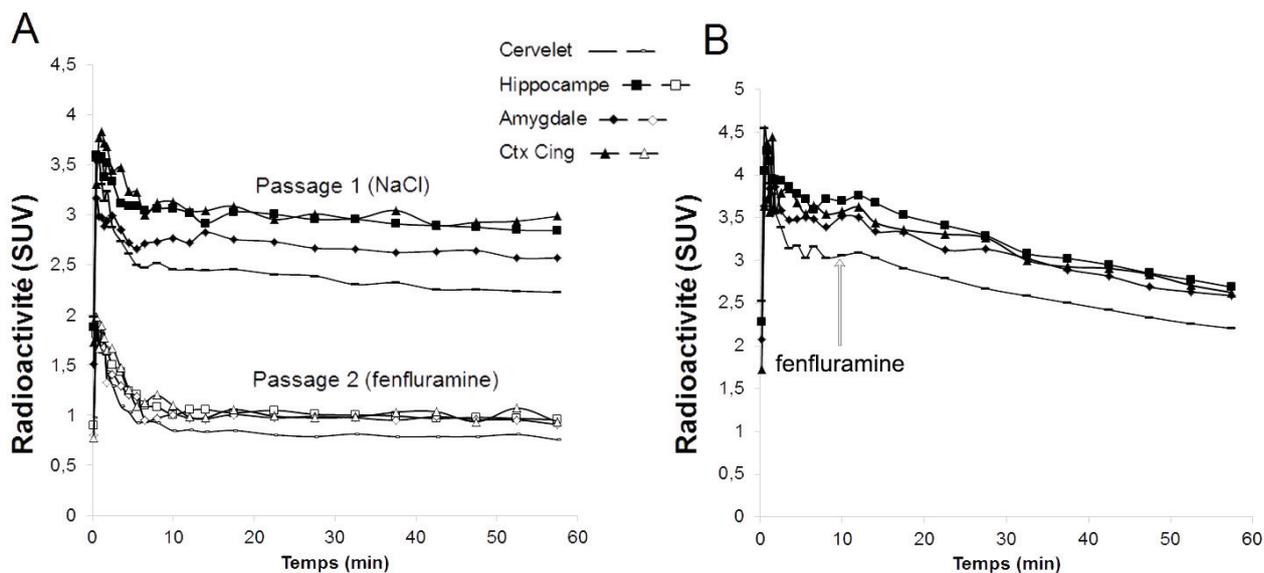


Figure 47 : Effets de l'injection i.v de fenfluramine sur les cinétiques TEP du $[^{18}\text{F}]$ F13640 chez le rat. A – Comparaison de deux acquisitions chez le même animal, une acquisition contrôle avec préinjection de sérum physiologique 20 minutes avant l'acquisition (en noir) et une acquisition avec préinjection de fenfluramine à 1 mg/kg (en blanc). B – Injection de fenfluramine à 1 mg/kg, 10 minutes après le début de l'acquisition. Résultats exprimés en SUVs.

3.6 TEP chez le chat

3.6.1 Distribution *in vivo*

Chez le chat et similairement au rat, on retrouve une accumulation rapide du $[^{18}\text{F}]$ F13640 dans tout le cerveau, avec une élimination très lente (figure 48).

La distribution du traceur est plus hétérogène que chez le rat, avec une fixation élevée dans les aires corticales (notamment le cortex cingulaire antérieur), l'insula, le thalamus, l'amygdale, le raphé dorsal et le tronc cérébral, modérée dans l'hippocampe, le septum et le caudé et faible dans la matière blanche et le cervelet. On remarque que le marquage dans le cervelet est hétérogène : une fixation notable est retrouvée dans les lobes et le vermis tandis que les noyaux plus internes contiennent le signal le plus faible. Des SUVRs ont été calculés pour chaque région entre 30 et 90 minutes par rapport à ces noyaux du cervelet, avec des valeurs de 2,95 dans l'amygdale, 2,91 dans le cortex cingulaire, 2,83 dans le thalamus, 2,73 dans le raphé dorsal, 2,31 dans le septum, 1,55 dans l'hippocampe et 1,39 dans le striatum (moyennes en test-retest). Ces SUVR sont très peu variables entre les deux

acquisitions chez le même animal, et l'écart-type varie entre 1 et 6 % excepté dans l'hippocampe où il est de 19% (l'écart-type global toutes régions confondues est inférieur à 4%).

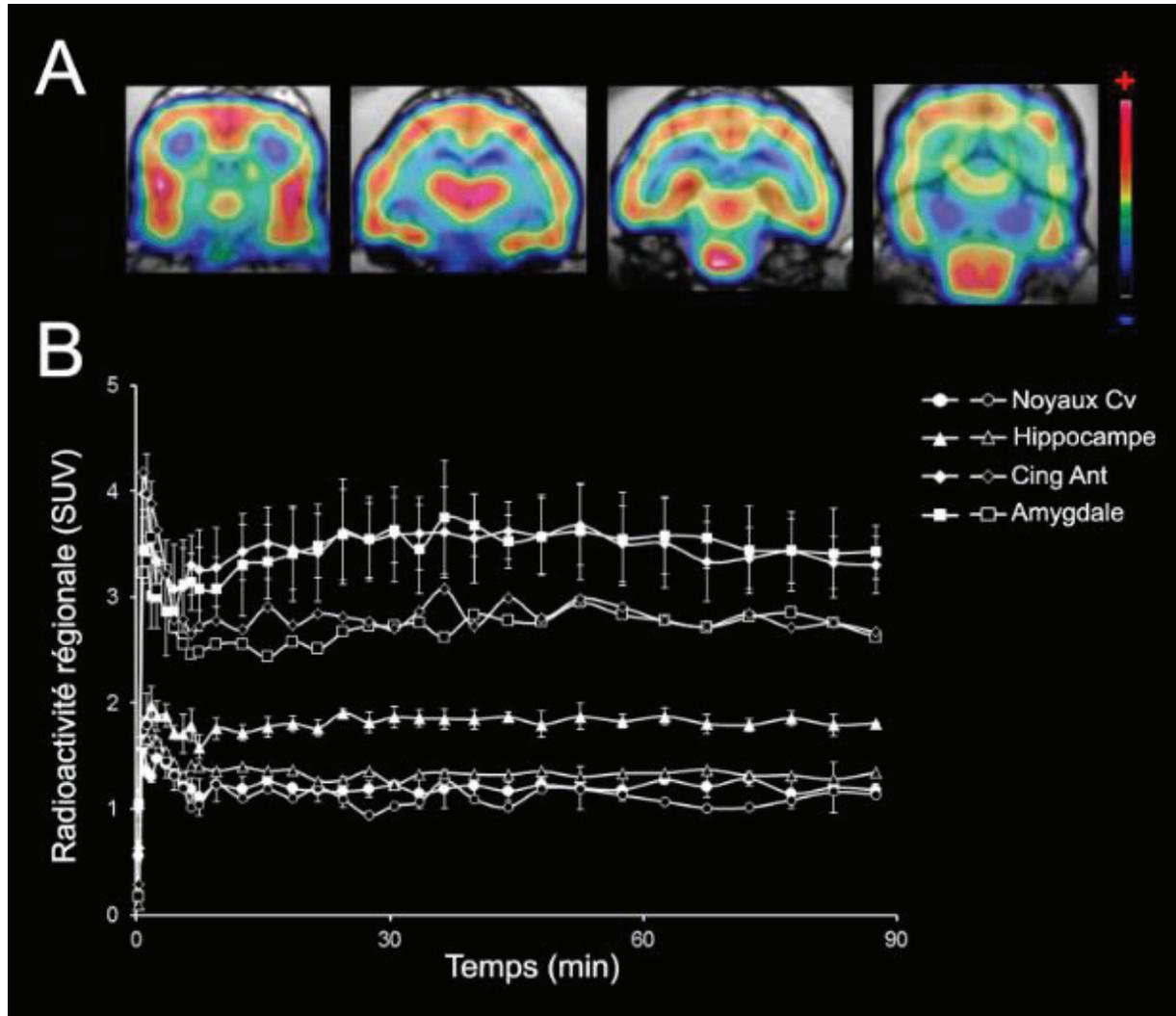


Figure 48 : A - Images TEP du $[^{18}\text{F}]$ F13640 chez le chat en coupes coronales moyennées sur 90 minutes d'acquisition, superposées au template IRM. Echelle de couleurs proportionnelle à la radioactivité en SUVs (bleu = basse, rouge = élevée). B - Courbes cinétiques de la radioactivité moyenne (en SUVs \pm SEM) dans différentes régions d'intérêt au cours d'une heure d'acquisition ; moyenne test-retest en blanc, pré-injection de WAY-100635 à 1 mg/kg en noir. Cing Ant = cortex cingulaire antérieur ; Noyaux Cv = noyaux du cervelet.

3.6.2 Blocage *in vivo*

La pré-injection de 1 mg/kg de WAY-100635 en i.v 30 minutes avant l'acquisition s'accompagne d'une diminution de la quantité de radioactivité dans toutes les régions, sauf dans les noyaux du cervelet où les variations sont moindres (figure 48B). Les SUVR sont

réduits de 10 à 25% par rapport aux examens test-retest en utilisant cette région comme référence. En comparant les potentiels de fixation calculés par la méthode de Logan (BP_{ND}) entre 30 et 90 minutes avec les noyaux du cervelet comme référence, on obtient un taux d'occupation des sites de fixation du $[^{18}F]F13640$ par le WAY-100635 estimé entre 15% dans le cortex cingulaire antérieur et 61% dans l'hippocampe.

3.7 TEP chez le singe rhésus

3.7.1 Distribution *in vivo*

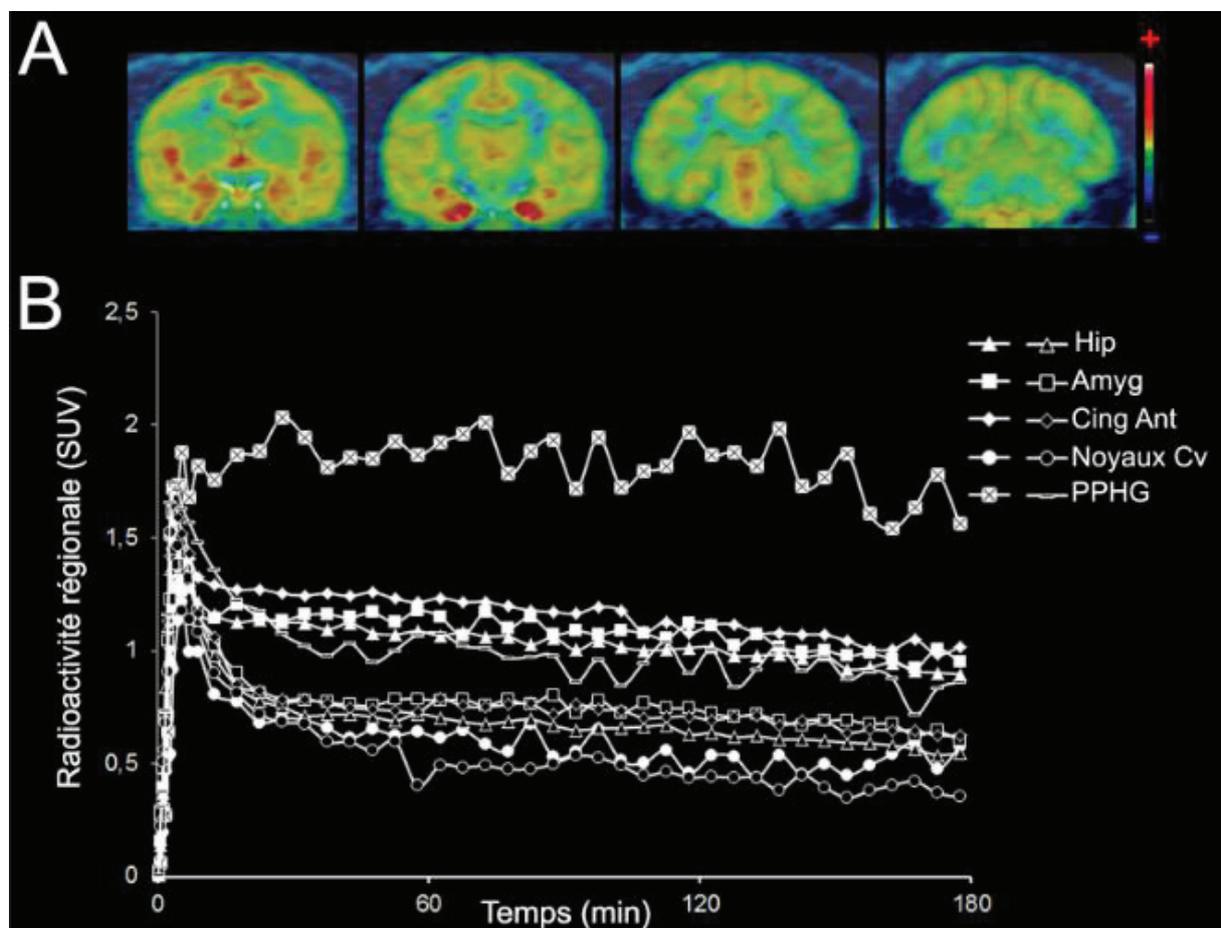


Figure 49 : A - Images TEP du $[^{18}F]F13640$ chez un singe rhésus en coupes coronales moyennées entre 60 et 180 minutes d'acquisition, superposées au template IRM. Echelle de couleurs proportionnelle à la radioactivité en SUVs (bleu = basse, rouge = élevée). B - Courbes cinétiques de la radioactivité moyenne (en SUVs \pm SEM) dans différentes régions d'intérêt au cours d'une heure d'acquisition ; acquisition contrôle en blanc, pré-injection de WAY-100635 à 2 mg/kg en noir. Amyg = amygdale ; Cing Ant = cortex cingulaire antérieur ; Hip = hippocampe ; Noyaux Cv = noyaux du cervelet ; PPHG = gyrus parahippocampique postérieur.

La distribution cérébrale du [^{18}F]F13640 chez le singe rhésus est élevée et rapide, à hauteur de 1,5% de la dose injectée 5 minutes après injection, et une élimination lente mais visible au cours de l'acquisition contrairement aux espèces précédentes. La fixation est élevée dans l'amygdale, l'insula, l'hippocampe, l'hypothalamus, le cortex cingulaire antérieur et les noyaux du raphé (figure 49). Le gyrus parahippocampique présente un signal remarquablement élevé compare aux autres régions. Enfin, la fixation la plus faible est observée dans le cortex occipital et le cervelet, où le marquage est hétérogène comme chez le chat (fixation au niveau des lobes et du vermis, moindre dans les noyaux). Si la distribution du [^{18}F]F13640 était similaire entre les deux singes utilisés, il faut noter une variation importante de la quantité de traceur dans le cerveau, avec des SUVs deux fois plus élevée chez le deuxième primate comparé au premier. Toutefois les SUVR rapportés aux noyaux du cervelet sont comparables (figure 50).

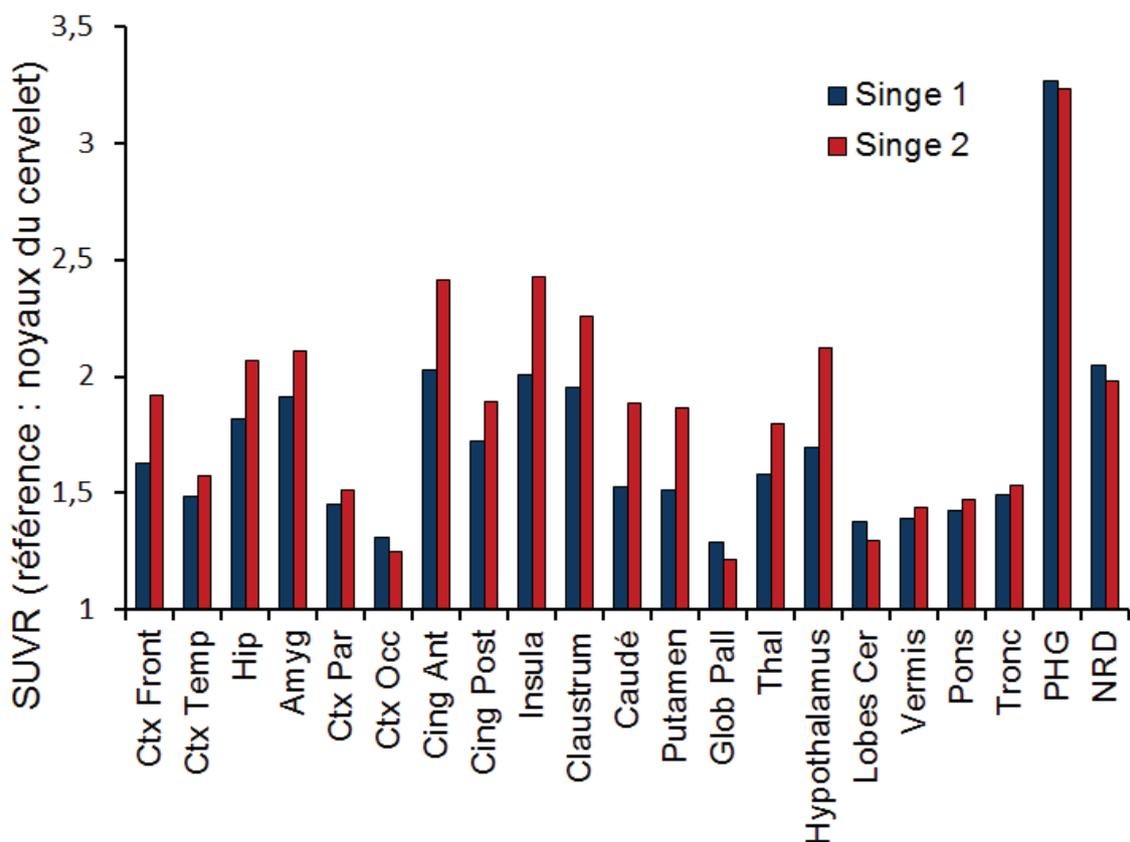


Figure 50 : Distribution cérébrale du [^{18}F]F13640 chez deux singes rhésus. Valeurs rapportées en SUVR avec les noyaux du cervelet comme région de référence.

3.7.2 Blocage *in vivo*

L'injection i.v de WAY-100635 à 2 mg/kg 6 minutes avant l'acquisition TEP induit une diminution de la fixation du [¹⁸F]F13640 chez le singe 1 dans la plupart des régions excepté la matière blanche et les noyaux du cervelet (figure 49B et tableau 3). Des BP_{ND} ont été calculés par Logan non invasif avec les noyaux du cervelet comme référence afin d'estimer le taux d'occupation du WAY-100635, qui varie chez ce singe entre 38 et 88% (53 % en moyenne). Le blocage le plus important se situe au niveau du cortex occipital et du cortex pariétal (88% et 71%, respectivement). Le blocage est également élevé dans le cortex cingulaire postérieur, l'hippocampe, le gyrus parahippocampique et le raphé dorsal (respectivement 61%, 52%, 55% et 52%) mais aussi dans des régions comme le caudé-putamen, le thalamus (46% dans ces régions) et même les lobes du cervelet (55%).

Tableau 3. Fixation du [¹⁸F]F13640 chez le singe rhésus (analyse graphique de Logan avec les noyaux du cervelet comme région de référence).

	BP _{ND}		Taux d'occupation
	Contrôle	WAY-100635	WAY-100635 (2 mg/kg)
Cortex frontal	0.60	0.28	53%
Cortex temporal	0.46	0.19	59%
Hippocampe	0.81	0.39	52%
Amygdale	0.91	0.57	38%
Cortex pariétal	0.43	0.12	71%
Cortex occipital	0.28	0.03	88%
Cingulaire antérieur	1.02	0.55	46%
Cingulaire postérieur	0.71	0.28	61%
Insula	1.00	0.55	45%
Clastrum	0.96	0.58	40%
Caudé	0.50	0.23	53%
Putamen	0.49	0.29	40%
Globus Pallidus	0.27	0.14	49%
Thalamus	0.56	0.30	46%
Hypothalamus	0.71	0.44	38%
Cervelet (lobes)	0.34	0.11	66%
Vermis	0.35	0.11	70%
Pons	0.43	0.24	45%
Tronc cérébral	0.49	0.25	48%
Gyrus parahippocampique	2.34	1.05	55%
Noyau du raphé dorsal	1.01	0.48	52%

IV - Discussion

Malgré de nombreuses tentatives depuis des années, il n'y a actuellement pas de radiotracer à la fois fluoré, agoniste entier et spécifique des récepteurs 5-HT_{1A} disponible pour l'imagerie TEP. Dans ce contexte, notre laboratoire s'est intéressé à une série d'agonistes très spécifiques, avec une affinité et une efficacité élevée vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{1A}, développés initialement par les laboratoires pharmaceutiques Pierre Fabre (Maurel *et al.*, 2007). En plus de ces atouts, ces molécules présentent l'avantage d'être très bien caractérisées tant au niveau *in vitro* que *in vivo* et présentent un atome de fluor dans leur structure remplaçable par un fluor 18. Notre laboratoire a préalablement radiomarké et évalué deux analogues de cette série, le F15599 et le F13714 (Lemoine *et al.*, 2010 ; Lemoine *et al.*, 2012). Malgré la possibilité de visualiser les récepteurs 5-HT_{1A} *in vivo* avec ces deux molécules, le ratio signal/bruit du [¹⁸F]F15599 était insuffisant pour être développé comme radiopharmaceutique (Lemoine *et al.*, 2010). Au contraire, ce ratio était bien supérieur pour le [¹⁸F]F13714 mais la fixation du traceur est irréversible chez le primate non humain (Yokoyama *et al.*, 2016 ; Tavares *et al.*, 2013), compliquant la quantification des paramètres de fixation (Logan, 2000).

Nous nous sommes ici intéressés à une troisième molécule de cette série, le F13640, qui présente une affinité intermédiaire pour les récepteurs 5-HT_{1A} comparé au F15599 et au F13714 (1 nM contre 2,24 nM et 0,1 nM, respectivement – Maurel *et al.*, 2007 ; Newman-Tancredi *et al.*, 2009), avec l'objectif d'obtenir un rapport signal/bruit satisfaisant et des cinétiques plus favorables. Comme ses analogues, c'est une molécule avec une sélectivité sans précédent pour les récepteurs 5-HT_{1A}, son affinité pour 46 autres récepteurs, enzymes et transporteurs étant au moins 1000 fois plus faible (Colpaert *et al.*, 2002). Le F13640 présente également une activité d'agoniste particulièrement efficace dans tous les essais *in vitro* et *in vivo* dans lesquels il a été caractérisé (Colpaert *et al.*, 2002 ; Heusler *et al.*, 2010 ; Wurch *et al.*, 2003 ; Newman-Tancredi *et al.*, 2017). Enfin, il présente un atome de fluor permettant un radiomarkage sans modification de la structure chimique du composé.

L'objectif de cette étude a donc été d'évaluer le [¹⁸F]F13640 comme potentiel radiotraceur TEP adapté à l'imagerie des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels. L'enjeu est d'obtenir un traceur utilisable chez l'animal et l'humain et permettant à la fois :

- de déterminer *in vivo* une cartographie des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels, en comparant l'imagerie de cet agoniste avec celle d'un antagoniste ;
- d'évaluer les fluctuations sérotonine extracellulaire de manière non invasive grâce à un agoniste plus sensible à des déplacements sous l'influence du ligand endogène ;
- de mesurer la sensibilisation ou la désensibilisation des récepteurs 5-HT_{1A} au cours de processus physiopathologiques ;
- de mesurer le taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels par des agonistes à doses cliniquement actives.

Dans cette optique, nous avons évalué de manière inédite le [¹⁸F]F13640, selon plusieurs critères que nous allons détailler point par point dans cette discussion.

Radiosynthèse

Le traceur est synthétisé par radiomarquage du précurseur en remplaçant le groupement nitré par un fluor 18 par substitution nucléophile. Le mode opératoire de la radiosynthèse est similaire à celui qui a été utilisé pour les autres agonistes de la série ([¹⁸F]F15599 et [¹⁸F]F13714), et nous avons pu produire le [¹⁸F]F13640 avec une absence d'impureté radiochimique détectable lors du contrôle qualité en CLHP. L'activité spécifique était comprise entre 9 et 80 GBq/μmol sur l'ensemble des expériences, mais supérieure à 46 GBq/μmol en moyenne pour les résultats *in vivo* présentés, ce qui vérifie amplement les conditions pour l'utilisation en TEP. On préconise en effet l'administration de doses « traceuses », ce qui correspond classiquement à une occupation de la cible inférieure à 5%, voire 1% (Lancelot et Zimmer, 2010 ; Hume *et al.*, 1998). D'après Hume *et al.*, le taux d'occupation est fonction de la dose injectée, de l'activité spécifique, du poids de l'animal et de la dose efficace 50 (ED₅₀) à administrer *in vivo* pour occuper 50% des récepteurs. Si l'on se base sur l'ED₅₀ du F13640 pour inhiber 50% des sites de fixation du [³H]8-OH-DPAT chez le rat, soit 0,34 mg/kg (Bardin *et al.*, 2005), l'activité spécifique doit être supérieure à 4,2 GBq/μmol dans nos expériences chez le rat, 1,7 GBq/μmol dans nos expériences chez le chat

et 2,2 GBq/ μ mol dans nos expériences chez le singe rhésus pour occuper moins de 1% des récepteurs. On peut donc conclure que la radiosynthèse du [18 F]F13640 est satisfaisante pour l'utilisation en imagerie TEP, en termes de pureté radiochimique et d'activité spécifique.

Passage de la barrière hémato-encéphalique

La première condition indispensable pour l'imagerie de récepteurs centraux est de s'assurer que le radiotracer est capable de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les échanges moléculaires entre les interfaces sang-cerveau sont finement régulés, et de nombreuses molécules possédant des propriétés adéquates *in vitro* ne peuvent pas atteindre le cerveau, notamment à cause d'une lipophilie insuffisante pour diffuser à travers la membrane, ou parce qu'elles sont les substrats de protéines d'efflux transmembranaires telles que les P-gp (Pike, 2009). Dans notre étude, les expériences de distribution tissulaire montrent un passage satisfaisant de la barrière hémato-encéphalique par le [18 F]F13640. Une proportion relativement importante de la dose injectée se retrouve dans le cerveau du rat, à hauteur de 0,7% par gramme de tissu. Pour comparaison, cette proportion est de 0,1% environ avec le [18 F]MPPF, avec un protocole expérimental similaire (Plenevaux *et al.*, 2000). Le [18 F]MPPF est un substrat des P-gp chez le rat, ce qui est susceptible d'expliquer cette différence (Lacan *et al.*, 2008).

Distribution dans l'organisme entier

Après injection i.v du [18 F]F13640, une forte proportion de la radioactivité est localisée dans le foie, l'intestin et les reins, suggérant une excrétion biliaire et rénale de la molécule après probable métabolisation hépatique. Dans les autres organes prélevés, la radioactivité est faible et décroît dès la première heure post-injection, en faveur d'une absence d'accumulation dans ces tissus, y compris les tissus osseux. Cette condition est importante à vérifier car certains traceurs fluorés subissent une défluorination rapide *in vivo*, ce qui produit une accumulation dans les os (notamment le crâne) et altère la qualité de l'image (Tipre *et al.*, 2006). Par ailleurs, la demi-vie plasmatique du traceur chez le rat est d'environ 70 minutes suggérant que le [18 F]F13640 est suffisamment stable pour l'imagerie TEP.

Analyse des métabolites radioactifs cérébraux

Un autre point crucial lors du développement d'un nouveau radiotracer cérébral est de vérifier que sa métabolisation n'aboutit pas à la production de métabolites radioactifs capables de franchir la barrière hémato-encéphalique et « polluer » le signal radioactif mesuré en TEP (Pike, 2009). Les analyses CLHP de lysat de cerveau de rat montrent que la radioactivité *in situ* est due en majorité au [¹⁸F]F13640 inchangé (encore plus de 85% de la radioactivité totale après 50 minutes post-injection). Ces données sont en faveur d'une très faible présence de métabolites radioactifs cérébraux chez le rat pendant la première heure post-injection, confirmant que le signal radioactif mesuré dans les expériences *in vivo* chez le rat correspond au [¹⁸F]F13640.

Distribution cérébrale *in vitro*

La distribution du [¹⁸F]F13640 est très comparable à celle du [¹⁸F]MPPF chez le rat en autoradiographie *in vitro*, avec une fixation élevée dans l'hippocampe, le noyau du raphé dorsal, le cortex entorhinal et le cortex cingulaire, et absente dans le cervelet, en accord avec la distribution établie des récepteurs 5-HT_{1A}. Les ratios de densité optique entre chaque région et le cervelet sont environ deux fois plus élevés avec le [¹⁸F]MPPF, ce qui peut s'expliquer par les propriétés pharmacologiques respectives des deux traceurs puisque le [¹⁸F]F13640 est supposé se fixer principalement sur les récepteurs couplés, contrairement au [¹⁸F]MPPF (Assié *et al.*, 1999). Il faut noter qu'ici nous n'avons mesuré que la densité optique, ce qui ne constitue qu'une estimation de la fixation du traceur. Il serait intéressant de quantifier l'affinité K_d et la densité de sites de liaison B_{max} dans chaque région par des expériences de saturation de la liaison à l'équilibre afin de confirmer ces suppositions.

Nous avons effectué des expériences de compétition *in vitro* entre le [¹⁸F]F13640 et des doses croissantes de WAY-100635, un antagoniste 5-HT_{1A}. Le WAY-100635 diminue significativement le marquage de manière dose-dépendante dans les zones riches en récepteurs 5-HT_{1A} comme l'hippocampe et le cortex entorhinal. Dès les faibles concentrations, la compétition est significative (dès 10 nM pour l'hippocampe, p < 0.001 ; dès 1 nM pour le cortex entorhinal et cingulaire, p < 0.01). Dans les régions présentant peu de récepteurs 5-HT_{1A} comme le striatum et le cervelet, aucune compétition n'a été mise en

évidence. Ces données sont en faveur d'un marquage *in vitro* très spécifique des récepteurs 5-HT_{1A} par le [¹⁸F]F13640 chez le rat.

Comportement d'agoniste 5-HT_{1A} *in vitro*

Au-delà de la spécificité du traceur, il était crucial de vérifier que le [¹⁸F]F13640 privilégie les récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels (couplés aux protéines G). Nous avons donc testé en autoradiographie *in vitro* deux caractéristiques propres au profil d'agoniste du [¹⁸F]F13640 : la diminution de fixation du radiotracer après découplage des récepteurs 5-HT_{1A}, et la sensibilité accrue du radiotracer aux fluctuations de la sérotonine, agoniste endogène.

Pour tester la sensibilité du [¹⁸F]F13640 au découplage des protéines G nous avons utilisé le Gpp(NH)p, un analogue non hydrolysable du GTP. Une concentration de 10 µM de l'agent découplant provoque une inhibition importante et significative de la fixation du [¹⁸F]F13640 dans les régions d'intérêt ($p < 0.05$). A contrario, le découplage *in vitro* a tendance à augmenter le signal du [¹⁸F]MPPF. Si cette augmentation n'est pas significative dans nos résultats, elle a déjà été rapportée dans de précédentes études utilisant le [¹⁸F]MPPF comme radiotracer (Lemoine *et al.*, 2010). Dans tous les cas, ces résultats suggèrent que le [¹⁸F]F13640 présente bien une affinité supérieure pour les récepteurs sous forme fonctionnelle, contrairement à l'antagoniste. Pour la sensibilité à la sérotonine, nous avons ajouté des doses croissantes du neurotransmetteur dans le bain d'incubation. Cela se traduit par une inhibition significative et dose-dépendante de la fixation du [¹⁸F]F13640 aux récepteurs 5-HT_{1A}. La diminution de marquage est très significative dans le cortex entorhinal et dans l'hippocampe dès 10 nM et 100 nM de sérotonine, respectivement ($p < 0.01$ et $p < 0.001$). L'antagoniste [¹⁸F]MPPF, présente également une sensibilité à la compétition avec la sérotonine dans ces mêmes régions à des concentrations comparables, mais de manière moins significative ($p < 0.05$ dans l'hippocampe à partir de 100 nM de sérotonine). De plus, à une concentration faible de 1 nM de 5-HT la fixation du [¹⁸F]MPPF a tendance à augmenter comparé au contrôle, alors que celle du [¹⁸F]F13640 a tendance à diminuer. La fixation du [¹⁸F]F13640 est donc inversement corrélée à la quantité de sérotonine *in vitro*, même à faibles doses, ce qui le distingue du [¹⁸F]MPPF. Cela peut s'expliquer par une compétition directe pour les mêmes sites de fixation entre les deux agonistes, alors que le [¹⁸F]MPPF se

fixe aussi à des récepteurs de basse affinité pour la sérotonine. Ces expériences en autoradiographie *in vitro* convergent vers des différences de propriétés pharmacologiques entre les deux radiotraceurs malgré une spécificité commune pour les récepteurs 5-HT_{1A}, soutenant l'intérêt potentiel d'utiliser le [¹⁸F]F13640 en imagerie *in vivo* pour obtenir des informations inédites par rapport aux radioligands antagonistes.

Distribution du [¹⁸F]F13640 *in vivo*

Si la répartition des sites de fixation du [¹⁸F]F13640 *in vitro* est très proche de celle des autres radiotraceurs 5-HT_{1A} (en dépit d'une préférence pour les récepteurs couplés), la distribution cérébrale du traceur *in vivo* se révèle bien différente et se démarque clairement des molécules antagonistes. Chez le rat, les régions qui présentent le marquage le plus intense sont le tronc cérébral dans son ensemble, le thalamus et le noyau du raphé dorsal, tandis que la fixation dans l'hippocampe et le cortex cingulaire est modérée, à peine plus élevée que dans le striatum. De même, chez le chat la fixation du traceur *in vivo* est élevée dans le cortex cingulaire, l'insula et l'amygdale, des régions connues pour une densité importante de récepteurs 5-HT_{1A}, mais aussi dans le thalamus et l'ensemble du tronc. Similairement au rat, le noyau du raphé dorsal présente aussi un signal important, et dans l'hippocampe le signal est modéré et présent surtout en partie ventrale. Or, chez ces deux espèces l'hippocampe est habituellement la région la plus fortement marquée par les radiotraceurs antagonistes comme le [¹⁸F]MPPF (Ginovart *et al.*, 2000 ; Aznavour *et al.*, 2006a; Aznavour et Zimmer, 2007 ; Millet *et al.*, 2008). Le thalamus et le striatum sont souvent décrits comme des zones à faible densité de récepteurs 5-HT_{1A}. De même le tronc cérébral présente un marquage bien moins important avec des traceurs antagonistes. Quant aux résultats chez le singe rhésus, on observe un signal élevé dans le cortex cingulaire antérieur, l'insula, le raphé dorsal et l'amygdale, et légèrement plus bas dans l'hippocampe, et l'hypothalamus. Du marquage apparaît de manière modérée dans le thalamus et le striatum. Dans le gyrus parahippocampique, la fixation du [¹⁸F]F13640 est au moins deux fois plus élevée que dans n'importe quelle autre région, suggérant que cette zone présente une très haute densité de récepteurs 5-HT_{1A} sous forme couplée chez cette espèce. Cette distribution est également différente de celle rapportée chez le singe rhésus avec l'antagoniste [¹⁸F]Mefway (Christian *et al.*, 2013), bien que les différences soient moins frappantes que chez les espèces précédentes avec le [¹⁸F]MPPF. Enfin, chez les trois espèces

animales on remarque que la matière grise du cervelet comporte des sites de fixation, ce qui est surprenant compte tenu des observations *in vitro* et du fait que le cervelet soit presque systématiquement décrit comme dépourvu de récepteurs 5-HT_{1A}. Une vue d'ensemble des résultats chez les trois espèces indique donc clairement qu'en conditions *in vivo*, la distribution cérébrale du [¹⁸F]F13640 est très différente de la distribution des radiotraceurs 5-HT_{1A} classiques en TEP. Des résultats similaires ont récemment été rapportés dans une étude TEP comparant l'analogue structurel [¹⁸F]F13714 et le [¹⁸F]MPPF chez le marmoset vigile et anesthésié (Yokoyama *et al.*, 2016).

La fixation du [¹⁸F]F13640 étant en grande partie bloquée par l'antagoniste WAY-100635 chez ces trois espèces, y compris dans des régions comme le thalamus et la matière grise du cervelet, il apparaît peu probable que ces résultats inédits soient expliqués par une fixation non spécifique. De plus, chez le rat la pré-injection de l'agoniste 8-OH-DPAT induit un blocage presque complet de la fixation du [¹⁸F]F13640, de manière plus importante que le WAY-100635. Ceci s'explique peut-être par une compétition plus effective entre agonistes 5-HT_{1A}, dans l'hypothèse que les agonistes ciblent préférentiellement les récepteurs couplés. Il a d'ailleurs été montré *in vitro* que la dissociation du F13640 tritié de ses récepteurs est beaucoup plus lente en utilisant un excès de WAY-100635 qu'un excès de 8-OH-DPAT ou de F13640 froid (Heusler *et al.*, 2010). De plus, les propriétés du F13640 sont très bien documentées *in vitro* et *in vivo*. Toutes les données décrivent le F13640 comme un « super-agoniste » hautement spécifique et avec une affinité élevée pour les récepteurs 5-HT_{1A}, testée vis-à-vis de nombreuses autres protéines incluant les autres récepteurs sérotoninergiques y compris les 5-HT₇ (Colpaert *et al.*, 2002) – une précision importante compte tenu de l'affinité notable du 8-OH-DPAT pour ces récepteurs (Sprouse *et al.*, 2004) - et rendant improbable l'interaction avec une autre cible. Une piste d'explication de la distribution inédite du [¹⁸F]F13640 pourrait être qu'en conditions *in vivo* la proportion de récepteurs effectivement couplés et accessibles à l'agoniste est très faible par rapport à la densité totale de récepteurs 5-HT_{1A} accessibles aux antagonistes, une hypothèse déjà suggérée pour expliquer le manque de sensibilité des traceurs antagonistes à la compétition avec des agonistes 5-HT_{1A} et la sérotonine endogène (Bantick *et al.*, 2004b ; Udo de Haes *et al.*, 2006). Ainsi on peut supposer que le marquage du [¹⁸F]F13640 soit le reflet de populations de récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels révélés dans des régions habituellement peu

marquées par les radiotraceurs classiques. Il convient cependant de remarquer que de telles différences de distribution entre traceurs agonistes et antagonistes ne sont pas aussi flagrantes pour d'autres récepteurs comme les récepteurs dopaminergiques D2 (voir Ginovart *et al.*, 2006, pour une comparaison entre [¹¹C]raclopride et [¹¹C]PHNO chez le chat) et les récepteurs 5-HT_{2A} (voir Ettrup *et al.*, 2016, pour une comparaison entre [¹⁸F]altansérine et [¹¹C]Cimbi-36 chez l'humain), même si il est très probable que chaque récepteur possède ses propres particularités concernant cet aspect. Il a notamment été montré que la dynamique des récepteurs 5-HT_{1A} au niveau de la membrane plasmique est influencée par le couplage aux protéines G, et il est possible que les récepteurs couplés ou non couplés soient en fait localisés différemment au niveau de la membrane *in vivo* (Pucadyil et Chattopadhyay, 2007), ce qui impliquerait que tous les récepteurs 5-HT_{1A} de haute affinité ne sont pas forcément accessibles aux antagonistes comme suggéré habituellement.

Pour aller plus loin, la question de l'agonisme biaisé (qui sera discutée plus en détail au cours de la troisième partie expérimentale de cette thèse) ouvre la possibilité de l'existence de multiples conformations intermédiaires des récepteurs, complexifiant encore la problématique. Des données récentes décrivent le F13640 comme un agoniste biaisé (Newman-Tancredi *et al.*, 2017), il est donc envisageable que la distribution du traceur soit le reflet d'une interaction préférentielle avec des sous-populations de récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels couplés à certaines voies de transduction.

Quoiqu'il en soit et même si des études plus fines seront nécessaires pour comprendre les bases moléculaires de cette distribution particulière du [¹⁸F]F13640, de plus en plus d'arguments incluant nos propres observations soutiennent l'idée que l'utilisation d'agonistes 5-HT_{1A} est susceptible de générer de nouvelles informations sur ces récepteurs qui n'étaient pas apparentes en utilisant des traceurs antagonistes ou accessibles par l'utilisation de techniques *in vitro*. Par exemple, il a été montré récemment que les puissants effets pro-respiratoires du F13640 impliquent des sites ou mécanismes dans le tronc cérébral qui ne sont pas fonctionnels *in vitro* chez le rat (Ren *et al.*, 2015). En lien avec ces résultats, dans notre étude nous avons observé une fixation importante du [¹⁸F]F13640 dans le tronc cérébral chez le rat en microTEP mais pas en autoradiographie *in vitro*, renforçant l'idée que le marquage du [¹⁸F]F13640 a une signification fonctionnelle. Similairement et

malgré le fait que le striatum soit souvent décrit comme dépourvu de récepteurs 5-HT_{1A}, nous avons observé de la fixation spécifique dans cette région dans les expériences de microTEP chez les trois espèces. Or, il a été montré grâce à des expériences de microinjection chez le rat que les propriétés antidyskinésiques des agonistes 5-HT_{1A} sont dues en partie à une action sur des récepteurs fonctionnels présents dans cette région (Bishop *et al.*, 2009 ; Meadows *et al.*, 2017). Enfin, nos résultats suggèrent des différences inter-espèces de la distribution des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels, une information qui est moins évidente lorsqu'on s'intéresse aux récepteurs dans leur ensemble.

Cinétiques du [¹⁸F]F13640

Les courbes temps/activité en TEP montrent une dissociation très lente du [¹⁸F]F13640 que ce soit chez le rat ou chez le chat. Ce comportement est similaire à celui de l'analogue structurel précédemment évalué, le [¹⁸F]F13714. Cette caractéristique est probablement inhérente à la haute affinité et efficacité de l'agoniste pour les récepteurs 5-HT_{1A}, et a déjà été observée *in vitro* comparé au 8-OH-DPAT, d'efficacité plus faible (Heusler *et al.*, 2010). Toutefois, contrairement à ce que laissent présager les cinétiques la fixation du traceur n'est pas irréversible car on peut voir une augmentation de l'élimination par l'injection de fenfluramine en cours d'acquisition chez le rat. De plus, contrairement au [¹⁸F]F13714 (Tavares *et al.*, 2013) la fixation du [¹⁸F]F13640 est réversible chez le singe rhésus, ce qui constitue un point encourageant pour un futur passage à l'homme car la quantification des paramètres de fixation est plus aisée avec les ligands réversibles (Logan, 2000). Dans cette optique, il sera nécessaire d'effectuer la modélisation des paramètres cinétiques du [¹⁸F]F13640 chez le singe rhésus afin de mieux caractériser le comportement du traceur et de déterminer des méthodes permettant la quantification du potentiel de liaison.

Choix d'une région de référence pour le [¹⁸F]F13640

Chez les trois espèces animales du signal spécifique est retrouvé dans le cervelet, région habituellement considérée comme dépourvue de récepteurs 5-HT_{1A}. Plusieurs études utilisant le [¹¹C]WAY-100635 ou le [¹¹C]CUMI-101 ont déjà rapporté une fixation faible mais spécifique aux récepteurs 5-HT_{1A} dans les lobes du cervelet et le vermis, et suggéré que la matière blanche du cervelet serait une région de référence plus adaptée (Parsey *et al.*,

2005 ; Hirvonen *et al.*, 2007 ; Parsey *et al.*, 2010 ; Ganz *et al.*, 2017). On peut aussi mentionner une étude en autoradiographie avec le [³H]8-OH-DPAT montrant une augmentation des récepteurs 5-HT_{1A} dans le vermis de patients schizophrènes (Slater *et al.*, 1998). Enfin, des expériences de iontophorèse chez le chat montrent également un effet inhibiteur de la sérotonine médié par les récepteurs 5-HT_{1A} sur l'activité des neurones situés dans la matière grise du cervelet (Kerr et Bishop, 1992). Similairement, dans nos travaux la fixation du [¹⁸F]F13640 se retrouve uniquement dans la matière grise et pas dans les noyaux cérébelleux plus profonds. Dans cette région et contrairement au reste du cerveau, le signal radioactif est inchangé par la préinjection de l'antagoniste WAY-100635 chez le chat et le singe rhésus, suggérant qu'il est possible de l'utiliser comme région de référence pour la quantification. Ce point devra être confirmé au cours d'expériences de modélisation avec détermination de la fonction d'entrée artérielle. Quant au rat, il n'a pas été possible d'identifier de zone du cervelet ou du reste du cerveau utilisable comme région de référence, limitant l'intérêt du traceur chez cette espèce.

Sensibilité à des fluctuations de sérotonine

Au cours d'expériences préliminaires, nous avons évalué la sensibilité du [¹⁸F]F13640 à la libération de sérotonine endogène chez le rat en administrant un dérivé amphétaminique provoquant une augmentation importante de sérotonine extracellulaire, la fenfluramine. En autoradiographie *ex vivo*, la fixation du [¹⁸F]F13640 est diminuée de manière dose-dépendante par la fenfluramine, avec un effet significatif dès 0,5 mg/kg. La compétition est observée dans de nombreuses régions, aussi bien au niveau du tronc cérébral et du thalamus que dans les aires limbiques et corticales. En comparaison, la fixation du [¹⁸F]MPPF n'est diminuée qu'à partir de la haute dose de 5 mg/kg, ce qui n'est pas surprenant compte tenu des études *ex vivo* précédentes avec des radiotraceurs antagonistes 5-HT_{1A}, montrant clairement un manque de sensibilité de ces traceurs à la libération de sérotonine (pour revue Paterson *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que le [¹⁸F]F13640 serait jusqu'à 10 fois plus sensible que les traceurs antagonistes pour mesurer des variations de sérotonine endogène. En microTEP, la pré-injection de fenfluramine à 1 mg/kg induit une diminution entre 60 et 70% du signal radioactif comparé à une injection de NaCl chez le même rat, un résultat à reproduire chez plusieurs animaux mais qui semble supérieur au le blocage observé dans un protocole similaire avec une dose dix fois plus

importante de fenfluramine et utilisant le [¹¹C]WAY-100635 comme radiotracteur (Hume *et al.*, 2001). De manière encore plus intéressante, l'injection de fenfluramine à la même dose en cours d'acquisition provoque une augmentation notable de la pente des cinétiques, tandis qu'une étude précédente n'a montré aucune baisse de la fixation du [¹¹C]WAY-100635 avec injection de fenfluramine à 10 mg/kg en cours d'acquisition (Maeda *et al.*, 2001). Toutefois, malgré ces résultats prometteurs on constate qu'en microTEP comme en autoradiographie le signal est diminué dans toutes les régions du cerveau y compris le cervelet, ce qui pose question quant à la spécificité du phénomène mesuré. Des études supplémentaires sont requises pour montrer qu'il s'agit bien de la sérotonine qui entre en compétition avec le traceur et pas d'une diminution de la fixation due à d'autres effets pharmacologiques de la fenfluramine comme des modifications du flux sanguin cérébral (Paterson *et al.*, 2010). Il serait utile d'effectuer des expériences de microdialyse dans diverses régions pour montrer que ces variations sont corrélées à la concentration de sérotonine extracellulaire, ou encore d'utiliser d'autres dérivés amphétaminiques avec des effets cardiovasculaires similaires mais une action limitée au système dopaminergique. D'autre part, l'absence de région de référence adaptée chez le rat posant problème pour la quantification du potentiel de liaison du [¹⁸F]F13640, ces études devront être réalisées chez le chat ou le singe rhésus (des expériences sont actuellement en cours dans notre laboratoire sur le chat). Si la sensibilité du [¹⁸F]F13640 à la sérotonine endogène est avérée, il faudra déterminer si ce traceur apporte des avantages par rapport aux radiotraceurs les plus sensibles actuellement disponibles, comme les antagonistes 5-HT_{1B} [¹¹C]AZ10419369 et [¹¹C]P943, ainsi que l'antagoniste 5-HT_{2A} [¹⁸F]altansérine et l'agoniste 5-HT_{2A} [¹¹C]Cimbi-36 (pour revues Tyacke et Nutt, 2015 ; Finnema *et al.*, 2015).

Pour conclure, le [¹⁸F]F13640 présente un profil intéressant et inédit comme radiotracteur 5-HT_{1A}, avec à la fois très peu de métabolites radioactifs cérébraux, un passage aisé de la barrière hémato encéphalique, une haute affinité et sélectivité *in vitro* ainsi qu'une potentielle sensibilité à la libération de sérotonine endogène bien supérieure aux autres radiotraceurs 5-HT_{1A}. Ce traceur présente toutefois une distribution *in vivo* inhabituelle dont les particularités restent à élucider. D'autre part, la dissociation du [¹⁸F]F13640 de ses récepteurs est très lente notamment chez le rat et le chat, ce qui est probablement le reflet de sa haute efficacité. La quantification des paramètres de fixation sera probablement plus

complexe qu'avec les antagonistes classiquement utilisés du fait de ces cinétiques lentes et de la présence de signal spécifique dans la matière grise du cervelet, compromettant son utilisation en tant que région de référence classique.

Perspectives

Etant donné la distribution particulière du [¹⁸F]F13640, il faudrait tout d'abord écarter définitivement la suspicion de fixation non-spécifique dans des régions comme le cervelet ou le thalamus. Pour cela, il serait très utile de vérifier l'absence de marquage du traceur chez des souris knock-out pour les récepteurs 5-HT_{1A} (Moulin-Sallanon *et al.*, 2009). Ensuite, il apparaît nécessaire de mieux caractériser et quantifier la fixation du traceur dans les différentes régions d'intérêt, d'autant plus que le cervelet ne semble pas adapté comme région de référence. La détermination de la fonction d'entrée artérielle est requise afin de modéliser les paramètres du traceur (notamment la concentration en récepteurs disponibles B_{max}, à comparer avec le [¹⁸F]MPPF) chez les différentes espèces. Par ailleurs, il serait pertinent d'explorer davantage les caractéristiques du [¹⁸F]F13640 comparé aux antagonistes, notamment en confirmant la sensibilité du traceur aux fluctuations de sérotonine *in vivo* en effectuant des corrélations du signal TEP avec la concentration de sérotonine extracellulaire mesurée en microdialyse. Nous pourrions également évaluer la sensibilité du traceur à un découplage des récepteurs *in vivo* en utilisant de la toxine pertussique, agent qui provoque un découplage entre récepteurs et protéines Gα/i (Bohmker *et al.*, 1992 ; Monnet *et al.*, 1994). La limite de cette approche est que la toxine pertussique doit être injectée de manière stéréotaxique dans une zone bien définie, et ne peut pas être administrée en périphérique ou en intracérébroventriculaire pour exercer un effet découplant suffisant dans le cerveau pour pouvoir être mesuré en TEP (van der Ploeg *et al.*, 1991). Il existe aussi des souches de souris déficientes pour les différentes sous-unités alpha des protéines G (Jiang *et al.*, 1998 ; Jiang *et al.*, 2002 ; Pineda *et al.*, 2004), ce qui permettrait non seulement d'évaluer l'influence du couplage sur la fixation du traceur mais également d'explorer les propriétés du [¹⁸F]F13640 en tant qu'agoniste biaisé, par exemple en évaluant dans quelle région la fixation est réduite chez des souris knock-out pour la protéine Gα_o, puisque le F13640 active fortement cette voie (Newman-Tancredi *et al.*, 2017).

Par ailleurs, il faut préciser que nos expériences *in vivo* ont été réalisées chez des animaux anesthésiés à l'isoflurane, ce qui est susceptible d'impacter la distribution et les caractéristiques apparentes du traceur, d'une part parce que l'isoflurane est connu pour diminuer le taux de décharge des neurones sérotoninergiques (Massey *et al.*, 2015) ce qui diminue la libération de sérotonine dans les aires de projection (Mukaida *et al.*, 2007), mais également parce qu'il est susceptible de réduire l'altérer le couplage des récepteurs (Seeman et Kapur, 2003). Il serait informatif de comparer les caractéristiques du [¹⁸F]F13640 *in vivo* chez l'animal vigile ou anesthésié, similairement à une précédente étude avec le [¹⁸F]F13714 (Yokoyama *et al.*, 2016). Dans cette étude chez le marmoset, les auteurs ont montré que la fixation du [¹⁸F]F13714 est altérée de manière différente selon les régions sous anesthésie à l'isoflurane, tandis que la fixation du [¹⁸F]MPPF est augmentée de manière globale et comparable dans tout le cerveau.

En termes de développement pharmaceutique, l'objectif sera d'évaluer le [¹⁸F]F13640 en imagerie TEP chez l'homme, d'abord chez des volontaires sains dans une étude de « first-in-man » puis chez des patients en neurologie et psychiatrie. Ceci permettra idéalement d'explorer la distribution et l'évolution des récepteurs fonctionnels au décours de processus physiologiques et pathologiques. En prévision de ces études en conditions pathologiques, effectuer des expériences postmortem (comme décrit dans la section suivante de cette thèse) est utile afin de mieux percevoir l'intérêt potentiel du [¹⁸F]F13640 en imagerie TEP pour explorer des phénomènes physiopathologiques chez l'humain.

PARTIE 2 : ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE POSTMORTEM DES RECEPTEURS 5-HT_{1A} AU COURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : COMPARAISON DE L'AGONISTE [¹⁸F]F13640 ET L'ANTAGONISTE [¹⁸F]MPPF

I – Problématique

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative caractérisée par l'accumulation de plaques amyloïdes extracellulaires et de dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires, résultant respectivement d'une agrégation anormale de peptides bêta-amyloïdes et de protéine tau sous forme hyperphosphorylée. Ces agrégats protéiques s'accompagnent d'une perte neuronale progressive et d'une altération de plusieurs systèmes de neurotransmission (Tampellini, 2015 ; Raksin *et al.*, 2015). Si la dégénérescence des fibres cholinergiques semble étroitement liée aux déficits cognitifs, le système sérotoninergique est également impliqué dans la physiopathologie de la MA et des dysfonctions de ce système pourraient être liées à plusieurs symptômes cliniques de la démence (Ramirez *et al.*, 2014). Diverses études postmortem ont rapporté une perte des neurones sérotoninergiques ou des modifications de la densité de récepteurs sérotoninergiques chez des patients atteints de la MA (Halliday *et al.*, 1992 ; Lorke *et al.*, 2006 ; Salmon, 2007). Plusieurs études ont notamment montré une altération de la densité de récepteurs 5-HT_{1A} (Bowen *et al.*, 1989 ; Cross *et al.*, 1988 ; Middlemiss *et al.*, 1986). Dans cette pathologie les récepteurs 5-HT_{1A} apparaissent d'un intérêt particulier puisqu'ils sont très exprimés dans l'hippocampe, une région fortement impliquée dans la régulation de la mémoire, du comportement et des émotions (Albert *et al.*, 2014 ; Borg, 2008 ; Sarnyai *et al.*, 2000). Plusieurs ligands 5-HT_{1A} ont été proposés pour le traitement de symptômes cognitifs ou non cognitifs avec des résultats mitigés, et davantage de données précliniques et cliniques semblent nécessaire pour évaluer le potentiel des récepteurs 5-HT_{1A} en tant que cible thérapeutique dans cette maladie (Schechter *et al.*, 2005 ; Sato *et al.*, 2007 ; Depoortere *et al.*, 2010). Etant donné que les déficits cognitifs sévères les plus précoces dans la MA concernent la mémoire épisodique et sont liés à la présence de dégénérescences

neurofibrillaires dans l'hippocampe (Dubois *et al.*, 2007 ; Serrano-Pozo *et al.*, 2011), plusieurs études TEP se sont intéressées à la densité de récepteurs 5-HT_{1A} dans l'hippocampe de patients atteints. Ces études ont montré une diminution de densité des récepteurs dans cette région à un stade avancé (Lanctôt *et al.*, 2007 ; Kepe *et al.*, 2006). À l'inverse, une augmentation a été rapportée au stade prodromal dit "déficit cognitif léger" (MCI en anglais) (Truchot *et al.*, 2007; Truchot *et al.*, 2008). La signification physiopathologique de ce phénomène reste à élucider, et pourrait refléter des mécanismes compensatoires survenant aux stades les plus précoces de la MA (Truchot *et al.*, 2007 ; Verdurand *et al.*, 2011 ; et, en particulier, Verdurand et Zimmer, 2017). Par ailleurs, de plus en plus d'arguments suggèrent que des altérations du couplage entre récepteurs et protéines G sont impliquées dans les maladies neurodégénératives (Thathiah et De Strooper, 2011). Or ces études TEP ont été réalisées avec l'antagoniste [¹⁸F]MPPF, qui ne discrimine pas les récepteurs couplés et non couplés comme décrit précédemment (Assié *et al.*, 1999). Il serait pertinent de prendre en compte l'état de couplage des récepteurs 5-HT_{1A} au cours de la MA en utilisant un radioligand agoniste dans de futures études TEP cliniques, pour une compréhension approfondie du rôle fonctionnel de ces récepteurs. Une précédente étude en autoradiographie postmortem dans notre laboratoire a montré des différences de fixation entre l'agoniste [¹⁸F]F15599 et l'antagoniste [¹⁸F]MPPF à différents stades de la MA (Becker *et al.*, 2014). Toutefois les caractéristiques du [¹⁸F]F15599 *in vivo* ne sont pas optimales pour une utilisation en TEP, limitant le caractère translationnel de l'étude. De plus le nombre de patients inclus était relativement restreint.

Le but de cette nouvelle étude est d'évaluer les modifications de densité des récepteurs 5-HT_{1A} couplés comparé aux récepteurs totaux au cours de la MA, en quantifiant la fixation du [¹⁸F]F13640 et du [¹⁸F]MPPF sur des coupes d'hippocampe des mêmes patients à différents stades de la maladie en autoradiographie postmortem. Le nombre de patients inclus est plus important que dans l'étude précédente (n=34 contre n=16) et le [¹⁸F]F13640 semble plus prometteur que le [¹⁸F]F15599 pour une future utilisation en TEP (voir la partie précédente). Notre hypothèse était que l'altération du couplage des récepteurs peut survenir avant la perte des récepteurs eux-mêmes au cours de la maladie, supportant l'utilisation de radiotraceurs agonistes en imagerie TEP. Comme certaines études précédentes interprétaient les variations de récepteurs 5-HT_{1A} en termes de densité

neuronale (Bowen *et al.*, 1989 ; Kepe *et al.*, 2006 ; Lanctôt *et al.*, 2007), nous avons également évalué cette densité sur les mêmes coupes par immunohistochimie NeuN.

II - Matériel et méthodes

2.1 Sujets et échantillons

Les coupes de cerveau frais congelées ont été obtenues de la MRC London Neurodegenerative Diseases Brain Bank après approbation par un comité de revue scientifique local. Trente quatre patients ont été inclus, dont 9 contrôles, 5 au stade de Braak I-II, 10 au stade de Braak III-IV et 10 au stade de Braak V-VI (tableau 4). L'âge des patients, le délai postmortem et le sex-ratio n'étaient pas statistiquement différents entre les groupes ($p > 0.05$). Le stade de Braak est déterminé par quantification immunohistochimique de la protéine tau hyperphosphorylée selon les recommandations du consortium BrainNet Europe (Alafuzoff *et al.*, 2008). Le stade zéro correspondant au groupe contrôle est caractérisé par l'absence de dégénérescences neurofibrillaires ; les stades I, II et III présentent des fibrilles dans les régions transentorhinales et entorhinales, avec un début de marquage immunohistochimique dans le cortex temporal et temporo-occipital ; les stades IV, V et VI présentent des lésions importantes dans ces régions, qui s'étendent jusqu'au cortex occipital. Chaque cas incluait 15 coupes successives d'hippocampe d'une épaisseur de 30 μm . Les coupes étaient stockées à -80°C sans fixation à la formaline avant les expériences d'autoradiographie (deux coupes par lame).

Tableau 4 : Données démographiques des patients utilisés pour l'étude postmortem.

Stades de Braak	0	I/II	III/IV	V/VI
Nombres de cas	9	5	10	10
Age (années)	79.3 ± 12.1	84.2 ± 8.8	83.5 ± 6.9	75.5 ± 12.0
Genre (H/F)	6/3	2/3	5/5	7/3
Délai postmortem (h)	35.8 ± 12.7	36.1 ± 10.5	35.2 ± 18.1	41.4 ± 23.0

2.2 Radiosynthèse et contrôle qualité

Le jour de l'expérience, le [¹⁸F]F13640 ou le [¹⁸F]MPPF ont été synthétisés selon la procédure décrite dans la partie précédente. Les puretés chimiques et radiochimiques étaient à minima supérieures à 95%. L'activité spécifique au moment de l'autoradiographie était calibrée à 37 GBq/μmol (soit 1 Ci/μmol) pour le [¹⁸F]MPPF, et 11,1 GBq/μmol (0,3 Ci/μmol) pour le [¹⁸F]F13640.

2.3 Autoradiographie semi-quantitative

Les coupes décongelées ont été incubées pendant 20 minutes dans une solution tampon Tris-phosphate (138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH ajusté à 7,5) contenant 37 kBq/mL (1 μCi/mL) de [¹⁸F]MPPF ou de [¹⁸F]F13640. Pour chaque radioligand, l'activité spécifique était calibrée pour que la concentration soit égale à trois fois l'affinité du ligand. Les sections étaient donc incubées avec 1 nM de [¹⁸F]MPPF ou 3 nM de [¹⁸F]F13640, avec des Kd respectifs de 0,3 nM et 1 nM (Kung *et al.*, 1996 ; Maurel *et al.*, 2007). La fixation non-spécifique était déterminée sur des coupes adjacentes co-incubées avec 10 μM de WAY-100635. Pour vérifier le comportement d'agoniste du [¹⁸F]F13640, certaines coupes ont également été incubées avec du Gpp(NH)p à 10 μM. Après 20 minutes d'incubation, les lames sont rincées dans du tampon TBS-HCl (pH 7,5) à 4°C pendant 90 secondes puis dans de

l'eau p.p.i à 4°C pendant 90 secondes avant séchage. Le film radiosensible est ensuite apposé sur les lames, dans une cassette opaque, pendant une heure. Les images du film sont révélées à l'aide d'un phospho-imageur (BAS-5000, Fuji). Les images sont analysées avec le logiciel Multigauge et les régions d'intérêt (CA1, gyrus denté) sont tracées manuellement d'après un atlas de cerveau humain (Mai et Paxinos, 1997) et confirmées par la suite par un marquage des coupes au Luxol-Fast Blue (pour visualiser la myéline) et par l'immunomarquage au NeuN (pour visualiser les neurones) dont la procédure est détaillée ci-après. Dans chaque région d'intérêt, la densité optique moyenne est mesurée sur les coupes adjacentes et soustraite à la densité optique moyenne sur les coupes incubées avec le WAY-100635, représentant le signal non spécifique.

En parallèle, des étalons ont été préparés à partir d'homogénats de cerveau de rat préparés selon la procédure suivante : extraction, homogénéisation et pesée avant aliquotage dans des micro-vials et congélation à -80°C. La masse de protéines présente dans ces vials a été quantifiée grâce à un analyseur Architect Ci8200 (Abbott Diagnostics). Le jour de l'expérimentation, des quantités fixées et croissantes de radioactivité ont été mélangées avec ces homogénats, qui étaient ensuite congelés et coupés en sections de 30 µm. Ces étalons extemporanés sont placés sur les mêmes films utilisés pour les tissus humains, et permettent de générer des courbes permettant d'estimer la concentration de ligand à partir du signal autoradiographique. Dans chaque région d'intérêt on obtient donc la fixation du radioligand en fmoles par milligramme de protéine.

2.4 Immunomarquage NeuN et comptage neuronal

Une lame par sujet a été utilisée pour le marquage immunohistochimique des neurones à l'aide d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre l'antigène NeuN, présent de manière spécifique dans les noyaux des neurones (mAB377 A60, Chemicon, 1/500). Des images des coupes entières ont été prises à l'aide d'un scanner de lames (Zeiss Axioscan, plateforme de microscopie du CIQLE, Lyon). Ces images ont été utilisées pour valider la délimitation des régions d'intérêt en autoradiographie et estimer la densité neuronale. Les cellules marquées positives au NeuN ont été comptées manuellement dans l'aire CA1 à l'aide de l'outil comptage de cellules du logiciel ImageJ (Schneider *et al.*, 2012). Le comptage a été réalisé par deux expérimentateurs différents en aveugle. Dans le gyrus denté, les

cellules ont été comptées automatiquement par l'outil « Spot detector » du logiciel Icy (Quantitative Image Analysis Unit, Institut Pasteur) en appliquant des paramètres de comptage prédéfinis. Certains sujets ont été exclus de cette partie de l'étude car le logiciel ne parvenait pas à détecter les cellules positives. Dans chaque région d'intérêt, les résultats ont été exprimés en nombre de neurones par mm³.

2.5 Analyse statistique

Les données démographiques ont été comparées entre les groupes à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis. La fixation du radioligand et la densité neuronale ont été comparées entre chaque groupe et le groupe contrôle à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney. Pour toutes les analyses, le seuil de significativité était fixé à $p < 0.05$ (GraphPad Prism 6).

III - Résultats

3.1 Autoradiographie

La distribution des deux radiotraceurs 5-HT_{1A} au niveau des coupes d'hippocampes humains est visuellement comparable (figure 51), avec une fixation élevée dans l'aire CA1 et modérée dans l'aire CA3 et le gyrus denté, comme précédemment décrit (Burnet *et al.*, 1995 ; Becker *et al.*, 2014).

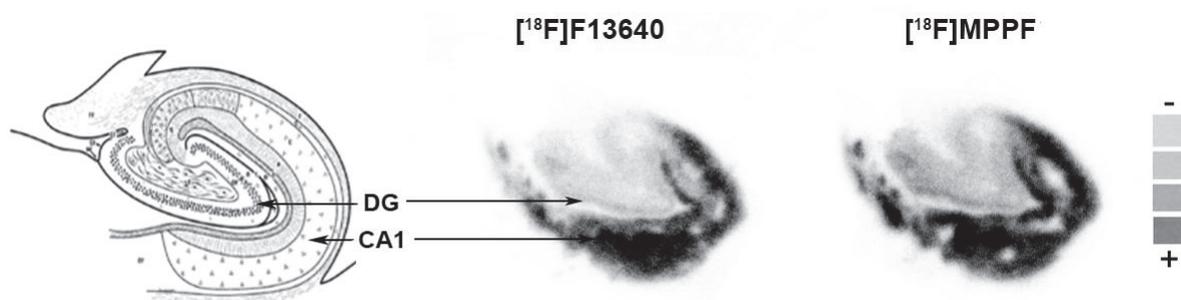


Figure 51 : Distribution du [¹⁸F]F13640 du [¹⁸F]MPPF dans l'hippocampe d'un patient (même patient que dans la figure 54; DG, gyrus denté ; CA1, aire CA1). Coupe anatomique correspondante modifiée d'après Duvernoy *et al.*, 2005.

L'addition de WAY-100635 à 10 μM dans le bain d'incubation provoque une diminution de 85 à 90% de la fixation du [¹⁸F]F13640 et du [¹⁸F]MPPF, confirmant leur spécificité pour les récepteurs 5-HT_{1A}. L'agent découplant Gpp(NH)p induit une diminution de 70% du marquage du [¹⁸F]F13640, alors qu'il provoque une augmentation de 17% du marquage du [¹⁸F]MPPF dans les mêmes conditions (figure 52).

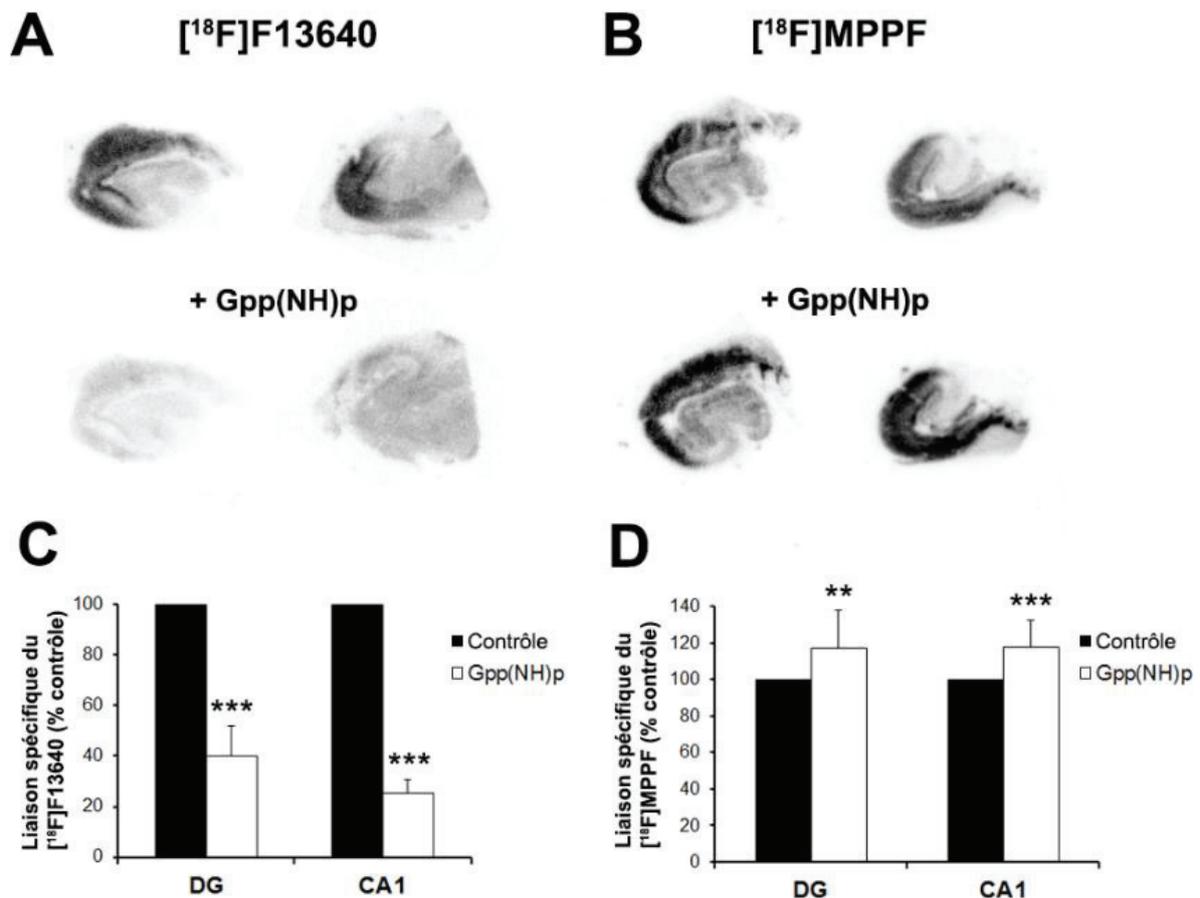


Figure 52 : Différents effets du Gpp(NH)p, provoquant un découplage entre récepteurs et protéines G, sur les deux radiotraceurs des récepteurs 5-HT_{1A}. A- Autoradiographie montrant la diminution de fixation du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ induite par le Gpp(NH)p, chez un sujet contrôle (coupe de gauche) et un patient (coupe de droite). B- Autoradiographie montrant l'augmentation de la fixation du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ par le Gpp(NH)p, chez un sujet contrôle (coupe de gauche) et un patient (coupe de droite). C- Diminution moyenne du marquage du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ (n=18) dans les différentes régions d'intérêt : -59% dans le gyrus denté (p<0.001) et -75% dans l'aire CA1 (p<0.001), test t de Student. D- Augmentation moyenne du marquage du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ (n=16) dans les différentes régions d'intérêt : +17% dans le gyrus denté (p<0.01) et +18% dans l'aire CA1 (p<0.001), test T de Student.

Les altérations des récepteurs 5-HT_{1A} en fonction des stades de Braak étaient bien différentes selon le traceur utilisé et la sous-région hippocampique considérée (figure 53). Dans l'aire CA1, la fixation du $[^{18}\text{F}]\text{F13640}$ est significativement diminuée aux stades de Braak I/II (-19%, p<0.05), Braak III/IV (-23%, p<0.05) et Braak V/VI (-36%, p<0.01) comparés au groupe contrôle. La fixation du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ n'est significativement réduite qu'au stade avancé de Braak V/VI comparé au groupe contrôle (-33%, p<0.01). Dans le gyrus denté, la fixation du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ est inchangée aux stades avancés comparé au contrôle, mais

significativement augmentée au stade précoce Braak I/II (+26%, $p < 0.05$). A contraire, la fixation du [^{18}F]F13640 est inchangée au stade de Braak I/II mais fortement diminuée aux stades avancés V/VI (-40%, $p < 0.01$).

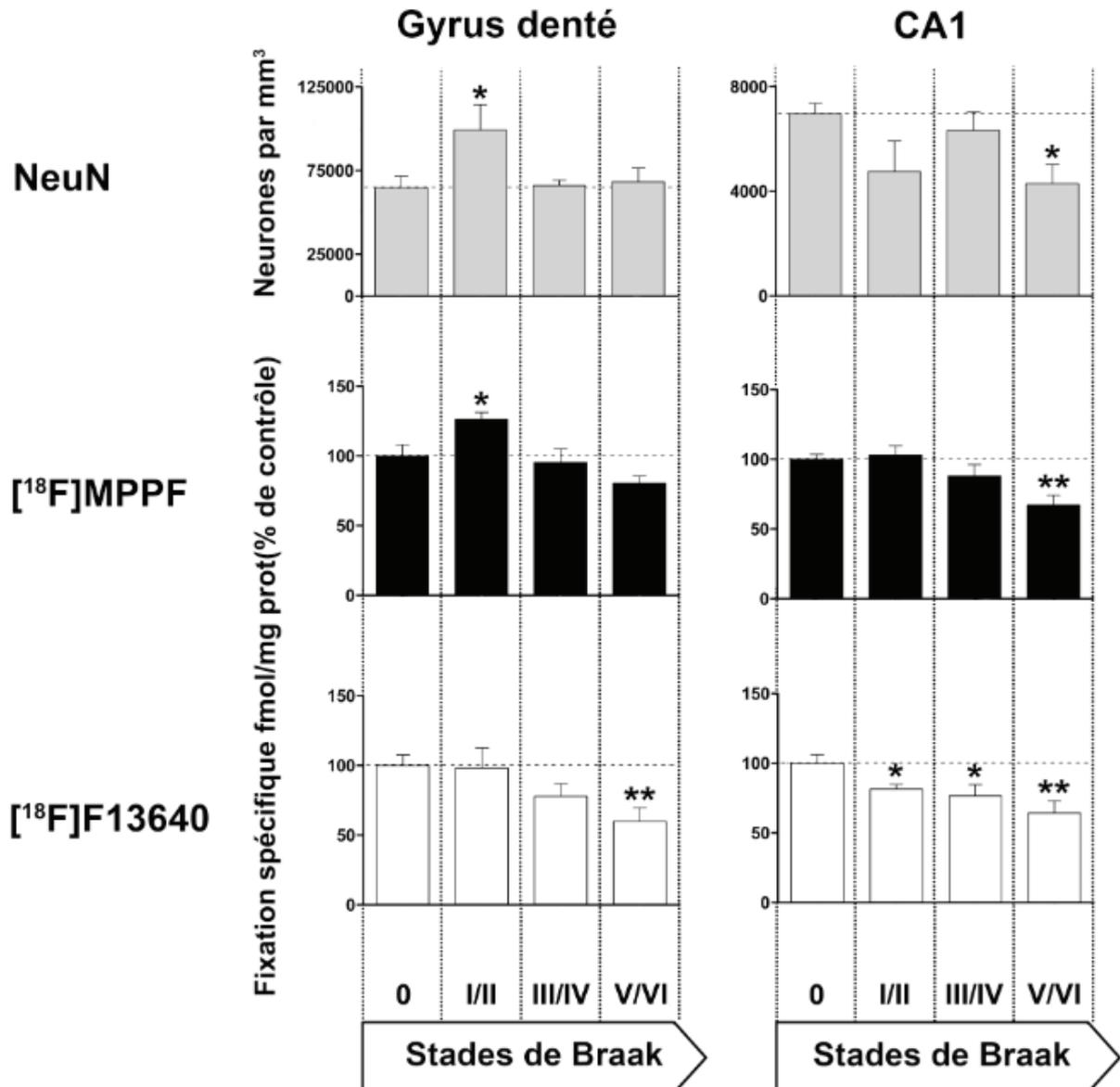


Figure 53 : Densité neuronale (révélée par immunomarquage NeuN) et densité de récepteurs 5-HT_{1A} totaux ou fonctionnels (révélé par les radiotraceurs [^{18}F]MPPF et [^{18}F]F13640) dans le gyrus denté et l'aire CA1 de patients atteints de la maladie d'Alzheimer à différents stades de Braak. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au groupe contrôle (Braak 0). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, test de Mann-Whitney.

3.2 Comptage neuronal

Dans l'aire CA1, la densité neuronale est inchangée chez les patients Alzheimer comparé au groupe contrôle jusqu'aux stades de Braak V/VI (-38%, $p < 0.05$). Dans le gyrus denté, on observe uniquement une augmentation de la densité neuronale chez le groupe Braak I/II comparé au contrôle (+53%, $p < 0.05$, figures 53 et 54).

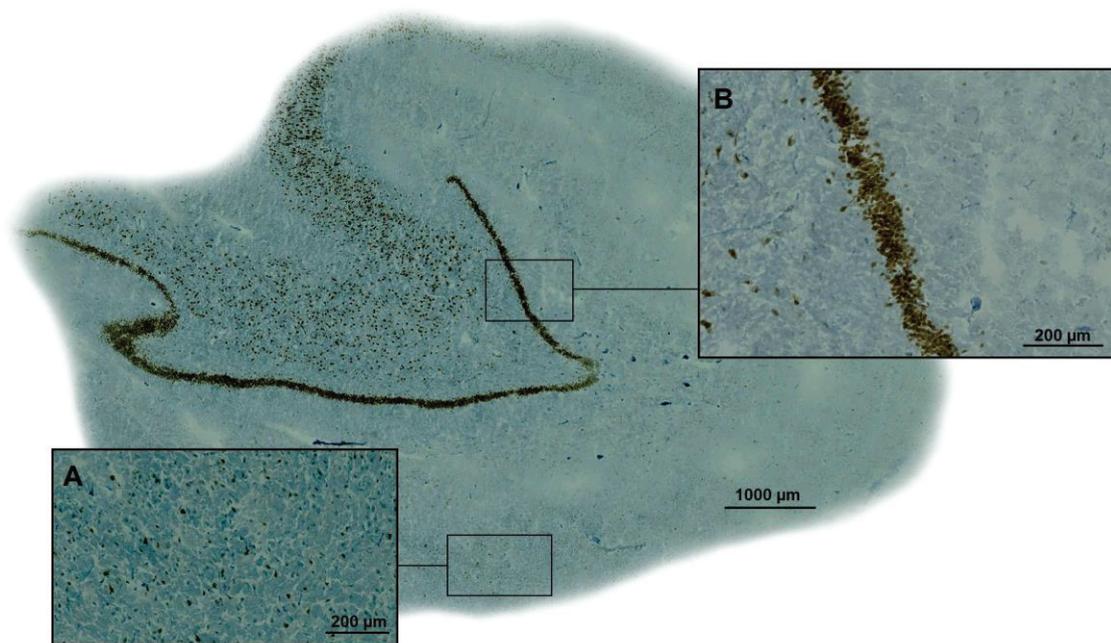


Figure 54 : Densité régionale de marquage NeuN sur une coupe d'hippocampe d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (image entière obtenue par scanner de lames). Les zooms correspondent aux zones où la densité neuronale a été mesurée : A - aire CA1 ; B - gyrus denté.

IV - Discussion

L'hypothèse de notre étude était que l'agoniste 5-HT_{1A} [¹⁸F]F13640, qui marque préférentiellement les récepteurs 5-HT_{1A} couplés aux protéines G, apporterait une information inédite sur l'altération fonctionnelle des récepteurs au cours de la pathologie, comparé au [¹⁸F]MPPF qui marque la totalité des récepteurs sans distinction de leur état fonctionnel. Comme déjà décrit dans la partie précédente, les deux radiotraceurs sont hautement sélectifs des récepteurs 5-HT_{1A} avec une affinité nanomolaire, assurant leur comparabilité (Kung *et al.*, 1996 ; Colpaert *et al.*, 2002). La préférence du [¹⁸F]F13640 pour

les récepteurs sous forme couplée, déjà décrite dans la section précédente chez le rat, est ici confirmée chez l'humain par la diminution flagrante du marquage après découplage des récepteurs par le Gpp(NH)p. Dans des conditions similaires, le marquage du [¹⁸F]MPPF est légèrement augmenté, un phénomène qui a déjà été décrit précédemment (voir section précédente et Lemoine *et al.*, 2010). Dans une étude récente, notre laboratoire a suggéré que la fonctionnalité des récepteurs 5-HT_{1A} est altérée au cours de la maladie avant la perte des récepteurs eux-mêmes (Becker *et al.*, 2014). Cette étude préliminaire comportait un nombre de patients relativement restreint, utilisait un radiotracer agoniste non optimal pour l'usage futur en TEP (le [¹⁸F]F15599) et ne s'était pas intéressée à la densité neuronale en parallèle aux récepteurs 5-HT_{1A}.

Dans l'étude présente, plusieurs mesures méthodologiques ont été prises pour assurer au mieux la comparabilité entre [¹⁸F]F13640 et [¹⁸F]MPPF et minimiser les variations des conditions expérimentales :

- Pour chaque radioligand, les échantillons des 34 patients ont été utilisés simultanément en une radiosynthèse.
- Les résultats ont été normalisés par l'utilisation de courbes de calibration permettant de convertir la densité optique des images en niveau de fixation (fmoles de radioligand par gramme de protéine).
- Pour chaque radiotracer, l'activité spécifique et la concentration radioactive étaient calibrés pour que la concentration ajoutée dans le tampon d'incubation soit égale à 3 fois l'affinité, afin d'assurer une concentration saturante (Burnet *et al.*, 1997).
- Pour chaque patient, des coupes sériées ont été utilisées, limitant les variabilités individuelles.
- Le stade de Braak a été utilisé pour classer les patients par degré de pathologie tau, car il y a une bonne corrélation entre les dépôts de protéine tau hyperphosphorylée et l'état cognitif (Braak et Braak, 1991 ; Alafuzoff *et al.*, 2008).
- Enfin, les différents groupes étaient bien comparables en termes d'âge et de délai postmortem, un point important à considérer car ces variables peuvent potentiellement impacter le couplage entre récepteurs et protéines G (Gonzalez-Maeso *et al.*, 2002).

Notre étude présente toutefois quelques limites inhérentes à l'utilisation de tissus cérébraux provenant de banques. Ainsi, nous n'avons malheureusement pas pu avoir accès aux données cliniques relatives à l'état cognitif et psychiatrique et aux traitements médicamenteux potentiels des patients avant le décès, qui sont susceptibles d'impacter fortement sur nos résultats (Lai *et al.*, 2002 ; Lai *et al.*, 2011). De plus, nous nous sommes focalisés sur l'hippocampe mais il serait informatif d'effectuer une telle étude sur d'autres régions où l'altération des récepteurs 5-HT_{1A} semble corrélée au déclin cognitif (Lai *et al.*, 2002).

Dans l'aire CA1 de l'hippocampe, la fixation du [¹⁸F]MPPF reflétant la densité totale de récepteurs est diminuée uniquement aux stades de Braak avancés (V/VI) par rapport au groupe contrôle, en lien avec des études précédentes. En particulier, une étude immunohistochimique a montré des résultats très proches avec une perte de récepteurs 5-HT_{1A} spécifiquement localisée dans CA1 et à partir des stades V/VI (Mizukami *et al.*, 2011). Plusieurs autres études postmortem ont également montré une réduction des 5-HT_{1A} au cours de la MA (Bowen *et al.*, 1989 ; Cross *et al.*, 1988), mais il faut noter que le statut neuropathologique des patients n'était pas systématiquement pris en compte, compliquant la comparaison avec nos propres résultats. Similairement, des études TEP ont rapporté une diminution de la fixation du [¹⁸F]MPPF dans l'hippocampe des patients à un stade avancé, avec des résultats divergents aux stades prédéméntiels (Kepe *et al.*, 2006 ; Lanctôt *et al.*, 2007, Truchot *et al.*, 2007). Globalement les résultats sont en faveur d'une diminution modérée de la densité de récepteurs 5-HT_{1A} au cours de la maladie d'Alzheimer (dans l'hippocampe et d'autres aires cérébrales) observable à des stades avancés. Dans notre étude, il est intéressant de constater que la fixation du [¹⁸F]F13640, reflétant les récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels, est significativement diminuée dans tous les stades de la pathologie y compris le stade de Braak I/II. Ces résultats supportent la possibilité d'un découplage précoce des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'aire CA1 avant la perte des récepteurs eux-même, alors que les neurofibrilles sont à peine détectables dans l'hippocampe (Raskin *et al.*, 2015). D'autres études ont montré une altération du fonctionnement des RCPG durant la maladie d'Alzheimer (Thathiah et de Strooper, 2011), notamment dans l'aire CA1 (Garcia-Jimenez *et al.*, 2002) et incluant les récepteurs 5-HT_{1A} (Weinstein *et al.*, 1996). Les conséquences physiopathologiques de ce découplage progressif des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'aire CA1

restent à explorer mais l'altération de la signalisation intracellulaire de ces récepteurs est peut-être liée à l'apparition de certains signes cliniques (Garcia Jimenez *et al.*, 2002). Comparé aux autres sous-régions de l'hippocampe, il est à noter que l'aire CA1 est particulièrement affectée à la fois par la perte de récepteurs 5-HT_{1A} aux stades avancés (détectée par le marquage du [¹⁸F]MPPF) et le découplage des récepteurs aux stades précoces. Cette observation pourrait être simplement due à la plus grande densité de récepteurs dans cette région, rendant les changements dans cette zone plus facilement détectables, mais il a également été décrit que l'aire CA1 est particulièrement vulnérable à la pathologie (Garcia Jimenez *et al.*, 2002 ; Mizukami *et al.*, 2011 ; de Flores *et al.*, 2015).

Dans le gyrus denté, le marquage du [¹⁸F]F13640 est réduit aux stades de Braak V/VI tandis qu'aucune diminution n'est observée avec le [¹⁸F]MPPF. Au contraire, le groupe incluant des patients au stade de Braak I/II présente une fixation accrue de l'antagoniste dans cette région. Ce résultat est assez similaire aux études TEP précédentes qui ont rapporté une augmentation de la fixation du [¹⁸F]MPPF dans l'hippocampe au stade pré-déméntiel (Truchot *et al.*, 2007, Verdurand et Zimmer, 2017). Cette observation a été répliquée dans notre laboratoire dans un modèle de rat, où l'infusion de peptides amyloïdes bêta-40 dans l'hippocampe induit une surexpression transitoire des récepteurs 5-HT_{1A} spécifiquement dans le gyrus denté (Verdurand *et al.*, 2011 ; Verdurand *et al.*, 2016). Une telle augmentation peut rappeler l'hyper-réactivité hippocampique transitoire observée chez les patients MCI en termes de transmission cholinergique (DeKosky *et al.*, 2002), signal IRMf (Dickerson *et al.*, 2004 ; Dickerson *et al.*, 2005), ou métabolisme glucidique (Tahmasian *et al.*, 2015). Ces signes sont généralement interprétés comme des mécanismes compensatoires qui seraient ensuite supplantés par la progression de la pathologie à des stades plus avancés. Ce « rebond » transitoire des récepteurs 5-HT_{1A} constitue peut-être un autre signe de cet hyperfonctionnement. Toutefois nous n'avons pas observé une telle augmentation avec le [¹⁸F]F13640, ce qui signifierait que les récepteurs surexprimés sont présents sous forme non couplée. Etant donné que ce phénomène est observé spécifiquement dans le gyrus denté, il pourrait être lié à la neurogénèse qui a lieu dans cette région de l'hippocampe (Verdurand *et al.*, 2016). La possibilité d'une augmentation de la neurogénèse dans l'hippocampe pendant la maladie d'Alzheimer est débattue dans plusieurs études (Mu et Gage, 2011 ; Jin *et al.*, 2004 ; Donovan *et al.*, 2006). Cette augmentation pourrait aussi être le résultat d'une

réaction astrocytaire, qui a été décrite chez des patients aux stades pré-déméntiels et dans des modèles animaux (Boekhoorn *et al.*, 2006 ; Verdurand *et al.*, 2011). En ce sens, on peut mentionner une étude qui décrit l'expression de récepteurs 5-HT_{1A} sous forme non couplée par les astrocytes (Hirst *et al.*, 1998), bien que la présence de récepteurs 5-HT_{1A} sur des astrocytes soit remise en cause par d'autres études (Kia *et al.*, 1996c). Plus récemment, l'augmentation de l'activité de l'hippocampe au stade MCI a aussi été suggérée comme potentiellement nocive (Bakker *et al.*, 2012 ; Tahmasian *et al.*, 2015). En tant que récepteurs inhibiteurs, la perte précoce de fonctionnalité des récepteurs 5-HT_{1A} pourrait contribuer indirectement à une augmentation délétère de l'activité des neurones hippocampiques (Verdurand et Zimmer, 2017).

Dans plusieurs études TEP précédentes, la densité de récepteurs 5-HT_{1A} mesurée par le radioligand [¹⁸F]MPPF était interprétée comme un marqueur indirect de la densité neuronale, ce qui apparaît comme une méthode intéressante pour estimer la perte neuronale *in vivo* dans l'hippocampe des patients Alzheimer (Kepe *et al.*, 2006 ; Bowen *et al.*, 1989 ; Mizukami *et al.*, 2011). Dans notre étude nous avons donc quantifié les neurones sur des coupes adjacents par marquage NeuN afin d'explorer la relation entre densité neuronale, densité totale de récepteurs 5-HT_{1A}, et récepteurs de haute affinité. Dans l'aire CA1, la densité neuronale n'est altérée significativement qu'à partir du stade de Braak V/VI malgré une tendance observée dans le stade I/II. Dans le gyrus denté, la densité neuronale est augmentée dans le stade de Braak I/II et inchangée dans les autres groupes. On remarque donc que dans ces deux régions les variations de densité neuronale sont parallèles aux changements de densité de récepteurs 5-HT_{1A} détectés par le [¹⁸F]MPPF. Ces résultats sont en accord avec les précédentes études (Kepe *et al.*, 2006 ; Mizukami *et al.*, 2011) suggérant que la densité neuronale et la densité de récepteurs totaux dans l'hippocampe sont liées. Au contraire, la fixation du [¹⁸F]F13640 dans l'aire CA1 diminue bien avant et d'une manière plus importante que la perte neuronale.

Pour conclure, les résultats de cette étude *in vitro* ont un fort potentiel translationnel. Nous avons démontré que deux traceurs agoniste et antagoniste se fixent différemment aux récepteurs 5-HT_{1A} sur des coupes cérébrales humaines, révélant des états de couplage distincts. Mesurer spécifiquement la densité de récepteurs 5-HT_{1A} couplés est susceptible d'apporter des informations originales pour comprendre les mécanismes liés aux

multiples altérations observées dans la maladie d'Alzheimer. Nous avons utilisé des radioligands fluorés qui sont transférables à l'imagerie *in vivo* : l'antagoniste [¹⁸F]MPPF est déjà largement utilisé comme radiopharmaceutique, et l'agoniste [¹⁸F]F13640 a montré dans la section précédente de cette thèse des résultats intéressants chez l'animal, encourageant son passage à l'humain.

PARTIE 3 : CARACTERISATION *IN VIVO* DE LA SELECTIVITE FONCTIONNELLE DES AGONISTES 5-HT_{1A} F15599 ET F13640 PAR L'IMAGERIE FONCTIONNELLE TEP ET IRM

I – Problématique

Comme décrit précédemment, de plus en plus de travaux attestent de la possibilité de stimuler préférentiellement différentes voies de transduction par des agonistes spécifiques du même récepteur, un phénomène dénommé agonisme biaisé ou sélectivité fonctionnelle (Luttrel *et al.*, 2015). En neurosciences, cela ouvre la possibilité de cibler des populations de récepteurs exprimées dans des régions cérébrales spécifiques, en fonction de leur couplage à différentes voies de signalisation (Kenakin et Christopoulos, 2013). Dans le contexte des récepteurs 5-HT_{1A}, ce ciblage apparaît possible étant donné que ces récepteurs peuvent être couplés à différents sous-types de protéines G en fonction de leur localisation (Mannoury la Cour *et al.*, 2006). Plusieurs études tendent en effet à montrer *in vitro*, ou de manière empirique *in vivo*, l'existence d'agonistes biaisés des récepteurs 5-HT_{1A} (Newman-Tancredi, 2011). Parmi ces agonistes biaisés, nous allons nous focaliser sur deux molécules très proches, le F15599 et le F13640, actuellement développées par Neurolix dans deux indications thérapeutiques différentes (figure 55). Ces agonistes présentent une affinité et une efficacité d'ordre comparable vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{1A}, mais plusieurs études *in vitro* attestent qu'ils sont capables de stimuler préférentiellement différentes voies intracellulaires (Newman-Tancredi *et al.*, 2009 ; Newman-Tancredi *et al.*, 2017). Diverses études *in vivo* chez l'animal attestent de la capacité du F15599 à cibler préférentiellement les récepteurs postsynaptiques comparés au récepteurs présynaptiques, et en particulier les récepteurs corticaux (pour revue Newman-Tancredi, 2011). A l'inverse, d'autres études montrent que le F13640 active de manière comparable les récepteurs pré- et postsynaptiques (Llado-Pelfort *et al.*, 2012 ; Buritova *et al.*, 2009).

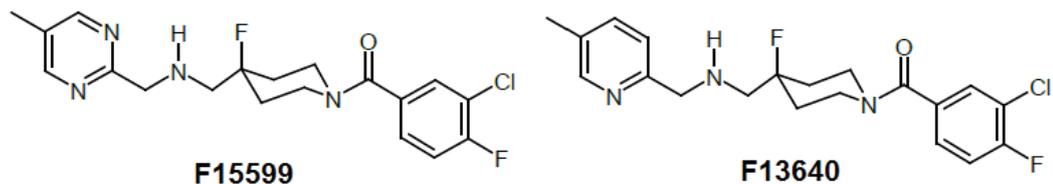


Figure 55 : Structures chimiques des analogues structurels F15599 et F13640, tous deux des agonistes très spécifiques des récepteurs 5-HT_{1A}.

Les études démontrant le plus formellement les différences entre F15599 et F13640 utilisent des approches invasives et limitées à certaines régions, comme l'électrophysiologie et la microdialyse. Dans le cadre du développement préclinique du F15599 et du F13640, il apparaît nécessaire de développer des méthodes permettant de visualiser les effets de ces ligands dans le cerveau entier de manière non-invasive, en vue de futures études chez l'humain. Les techniques d'imagerie moléculaire que sont la TEP et l'IRM pharmacologique (pharmaco-IRM) apparaissent ainsi comme très prometteuses dans cette démarche translationnelle. Dans une étude préliminaire, notre laboratoire a montré qu'il est possible de distinguer différents agonistes biaisés des récepteurs 5-HT_{1A} en pharmaco-IRM (Becker *et al.*, 2014).

Dans cette partie, nous avons utilisé l'imagerie TEP et la pharmaco-IRM pour cartographier *in vivo* les effets du F13640 et du F15599 à plusieurs doses pharmacologiquement actives chez l'animal, et vérifier si leurs différences suggérées en termes de sélectivité fonctionnelle sont directement observables en termes de patterns d'activation cérébrale. De manière complémentaire avec les travaux précédemment réalisés sur les molécules radiomarquées au fluor 18, nous nous intéressons ici à leur potentiel en tant que médicament-candidats et non comme traceurs.

Dans un premier temps, le F15599 et le F13640 ont été comparés en pharmaco-IRM chez le rat anesthésié à l'isoflurane à doses croissantes (0,16 mg/kg, 0,32 mg/kg et 0,63 mg/kg). En parallèle nous avons comparé les molécules aux mêmes doses chez le rat vigile en terme de métabolisme glucidique grâce à des expériences en microTEP avec le [¹⁸F]FDG. Les doses choisies sont des doses connues pour entraîner différents effets pharmacologiques

chez le rat (Newman-Tancredi, 2011 ; Llado-Pelfort *et al.*, 2012). Il est à noter que les molécules sont bien caractérisées chez cette espèce, permettant une comparaison directe des patterns d'activation obtenus avec de précédentes études.

Dans un second temps, nous avons comparé le F13640 et le F15599 chez le chat en utilisant la caméra TEP-IRM simultanée du CERMEP. Nous avons mesuré le taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par ces ligands en TEP, tout en mesurant les variations du signal BOLD induites par les agonistes en pharmaco-IRM. Le but de cette démarche était d'utiliser simultanément les informations apportées par les deux techniques d'imagerie pour obtenir des informations inédites relatives à la fois à l'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} et aux effets centraux induits par l'activation des récepteurs 5-HT_{1A}.

II - Matériel et méthodes

2.1. Animaux

Toutes les expérimentations animales ont été réalisées selon les directives du Conseil de la Communauté Européenne relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales (2010/63/EU), et après accord du comité d'éthique animale CELYNE de Lyon.

Des rats mâles adultes de souche Sprague Dawley (Charles River Laboratories, France) pesant 250+/-50g ont été utilisés dans les expériences de microTEP et de pharmaco-IRM. Ils sont hébergés dans des conditions standardisées de température (22°C) et d'humidité (50%), et ont accès à l'eau et la nourriture ad libitum. La lumière est réglée pour un cycle jour/nuit de 12h.

Des chats mâles européens ont été utilisés pour l'imagerie TEP/IRM simultanée. Leur hébergement se fait dans une pièce commune de stabulation (24°C et 50% d'humidité) avec une lumière artificielle de 7h à 19h, et nourriture et eau ad libitum.

2.2 Traitements pharmacologiques

2.2.1 F15599

Le F15599 ((3-chloro-4-fluorophenyl)-[4-fluoro-4-[[5-methylpyrimidin-2-yl)methylamino]methyl]piperidin-1-yl]methanone), ou NLX-101, a été fourni par la compagnie Neurolix. Dans notre étude, il a été injecté en intrapéritonéal chez le rat aux doses de 0,16 mg/kg, 0,32 mg/kg et 0,63 mg/kg et aux doses de 0,04 mg/kg, 0,08 mg/kg et 0,16 mg/kg chez le chat.

2.2.2 F13640

Le F13640, ((3-chloro-4-fluorophenyl)-[4-fluoro-4-[[5-methylpyridin-2-yl)methylamino]methyl]piperidin-1-yl]methanone), aussi appelé befiradol ou plus récemment NLX-112, a été fourni par la compagnie Neurolix. Dans notre étude, il a été injecté en intrapéritonéal chez le rat aux doses de 0,16 mg/kg, 0,32 mg/kg et 0,63 mg/kg et aux doses de 0,04 mg/kg, 0,08 mg/kg et 0,16 mg/kg chez le chat.

2.3. Protocole pharmaco-IRM chez le rat

2.3.1 Conception de l'étude

Les animaux étaient divisés en deux groupes, un par molécule (n=9 par groupe). Les rats ont subi des examens d'imagerie selon quatre conditions dans un ordre randomisé (avec 3 jours d'écart au minimum) : trois différentes doses de F13640 ou F15599 en intrapéritonéal (0,16, 0,32 et 0,63 mg/kg) et une injection de NaCl à 0,9% pour l'acquisition contrôle.

2.3.2 Procédures animales

Pour l'induction, les rats sont placés dans une boîte hermétique avec insufflation d'air respirable (1 L/min) et d'isoflurane (AÉrane, Baxter France) à 4%. L'anesthésie est ensuite maintenue avec un mélange d'air respirable (1 L/min) et d'isoflurane à 2%. Pour réaliser l'injection de l'agent pharmacologique en cours d'acquisition en provoquant le moins de perturbations mécaniques possibles, la cathétérisation de l'animal est effectuée au

préalable. Un cathéter est implanté dans la cavité péritonéale et maintenu à la paroi abdominale par deux points de suture. Une tubulure de prolongation est ensuite connectée au cathéter afin de permettre l'injection pendant que l'animal est dans la machine.

2.3.3 Acquisition des données

Le protocole d'imagerie par résonance magnétique a été réalisé sur une IRM Bruker Biospec 7 Tesla (Bruker Biospin GbmH, Allemagne). Les rats sont installés en décubitus ventral dans un tube de contention en plastique adapté à l'imagerie (Bruker Biospec Animal Handling Systems, Allemagne) avec un système de maintien de la tête et un cône de ventilation permettant de poursuivre l'anesthésie à 2% d'isoflurane pendant toute l'acquisition IRM. Le maintien de la température corporelle est assuré par un système de circuit hydraulique dédié. La température, la fréquence respiratoire et cardiaque sont enregistrés régulièrement pendant l'acquisition (Trigger ECG Unit RH V.0, Rapid Biomedical, (Allemagne)). Une antenne volumique Bruker type cage d'oiseau (diamètre externe 112 mm, diamètre interne 72 mm) a été utilisée pour l'émission du signal. Pour la réception du signal, nous avons utilisé une antenne de surface Bruker de type boucle (25 mm de diamètre) centrée au niveau de la tête de l'animal pour le ciblage du cerveau. Au début de l'acquisition, une image anatomique T2 RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) est réalisée avec les paramètres suivants : temps d'écho (TE) de 69.1 ms, temps de répétition (TR) de 5000 ms, champ de vue : 3.0 x 1.50 cm², matrice : 256 x 128 pixels (résolution spatiale de 117 μm²), facteur RARE : 8, pour une durée d'acquisition de 4 minutes. 14 coupes de 1,50 mm d'épaisseur ont été réalisées afin de couvrir l'ensemble du cerveau, depuis l'avant du cortex frontal jusqu'à la partie caudale du cervelet. L'acquisition fonctionnelle est ensuite effectuée par mesure du signal BOLD à l'aide d'une séquence T2* EPI (Echo Planar Imaging) avec les paramètres suivants : TE de 25 ms, TR de 3000 ms, matrice : 128 x 64 pixels (résolution spatiale de 234 μm²), pour une durée d'acquisition d'une heure soit 1200 répétitions. Les images sont acquises selon le même champ de vue et les mêmes coupes que l'image anatomique. Pour chaque scan, la ligne de base était acquise pendant 15 minutes (soit 300 répétitions), suivi de l'injection intrapéritonéale et d'une période de post-injection de 45 minutes (soit 900 répétitions). Les volumes injectés étaient calibrés à 600 μL avec une durée d'injection d'environ 30 secondes, immédiatement suivie

d'un rinçage par du sérum physiologique d'un volume de 600 μL , correspondant au volume mort de la tubulure. Après l'acquisition, les images brutes sont converties en format DICOM puis NIfTI pour l'analyse statistique sur SPM.

2.3.4 Traitement des données

2.3.4.1 Prétraitement des données et analyse statistique sur SPM12

Le logiciel Statistical Parametric Mapping (SPM12, Friston, The Wellcome Trust Center for Neuroimaging, London, UK) a été utilisé pour l'analyse statistique. Ce type d'analyse nécessite plusieurs étapes de prétraitement afin de permettre la comparaison intra ou inter-sujets. Pour chaque acquisition, les images sont tout d'abord réalignées entre elles par un algorithme itératif utilisant la cross-corrélation comme critère de similarité sur un modèle de transformation rigide, ce qui permet de corriger les éventuels mouvements entre répétitions. Ce réalignement est ensuite effectué entre la totalité des acquisitions. Les images réalignées sont normalisées spatialement par un algorithme de déformation spatiale intégrant une transformation rigide et élastique, sur un template définissant un espace stéréotaxique de référence (Lancelot *et al.*, 2014) correspondant à une moyenne de la totalité des images fonctionnelles. Cette normalisation permet d'effectuer une analyse voxel à voxel des images placées dans un même espace de référence. Enfin, les données sont lissées par un filtre gaussien isotropique (0,8 x 0,8 x 0,8 mm).

Un premier niveau d'analyse a été réalisé pour chaque sujet. Pour cela, les différentes séquences IRMf de 1200 répétitions sont divisées en 4 périodes de 15 minutes chacune soit 300 répétitions. Les 15 premières minutes correspondent à la ligne de base (période T0), tandis que les 3 périodes suivantes correspondent aux 45 minutes après injection (périodes T1 à T3). Ces différentes périodes temporelles ont été implémentées dans l'analyse SPM en utilisant une approche par modèle linéaire généralisé.

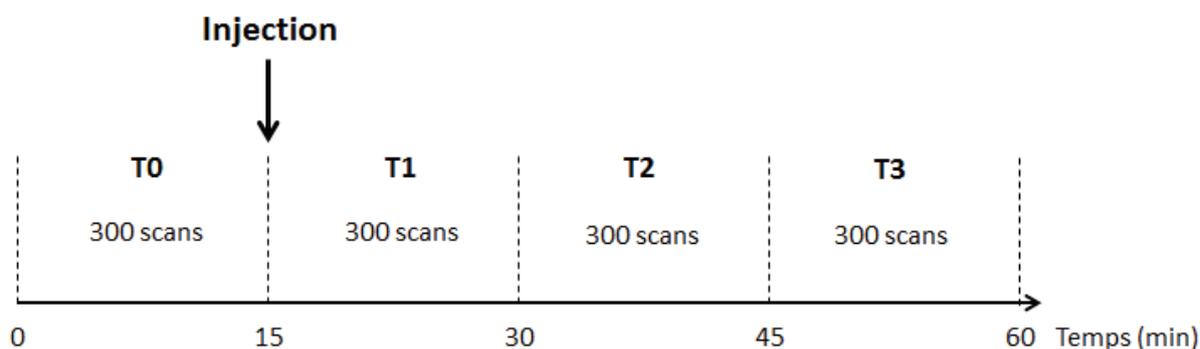


Figure 56 : Différentes périodes utilisées pour l'analyse SPM chez le rat en pharmac-IRM. L'injection intrapéritonéale de l'agent pharmacologique était réalisée 15 minutes après le début de l'acquisition. La période après injection est divisée en trois périodes de 15 minutes.

Pour chaque acquisition, les périodes T1 à T3 sont comparées à T0 par un test t de Student. On obtient donc de cette analyse intra-sujet trois contrastes (T1/T2/T3– T0), pour chaque sujet et pour chaque condition. Ensuite, une analyse de second niveau (ANOVA) est réalisée entre les sujets afin de déterminer les voxels significativement différents après injection de l'agent pharmacologique comparé au groupe contrôle. Dans ce second niveau d'analyse, on réalise des cartes d'activation du F15599 ou du F13640 comparé au NaCl pour chaque période en utilisant les contrastes du premier niveau, déjà normalisés par rapport à la ligne de base. Pour chaque dose d'agoniste, six contrastes différents sont calculés : trois contrastes d'activation $[(T1/T2/T3 - T0)_{\text{Agoniste}} - (T1/T2/T3 - T0)_{\text{NaCl}}]$, correspondant aux voxels dont l'intensité était significativement augmentée comparé à l'injection de NaCl, et trois contrastes d'inhibition $[(T1/2/3 - T0)_{\text{NaCl}} - (T1/2/3 - T0)_{\text{Agoniste}}]$, correspondant aux voxels dont l'intensité était significativement diminuée comparé à l'injection de NaCl. Le seuil de significativité des tests réalisés au niveau de chaque voxel était fixé à $p < 0.001$ (non corrigé de la corrélation spatiale entre voxels).

2.3.4.2 Extraction des cinétiques BOLD et analyse statistique corrigée

Pour ce type d'analyse il peut être utile d'extraire les courbes du signal BOLD brut, notamment dans certaines régions comme les ventricules et la matière blanche. En effet, dans ces régions les variations du signal peuvent être considérées comme non spécifiques étant donné qu'elles ne contiennent pas de récepteurs, et reflètent majoritairement les possibles fluctuations du rythme respiratoire ou cardiaque (Mandeville *et al.*, 2014). Pour cela, nous avons utilisé un outil dédié développé par le CERMEP, « ExtractTool », qui est

intégré à SPM et permet d'extraire le signal moyen sur des images au format NIfTI à l'aide d'un atlas. Pour chaque acquisition, nous avons donc extrait le signal BOLD sur les 1200 images (préalablement normalisées dans SPM) dans les ventricules et la matière blanche à l'aide de l'atlas dédié au cerveau de rat (Lancelot *et al.*, 2014), qui est normalisé sur le même template que les images prétraitées. Nous avons utilisé les cinétiques BOLD brutes dans ces régions comme variable de non-intérêt dans le premier niveau d'analyse intra-sujet de manière à s'affranchir des potentiels effets cardiovasculaires et respiratoires des agonistes 5-HT_{1A}.

2.4 Protocole microTEP

2.4.1 Conception de l'étude

Comme pour le protocole IRMf, les animaux étaient divisés en deux groupes, un par molécule (n=9 pour le F13640, n=8 pour le F15599). Les quatre acquisitions par rat, correspondant à quatre conditions, étaient réalisées dans un ordre randomisé (avec 3 jours d'écart au minimum) : trois différentes doses de l'agoniste 5-HT_{1A} F13640 ou F15599 en intrapéritonéal (0,16, 0,32 et 0,63 mg/kg) et une injection de NaCl à 0,9% pour l'acquisition contrôle.

2.4.2 Procédures animales et acquisition des données

Douze heures avant l'expérience, les rats sont privés de nourriture afin de maximiser et d'homogénéiser la captation cérébrale de [¹⁸F]FDG. Un cathéter est placé au niveau de la veine caudale du rat vigile en vue de l'injection du radiotracer. Pour cela, le rat est placé dans une boîte de contention adaptée. Ensuite, le protocole démarre par l'injection intrapéritonéale de l'agent pharmacologique en conditions vigiles (F13640, F15599 ou NaCl). 15 minutes plus tard, le rat reçoit l'injection intraveineuse de [¹⁸F]FDG à environ 37 kBq/g. Pendant les 30 minutes nécessaires à l'incorporation du [¹⁸F]FDG dans les cellules, le rat peut se déplacer librement dans une cage, chauffée afin d'éviter une éventuelle hypothermie pouvant altérer le métabolisme glucidique, et filmée afin de pouvoir estimer visuellement la locomotion de l'animal. Pour l'acquisition microTEP (PET/CT, Inveon, Siemens, Germany), le rat est anesthésié par induction à l'isoflurane à 4% et placé en décubitus ventral sur un lit

adapté (Bruker Animal Handling Systems). L'anesthésie gazeuse est maintenue pendant toute la durée de l'examen à un taux de 2 % d'isoflurane. La fréquence respiratoire est surveillée grâce à un capteur de pression connecté à un ordinateur (Biovet, USA). L'acquisition TEP statique est réalisée pendant 30 minutes, suivi par un scanner de transmission X de 10 minutes.

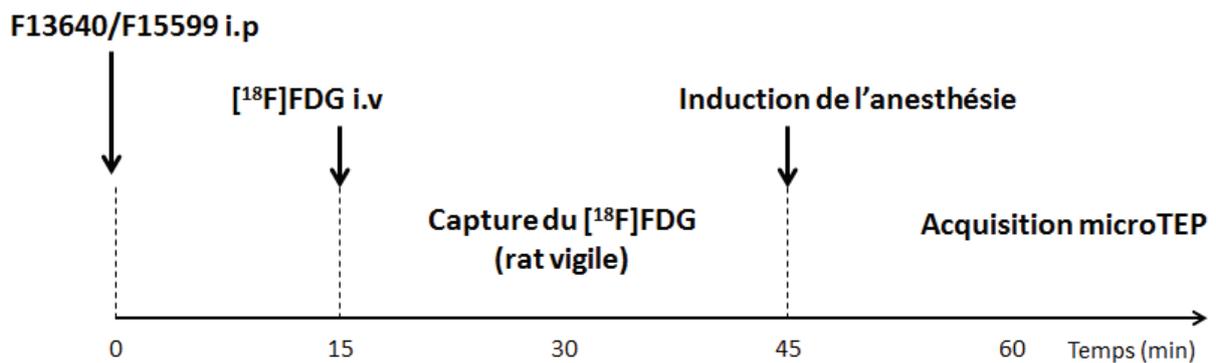


Figure 57 : Protocole d'acquisition microTEP au $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ chez le rat. L'animal vigile reçoit l'injection de l'agent pharmacologique, puis de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 15 minutes plus tard. La capture du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ a lieu pendant 30 minutes en conditions vigiles, puis l'animal est anesthésié à l'isoflurane avant l'acquisition.

2.4.3 Analyse statistique

Pour l'analyse, les images statiques sont normalisées en SUV, réalignées et normalisées sur un template TEP correspondant à la moyenne des acquisitions avec le $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$. L'analyse statistique est réalisée sur SPM à l'aide d'un test t de Student, en effectuant des contrastes (NaCl-Agoniste) et (Agoniste-NaCl) afin de cartographier les voxels présentant un signal statistiquement plus élevé ou plus faible comparé au sérum physiologique. Le seuil statistique est fixé à $p < 0.001$ au niveau du voxel.

2.5 Protocole TEP/IRM chez le chat

2.5.1 Conception

L'étude a été réalisée sur quatre chats ayant subi des acquisitions selon sept conditions différentes chacun, dans un ordre randomisé (minimum de quatorze jours d'écart

entre les scans) correspondant aux trois doses (0,04, 0,08 et 0,16 mg/kg) de chaque agoniste et une injection contrôle de sérum physiologique.

2.5.2 Procédures animales

Une prémédication à la médétomidine (30 à 60 µg/kg en sous cutané) est réalisée environ 90 minutes avant le début de l'expérimentation. L'anesthésie est induite 20 à 30 minutes plus tard par une co-injection intramusculaire de métédomidine (25 à 40 µg/kg) et de kétamine (2 à 3 mg/kg). Un premier cathéter est placé dans la veine céphalique de la patte avant du chat pour l'injection du radiotraceur, et un second dans la cavité péritonéale pour l'injection de l'agent pharmacologique durant l'acquisition. Après analgésie du tractus respiratoire supérieur à l'aide d'un spray de lidocaïne, une canule est placée dans la trachée de l'animal afin d'assurer la ventilation artificielle durant l'expérimentation (rythme à 15 respirations par minute, pression de 15 cm d'eau et débit d'oxygène de 0,8 à 1L par minute). Le chat est placé en décubitus ventral dans un cadre stéréotaxique en plexiglas, la tête maintenue grâce à des barres d'oreilles. L'anesthésie est maintenue par insufflation constante d'isoflurane à 2% durant l'acquisition. La température corporelle est maintenue par un tapis chauffant, tandis que les signes vitaux incluant fréquence cardiaque, fréquence respiratoire, saturation en oxygène, taux de CO₂ expiré et température corporelle étaient suivis en continu.

2.5.3 Acquisition des données

Les examens sont réalisés sur une caméra hybride TEP/IRM Siemens Biograph mMR (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). Le [¹⁸F]MPPF est administré en bolus (55 +/- 19 MBq dans 1 mL de sérum physiologique) suivi d'une infusion constante pendant 90 minutes (Kbol = 45 min) pour permettre de mesurer le taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} en une acquisition. Les données TEP sont acquises continuellement en mode liste au cours de ces 90 minutes. 50 minutes après le début du scan, l'injection intrapéritonéale de l'agent pharmacologique est réalisée à l'aide d'un tube connecté au cathéter, suivi immédiatement par un rinçage (0,6 mL de NaCl 0,9% correspondant au volume mort).

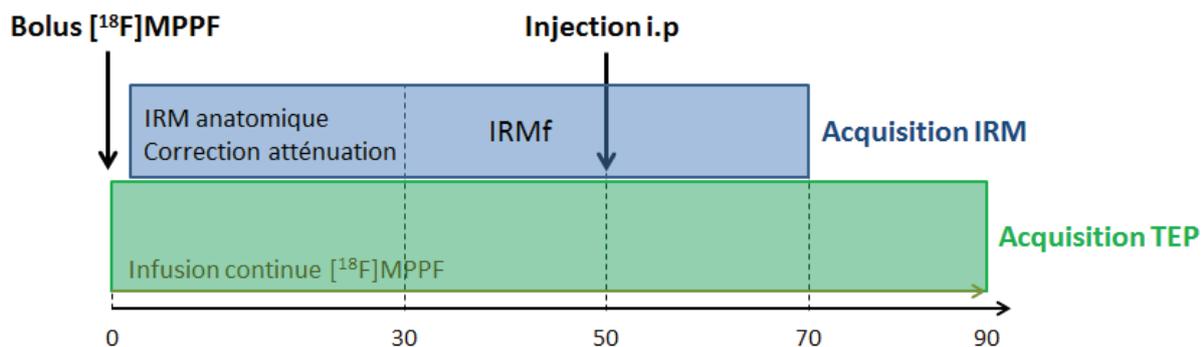


Figure 58 : Protocole d'acquisition TEP/IRM chez le chat. L'acquisition TEP démarre avec l'injection bolus de $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ à $T=0$ minute, suivi par une infusion continue pendant la totalité du scan soit 90 minutes. En parallèle, l'image anatomique et l'image permettant la correction d'atténuation sont acquises en IRM. La mesure du signal BOLD en IRMf a lieu de 30 à 70 minutes. L'injection de l'agent pharmacologique est effectuée à 50 minutes.

Pour l'acquisition IRM, une antenne 4-canaux flexible est placée au-dessus de la tête, combinée à une antenne type boucle (7 cm de diamètre) placée au niveau du cou. Une image anatomique structurale est réalisée par une séquence par écho de gradients T1 MP-RAGE de paramètres suivants : taille de la matrice = $128 \times 128 \times 88$; résolution isotropique de 0,6 mm ; TE = 2.74 ms ; TR = 1330 ms ; temps d'inversion (TI) du T1 : 900 ms. Le ratio signal/bruit est optimisé en utilisant un angle d'inclinaison de 9° . Les données IRMf sont acquises avec une séquence T2*-EPI de paramètres suivants : TE = 30 ms ; TR = 2000 ms ; taille de la matrice = 76×76 , sur 24 coupes d'une résolution de $1.2 \times 1.2 \times 2 \text{ mm}^3$. Au total, 1200 répétitions sont acquises durant 40 minutes (de 20 minutes avant à 20 minutes après le challenge pharmacologique). Les cartes d'atténuation de correction du signal TEP sont dérivées d'une séquence IRM Dixon (matrice de 160×160 avec 128 coupes, voxels de $1.6 \times 1.6 \times 2 \text{ mm}^3$, TR = 4 ms, TE = 1.23 ms).

Les images TEP dynamiques sont reconstruites en 3D par un algorithme OP-OSEM avec des corrections de normalisation, d'atténuation, de diffusé, de décroissance radioactive et de temps mort. La reconstruction OP-OSEM utilise 3 itérations et 21 sous-ensembles donnant une matrice de 256×256 et 127 coupes, avec des voxels de $0.7 \times 0.7 \times 2.03 \text{ mm}^3$. Les intensités de voxels sont calibrées en kBq/cc. Les images reconstruites sont post-filtrées avec un filtre gaussien 3D de 2 mm. L'acquisition est partagée en 19 frames de 5 minutes.

2.5.4 Analyse des données TEP

2.5.4.1 Analyse par régions d'intérêt

Pour chaque chat, les images TEP ont été recalées automatiquement sur une IRM anatomique correspondante, pour être ensuite normalisées sur un template correspondant à une moyenne d'images anatomiques (Lancelot *et al.*, 2010). Un atlas définissant des régions d'intérêt sur ce template a été utilisé pour l'extraction des courbes cinétiques en Bq/cm³. La fixation du [¹⁸F]MPPF dans chaque région d'intérêt a été estimée pour chaque frame en calculant un ratio par rapport au cervelet, région de référence car dépourvue de fixation spécifique. Les cinétiques de ratio de fixation ainsi obtenues ont été utilisées pour calculer un taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par le F13640 ou le F15599 en comparant ces ratios moyennés sur différentes périodes avant et après challenge pharmacologique, par la formule :

$$\text{Occupation (\%)} = \frac{\text{Ratio(Ligne de base)} - \text{Ratio(Postinjection)}}{\text{Ratio(Ligne de base)} - 1} \times 100$$

La période choisie pour la ligne de base était comprise entre 40 et 50 minutes. La période post-injection choisie était comprise entre 60 et 90 minutes. Les taux d'occupation dans les différentes régions d'intérêt ont ensuite été moyennés entre les chats pour chaque dose et comparés à l'injection de NaCl par des tests t de Student. Pour chaque région et chaque dose, les cinétiques moyennes normalisées par rapport au cervelet ont également été comparées entre les différentes doses et l'injection contrôle par ANOVA à deux facteurs (seuils statistiques : p<0.05 ; Graphpad Prism 6).

2.5.4.2 Analyse statistique voxel à voxel

Après l'étape de normalisation spatiale des images TEP sur le template IRM, des images ratios ont été créées pour chaque acquisition en rapportant le signal de chaque voxel au signal moyen dans le cervelet. Des images ainsi normalisées en valeur d'intensité par rapport au cervelet ont été créées à partir du signal moyen entre 40 et 50 minutes (images correspondant à la période avant injection) et du signal moyen entre 60 et 90 minutes (images correspondant à la période après injection). Ces images ont été converties au format

NIfTI pour l'analyse par le logiciel SPM12. Après lissage par filtre gaussien isotropique (2 x 2 x 2 mm), l'analyse statistique a été réalisée entre les différents sujets pour chaque condition en utilisant un test t de Student et un contraste [(Image avant injection) – (Image après injection)]. Le seuil statistique était fixé à $p < 0.01$.

2.5.5 Analyse des données pharmaco-IRM

Les données IRMf ont été analysées avec SPM12. Quatre étapes de prétraitement ont été utilisées afin de permettre la comparaison entre sujets :

- une étape de réalignement utilisant un algorithme de cross-corrélation pour corriger des éventuels mouvements,
- une étape de correction des distorsions spatiales possiblement observées en cas d'inhomogénéités du champ magnétique,
- une normalisation spatiale sur le template IRM anatomique (Lancelot *et al.*, 2010)
- un lissage utilisant un filtre Gaussien isotropique (2x2x2 mm).

Pour chaque chat, une analyse statistique de premier niveau (intra-sujet) a été réalisée pour les sept conditions expérimentales. Deux périodes ont été définies, une ligne de base correspondant aux 600 répétitions avant injection, et une période post-injection correspondant aux 600 répétitions après injection. Ces périodes ont été introduites dans un modèle en blocs sur SPM utilisant une approche par modèle linéaire généralisé. Pour chaque condition de chaque chat, la période post-injection était comparée à la ligne de base grâce à un test t de Student. Ce premier niveau d'analyse résulte en 7 images de contrastes par sujets, correspondant aux contrastes (Post-injection – Ligne de base). La moyenne du signal BOLD global de l'image a été utilisée comme régresseur dans l'analyse, afin de corriger la dérive du signal observée fréquemment au cours d'acquisitions IRMf longues. Des analyses de second niveau ont ensuite été utilisées pour déterminer les variations significatives de signal BOLD dans les différents voxels pour chaque dose de molécule comparé à l'injection contrôle. Ces analyses ANOVA permettent d'obtenir des cartes d'activation pour chaque dose d'agoniste, de contraste [(Post-injection - Ligne de base)_{Agoniste} – (Post-injection – Ligne de base)_{NaCl}]. Des variations négatives du signal BOLD ont aussi été explorées grâce au

contraste inverse $[(\text{Post-injection} - \text{Ligne de base})_{\text{NaCl}} - (\text{Post-injection} - \text{Ligne de base})_{\text{Agoniste}}]$. Le seuil statistique était fixé à $p < 0.05$ non corrigé.

2.5.6 Analyse par corrélation TEP et IRMf

Afin d'utiliser les données TEP et IRMf de manière simultanée, nous avons mesuré pour chaque molécule la corrélation voxel à voxel entre les variations en TEP, estimant l'occupation au niveau des récepteurs 5-HT_{1A}, et les variations du signal BOLD en IRMf. Pour cela nous avons utilisé le logiciel Biological Parametric Mapping (BPM), conçu pour fonctionner de manière complémentaire avec SPM et permettant de mesurer des corrélations entre deux modalités d'imagerie à l'échelle du voxel (Casanova *et al.*, 2007). Les données TEP utilisées pour cette étape sont des images créées à partir des images ratios obtenues pour l'analyse TEP. Pour chaque acquisition, nous avons soustrait l'image ratio de post-injection à l'image ratio de pré-injection, afin d'obtenir une image dont le signal varie proportionnellement à l'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par le F13640 ou le F15599. Pour les images IRMf nous avons utilisé les contrastes de premier niveau obtenus dans l'analyse précédente. Pour chaque molécule, le logiciel BPM a mesuré la corrélation des variations du signal TEP et IRMf au niveau de chaque voxel entre les différentes conditions, pour les 4 animaux (c'est-à-dire que pour chaque molécule nous avons utilisé les images TEP et IRMf de la condition contrôle et des trois doses). Une fois le calcul de facteur de corrélation réalisé, la carte obtenue était importée dans SPM5 et pour visualiser les corrélations significatives entre TEP et IRMf au niveau du voxel, au seuil statistique $p < 0.05$ (les valeurs de p sont calculées à partir des coefficients de corrélation selon une formule d'approximation appliquée par BPM, valide si le lissage des voxels est le même pour les deux modalités – voir Casanova *et al.*, 2007). Un masque a été appliqué pour n'inclure que les voxels du cerveau (cervelet non inclus puisque cette région était utilisée comme référence pour générer les images ratio en TEP).

III - Résultats

3.1. Etude en pharmaco-IRM chez le rat

3.1.1 Décours temporel du signal BOLD brut

L'injection intrapéritonéale de F13640, ou de F15599, induit des modifications rapides du signal BOLD dans de multiples régions d'intérêt, visibles sur les cinétiques du signal brut et cela à toutes les doses évaluées (figure 59). Pour illustration, une augmentation du signal d'environ 3 à 5 % est observée dans le cortex cingulaire. Cette augmentation apparaît rapidement après injection et se prolonge jusqu'à la fin de l'acquisition. Si l'analyse du signal brut permet d'estimer la taille de l'effet, ces cinétiques ne sont pas utilisées directement pour comparer les molécules car elles ne permettent pas de cartographier précisément les régions activées, ne sont pas corrigées par rapport à la dérive du signal, et ne prennent pas en compte les effets non spécifiques des molécules sur le signal BOLD (non relatifs à l'activation neuronale mais à des effets périphériques éventuels).

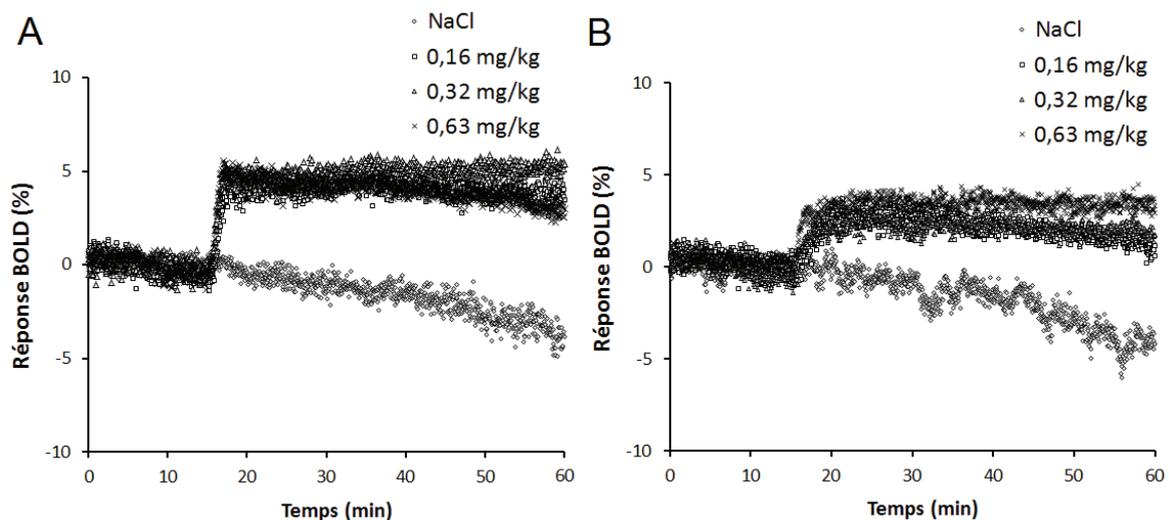


Figure 59 : Signal BOLD moyen mesuré dans le cortex cingulaire pour les différents groupes, centré autour de zéro par rapport à la période avant injection. L'injection était effectuée à 15 minutes d'acquisition. A – Réponse BOLD pour le groupe ayant reçu le F13640 (n=9) ; B – Réponse BOLD pour le groupe ayant reçu le F15599 (n=9).

3.1.2 Cartes d'activation

Les variations du signal BOLD (augmentation ou diminution) induites par l'administration des agonistes 5-HT_{1A} comparés à la solution saline ont permis de générer des cartes statistiques de modification du signal BOLD (voir figures 60 à 62 pour le F13640, et 63 à 65 pour le F15599). Ces comparaisons ont été effectuées pour chaque dose d'agoniste et trois périodes post-injection (0 à 15 minutes après injection pour T1, 15 à 30 minutes après injection pour T2 et 30 à 45 minutes après injection pour T3).

3.1.2.1 Cartes relatives au F13640

Le F13640 induit des variations significatives du signal BOLD (augmentations en rouge, diminutions en bleu) dans de nombreuses régions pour toutes les doses évaluées (figures 60 à 62). A la dose de 0,16 mg/kg, plusieurs régions montrent une activation d'apparition progressive, modeste à T1 et maximale à T3 (figure 60). Les régions les plus activées sont le cortex cingulaire (bregma +0.90 mm et +0.30 mm), le thalamus dorsal et l'habenula (bregma -3.00 à -5.40 mm), le cortex rétrosplénial (bregma -5.40 à -6.60 mm) et le colliculus (-6.60 à -7.50 mm), avec des valeurs de T scores variant de 4 à 7 environ dans ces régions à T1, et de 8 à 12 à T3 (avec un maximum de 15 dans le thalamus dorsal). On observe également une activation au niveau des noyaux magnocellulaires (bregma +0.30 mm à -2.40 mm) qui apparaît dès T1 et s'étend au bras horizontal de la bande diagonale de Broca à T2 et T3 (bregma +0.90 à +0.30 mm). Enfin, des voxels activés apparaissent au niveau de l'insula à partir de T2 (bregma +0.30 mm). D'autres régions présentent au contraire une baisse du signal BOLD. A T1, on observe une inhibition significative dans quelques voxels situés au niveau du cortex orbital (bregma +3.90 mm), de la partie dorsale de l'hippocampe, du cortex somatosensoriel (-2.40 à -4.20 mm), de l'hypothalamus (-2.40 à -3.00 mm) et du subiculum (-7.50 mm). Une inhibition importante est retrouvée au niveau du raphé médian et du reste du tronc cérébral (-7.50 à -12.35 mm), ainsi que dans le cervelet. L'effet inhibiteur est maximal à T2 et T3 et s'étend de manière importante, notamment au niveau de l'hippocampe et du cortex somatosensoriel. Des voxels inhibés sont aussi présents dans l'amygdale (bregma -2.40 à -3.00 mm), le raphé dorsal (-7.50 mm), le cortex visuel (-6.60 à -7.50 mm) et le cortex entorhinal (-7.50 mm) à partir de T2. En termes d'intensité, les voxels les plus significatifs se situent au niveau du tronc cérébral, du raphé et du cervelet (T

scores respectifs d'environ 12, 9 et 10 à T3), suivis par le cortex somatosensoriel, le cortex visuel et le cortex orbital (T scores respectifs de 7, 6 et 6 à T3).

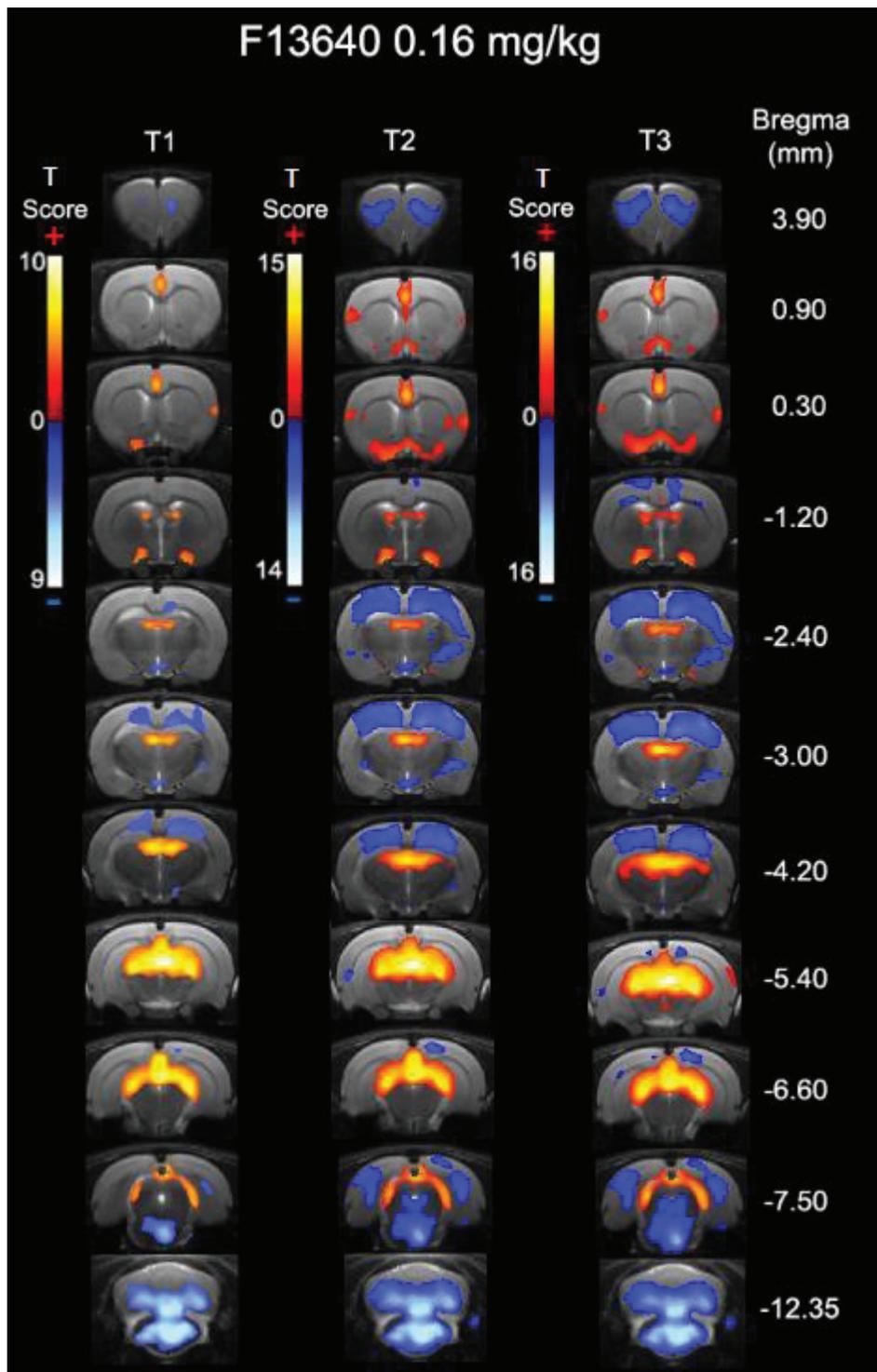


Figure 60 : Cartographie des modifications du signal BOLD induites par le F13640 à 0,16 mg/kg chez le rat, sur trois périodes successives de 15 minutes après injection (T1 à T3). Les voxels significativement activés apparaissent en rouge, les voxels inhibés en bleu ($p < 0.001$).

A la dose de 0,32 mg/kg on retrouve un pattern d'activation similaire à la dose inférieure, avec une forte activation au niveau du thalamus dorsal et de l'habenula, du colliculus et du cortex rétrosplénial, qui démarre à T1 et est maximale à T3 (T scores de 10 à 18 dans ces régions). Le cortex cingulaire est également activé avec une significativité et un décours temporel comparable à la dose de 0,16 mg/kg (T score de 5 à T1 et 10 à T3). Une activation apparaît comme précédemment au niveau des noyaux magnocellulaires préoptiques et du cortex insulaire à T1, qui s'étend à la bande diagonale de Broca et à la partie ventrale du striatum à T2 et T3 (bregma +0.90 à +0.30 mm). Dans ces régions l'activation est plus étendue et légèrement plus prononcée qu'à 0,16 mg/kg (à T3, T scores de 5 à 9 contre 4 à 8 pour la dose précédente). Les inhibitions du signal BOLD sont retrouvées avec un pattern spatiotemporel comparable à la dose précédente, avec une diminution très significative au niveau du tronc cérébral et du cervelet (T scores respectifs de 12 et 7 à T1, et 20 et 12 à T3). Dans le reste du cerveau, l'inhibition est peu étendue à T1 et quelques voxels inactivés sont localisés au niveau du cortex orbital (+3.90 mm), du cortex somatosensoriel (-4.20 mm), de l'amygdale (-3.00 à -4.20 mm), du raphé médian (-7.50 mm) et en bordure de l'hippocampe dorsal et ventral (-3.00 à -5.40 mm). L'inhibition s'étend de manière importante à T2 et T3 dans ces régions et apparaît aussi au niveau du cortex visuel (-6.60 mm), du subiculum (-6.60 à -7.50 mm), du cortex entorhinal et du raphé dorsal (-7.50 mm). Dans la quasi-totalité de ces régions, l'inactivation est légèrement plus significative que la dose de 0,16 mg/kg, excepté au niveau du raphé (à T3, T score de 6 contre 9 pour la dose précédente). Enfin, à bregma -2.40 et -3.00 mm, on peut noter la présence de voxels dans le thalamus à T2 et T3.

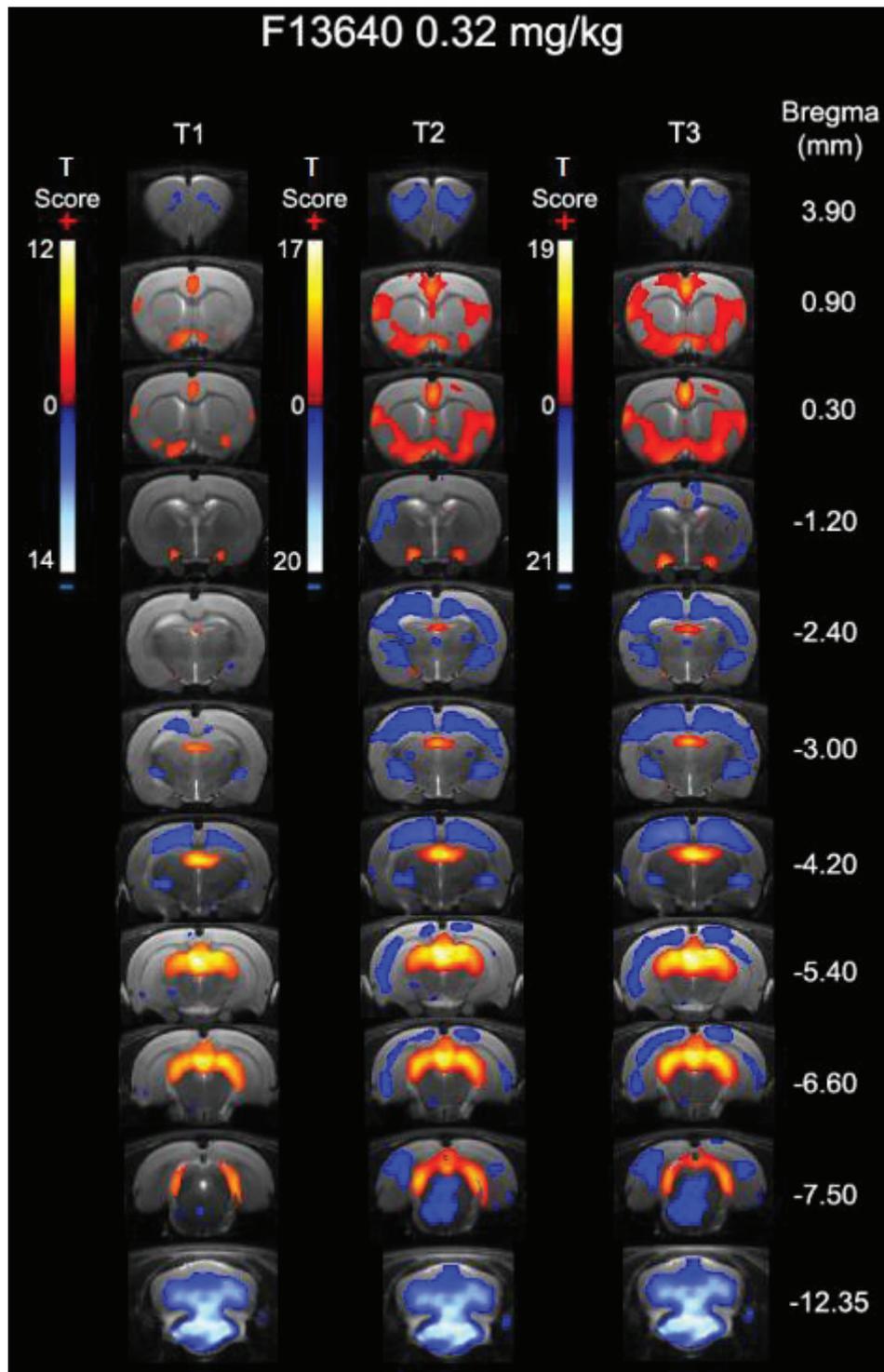


Figure 61 : Cartographie des modifications du signal BOLD induites par le F13640 à 0,32 mg/kg chez le rat, sur trois périodes successives de 15 minutes après injection (T1 à T3). Les voxels significativement activés apparaissent en rouge, les voxels inhibés en bleu ($p < 0.001$).

A la dose de 0,63 mg/kg et comme pour les doses précédentes, l'habenula, le thalamus dorsal, le colliculus et le cortex rétrosplénial sont fortement activés, surtout à T3, avec un niveau de significativité plus important qu'à 0,32 mg/kg (T scores de 10 à 19). Au niveau des noyaux magnocellulaires on retrouve une augmentation du signal BOLD importante et supérieure aux doses précédentes, avec une extension au bras horizontal de la bande diagonale de Broca à T2 (bregma +0.30 mm). En revanche, le pattern d'activation à ce niveau de coupe apparaît plus restreint qu'aux doses précédentes, et on ne retrouve presque aucun voxel significatif dans le cortex insulaire et le striatum ventral. Au niveau du cortex cingulaire, l'augmentation est également plus modeste qu'aux doses précédentes (à T3, les voxels les plus significatifs présentent un T score de 8, contre 10 pour les doses plus faibles). Comme précédemment, le tronc et le cervelet apparaissent fortement inhibés à cette dose, mais de manière légèrement moins significative à 0,32 mg/kg (T scores de 18 et 9 à T3, contre 20 et 12). On retrouve toujours une inhibition d'apparition progressive et très étendue à T2 et T3 comparé à T1 au niveau du cortex somatosensoriel, de l'hippocampe dorsal, de l'amygdale, du subiculum, du cortex visuel et entorhinal, avec une intensité comparable à la dose de 0,32 mg/kg. Des voxels significatifs sont observés dans le thalamus ventral (-2.40 à -4.20 mm) et l'hypothalamus (-5.40 mm). Au niveau du raphé (-7.50 mm), l'inhibition démarre au niveau du raphé médian et s'étend au raphé dorsal et au niveau des noyaux pontiques à T2 et T3 de manière plus marquée qu'aux doses précédentes (T score jusqu'à 11 à T3). Enfin, le cortex orbital apparaît peu inhibé contrairement aux doses précédentes (à peine quelques voxels apparaissent à T2, non visibles sur la figure 62).

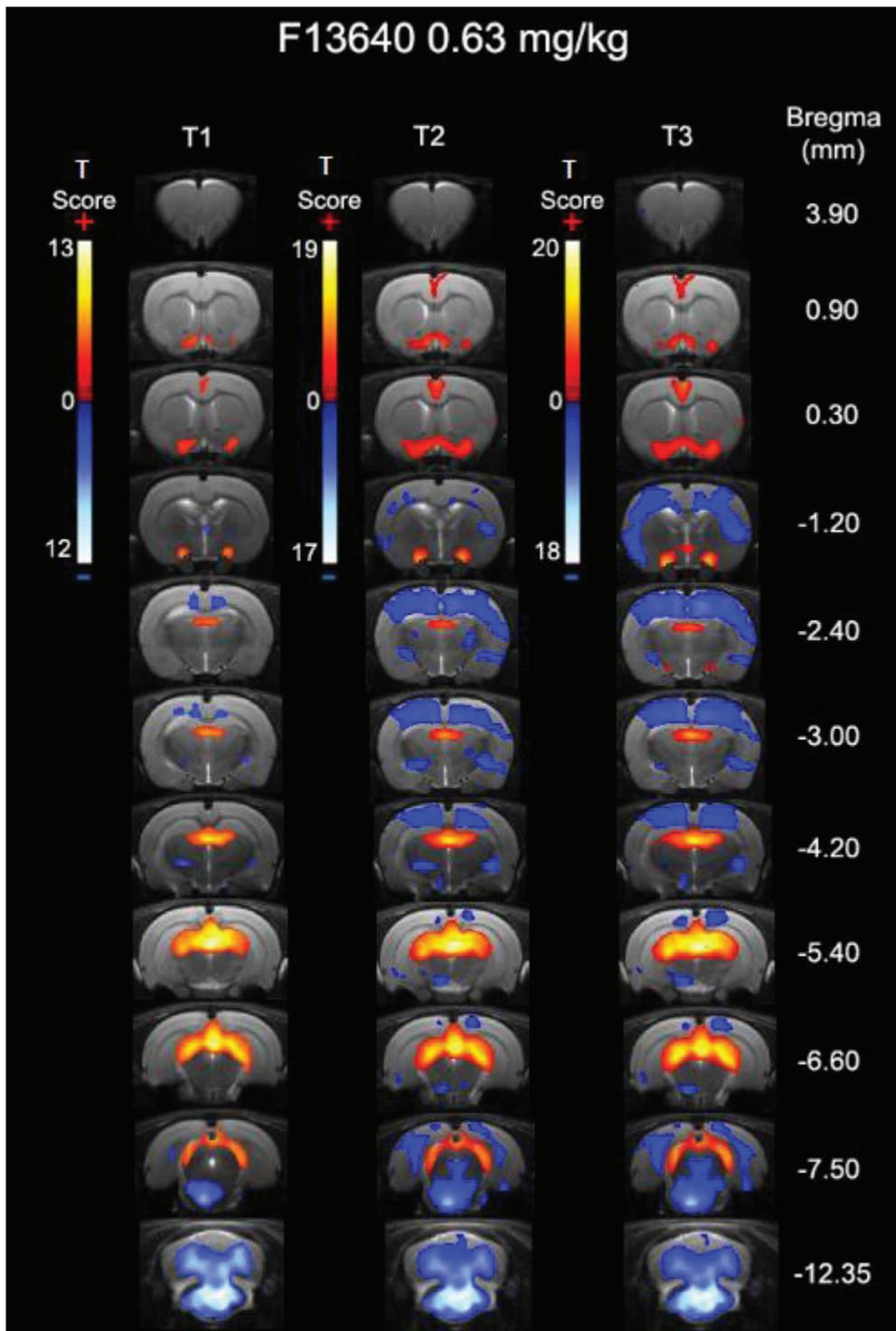


Figure 62 : Cartographie des modifications du signal BOLD induites par le F13640 à 0,63 mg/kg chez le rat, sur trois périodes successives de 15 minutes après injection (T1 à T3). Les voxels significativement activés apparaissent en rouge, les voxels inhibés en bleu ($p < 0.001$).

3.1.2.2 Cartes relatives au F15599

Le F15599 induit des variations significatives du signal BOLD (augmentations en rouge, diminutions en bleu) dans de nombreuses régions pour toutes les doses évaluées (figures 63 à 65), avec un pattern spatiotemporel légèrement différent du F13640.

A 0,16 mg/kg, le F15599 induit une activation des noyaux magnocellulaires préoptiques (-1.20 mm), de l'habenula et du thalamus dorsal (-3.00 à -5.40 mm), des colliculi et du cortex rétrospinal (-6.60 mm). Ces activations sont modestes et peu significatives à T1 et augmentent progressivement jusqu'à T3 (T score de 7 dans les noyaux magnocellulaires à 11 dans le thalamus). A partir de T2, on peut voir une activation très ciblée au niveau du cortex cingulaire (T score d'environ 5), de la partie plus rostrale du cortex somatosensoriel (bregma +0.90 mm) et de la partie la plus médiane de la bande diagonale de Broca, en dessous du septum latéral (+0.90 à +0.30 mm). Une activation unilatérale est observée en partie temporale du cortex à T3 (bregma -3.00 mm).

Les inhibitions induites par le F15599 à 0,16 mg/kg sont faibles à T1 et limitées à quelques voxels en bordure de l'hippocampe dorsal et dans l'hypothalamus (-4.20 mm), ainsi que dans de petites zones du tronc et du cervelet. A T2 et T3, l'inhibition du signal s'étend à la quasi-totalité du tronc cérébral et du cervelet, ainsi qu'en bordure de l'hippocampe dorsal et ventral (-3.00 à -5.40 mm), au subiculum (-6.60 mm) et au cortex visuel (-7.50 mm). A partir de T2 on voit apparaître une diminution significative du signal BOLD au niveau du cortex somatosensoriel, de manière unilatérale (bregma -1.20 mm) ainsi que dans le cortex orbital (bregma +3.90 mm) et le septum latéral (+0.90 à +0.30 mm).

A la dose de 0,32 mg/kg, le F15599 provoque une activation légèrement plus significative qu'à 0,16 mg/kg au niveau du thalamus dorsal, de l'habenula, du cortex rétrospinal et des colliculi. Les noyaux magnocellulaires et le cortex cingulaire sont activés à un niveau de significativité presque comparable (T scores jusqu'à 10 et 11 à T3, respectivement). En revanche on ne trouve que très peu de voxels activés dans le cortex somatosensoriel contrairement à la dose précédente. On peut également noter une activation en partie latérale et ventrale du striatum à partir de T2 (0.90 mm à -1.20 mm).

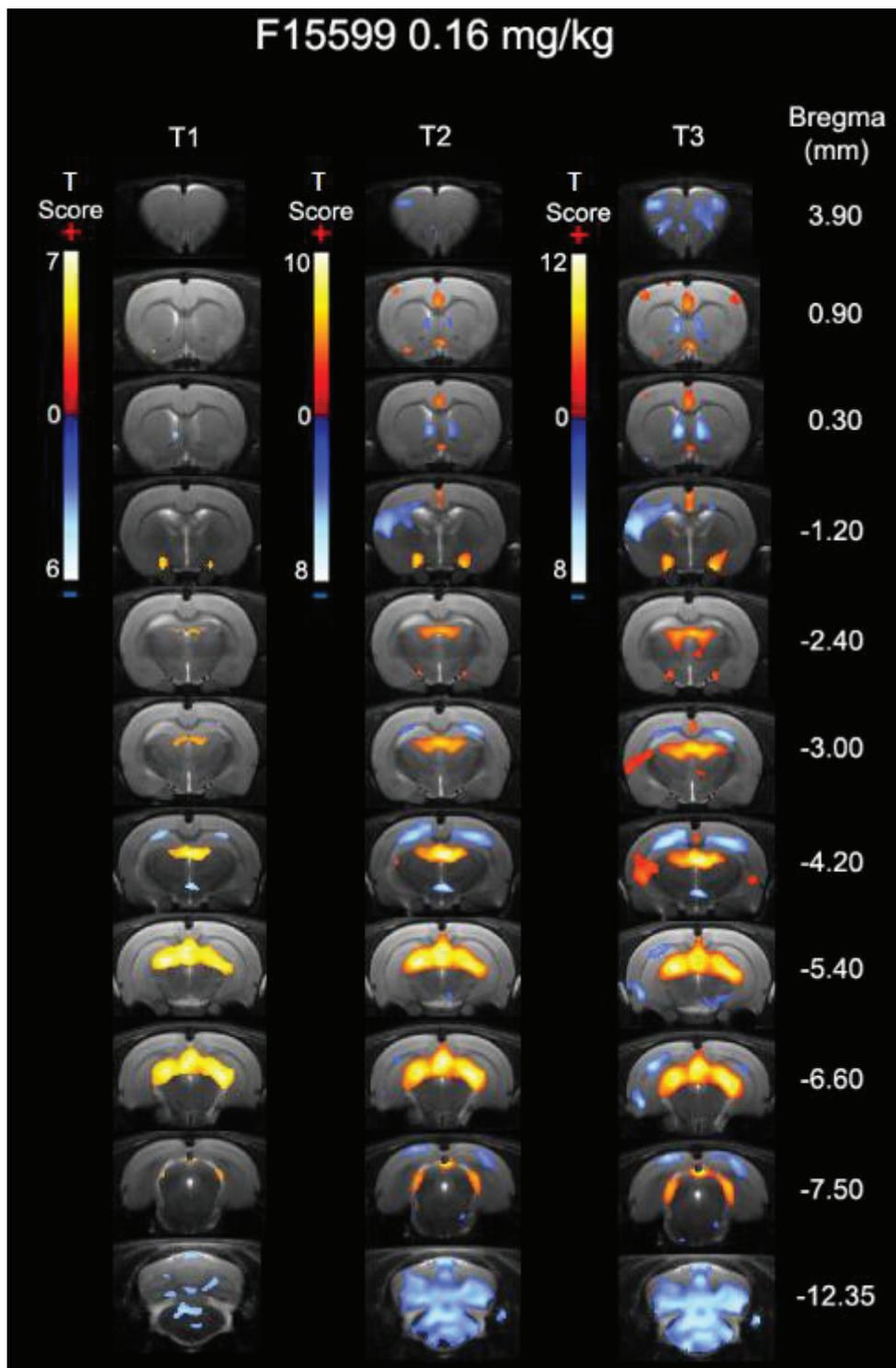


Figure 63 : Cartographie des modifications du signal BOLD induites par le F15599 à 0,16 mg/kg chez le rat, sur trois périodes successives de 15 minutes après injection (T1 à T3). Les voxels significativement activés apparaissent en rouge, les voxels inhibés en bleu ($p < 0.001$).

Comme pour la dose précédente, on retrouve une inhibition significative dans une partie du tronc et du cervelet à partir de T1, qui s'étend ensuite et devient maximale entre T2 et T3. On peut noter que l'intensité de l'effet est comparable à la dose de 0,16 mg/kg dans cette région (T scores compris entre 4 et 7 à T3). A partir de T1 on observe aussi quelques voxels inactivés au niveau du cortex orbital, du cortex somatosensoriel (bregma -3.00) et en bordure de l'hippocampe dorsal (bregma -4.20). A partir de T2 le signal devient beaucoup plus étendu et intense au niveau du cortex somatosensoriel et descend jusqu'à l'amygdale à T3 (bregma -2.40 mm), tandis que l'inactivation reste plus faible dans le cortex orbital. On constate également que le septum latéral est fortement inactivé dès T1 (T scores entre 5 et 6 à T1, et 5 et 7 à T2 et T3). A partir de T2, le signal BOLD est significativement diminué dans l'ensemble du raphé, le cortex visuel et le cortex entorhinal, mais d'une façon moindre comparé à d'autres régions (T scores entre 4 et 5). A T2 et T3 les régions les plus inhibées sont donc le septum latéral, le cortex somatosensoriel (au niveau -4.20 mm par rapport au bregma), le tronc cérébral et le cervelet (bregma -12.35 mm).

Comme aux doses précédentes, le F15599 à 0,63 mg/kg induit une activation importante au niveau du thalamus dorsal, de l'habenula, du cortex rétrosplénial et des colliculi. Cette activation est légèrement plus significative qu'aux doses inférieures. Le cortex cingulaire présente une activation dès T1, qui augmente progressivement jusqu'à T3 de manière importante (T score jusqu'à 15 à T3). Comme précédemment, les noyaux magnocellulaires sont activés. On note aussi une activation du cortex insulaire apparaissant dès T1, et qui s'étend au striatum latéral à partir de T2 (+0.90 mm à +0.30 mm). Le bras horizontal de la bande diagonale de Broca, reliant les noyaux magnocellulaires, est activé à partir de T2. La diminution du signal BOLD à T1 est limitée à de petites zones dans le tronc cérébral, le cervelet et le raphé, pour augmenter en intensité et s'étendre à T2 et T3 (T scores de 4 à 9 à T3 dans le raphé comme le tronc cérébral à T3). A T1 on peut voir une diminution en bordure de l'hippocampe dorsal et dans le cortex somatosensoriel (-2.40 mm), qui s'étend à T2 et T3 et apparaît aussi dans le cortex visuel (légèrement plus significative qu'à 0,32 mg/kg). Une inhibition modeste est observée dans le cortex orbital à partir de T2. On peut également remarquer que certaines zones du thalamus présentent des voxels inactivés, avec un maximum à T2. Enfin, le septum latéral ne présente pas d'inhibition significative contrairement aux doses précédentes.

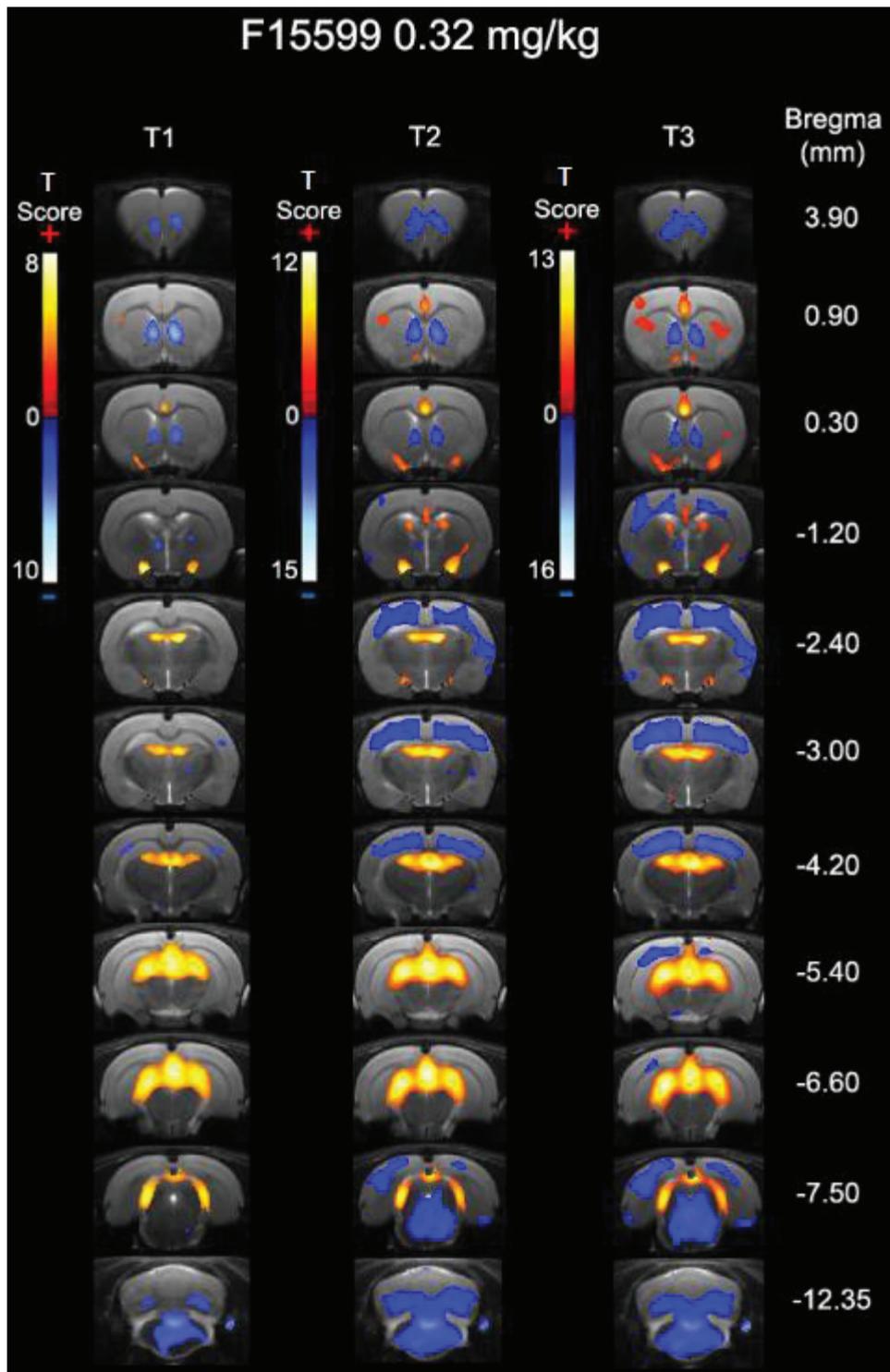


Figure 64 : Cartographie des modifications du signal BOLD induites par le F15599 à 0,32 mg/kg chez le rat, sur trois périodes successives de 15 minutes après injection (T1 à T3). Les voxels significativement activés apparaissent en rouge, les voxels inhibés en bleu ($p < 0.001$).

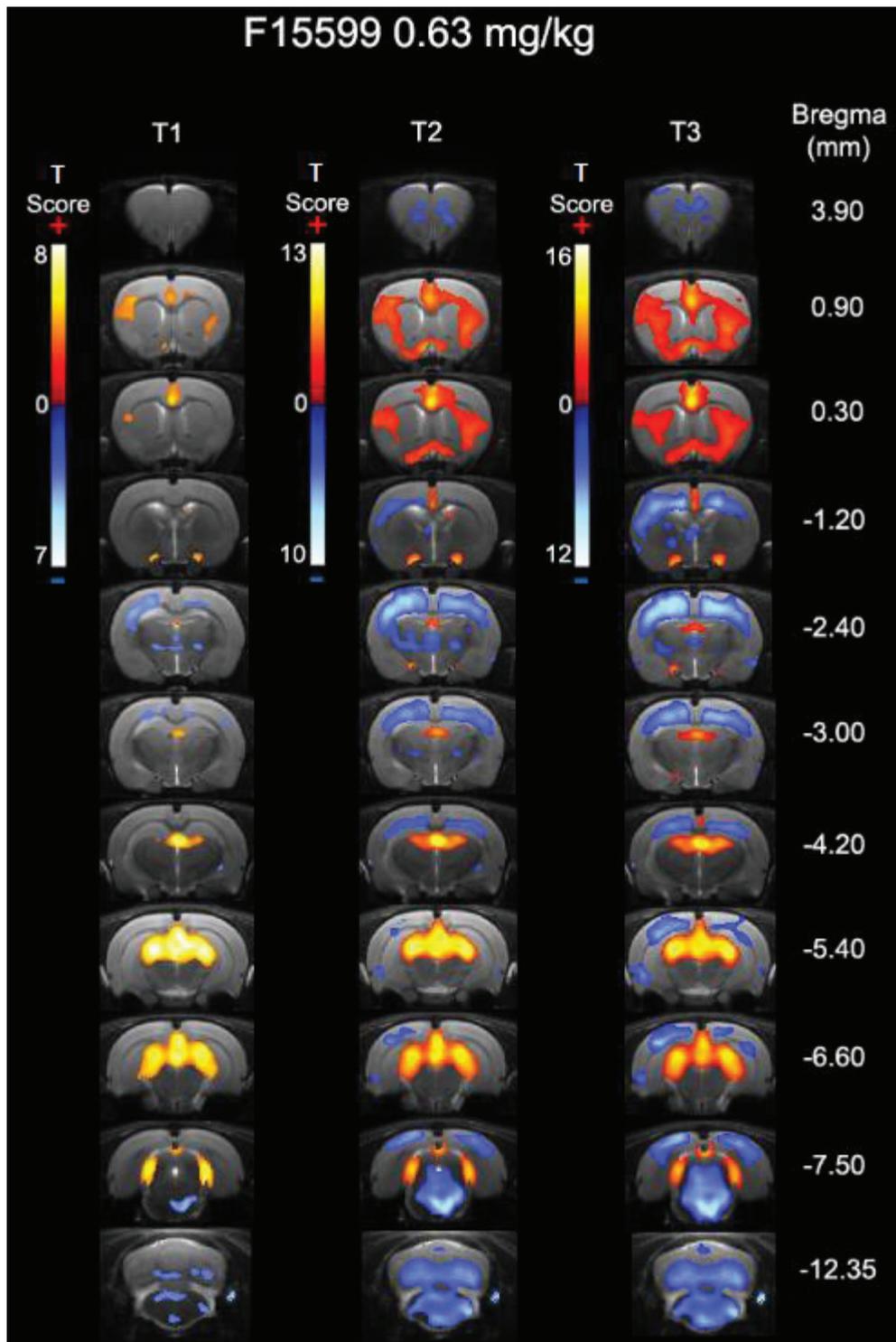


Figure 65 : Cartographie des modifications du signal BOLD induites par le F15599 à 0,63 mg/kg chez le rat, sur trois périodes successives de 15 minutes après injection (T1 à T3). Les voxels significativement activés apparaissent en rouge, les voxels inhibés en bleu ($p < 0.001$).

Tableau 5 : Résumé de la significativité des effets du F13640 et du F15599 de 0,16 mg/kg à 0,63 mg/kg sur le signal BOLD chez le rat (classés en fonction des voxels les plus significatifs dans différentes régions). 0 : Pas ou très peu de voxels significatifs ; + : légère activation (T scores ≤ 6) ; ++ : activation modérée (T scores ≤ 9) ; +++ : forte activation (T scores ≤ 14) ; ++++ : très forte activation (T scores ≥ 15) ; - : légère inhibition (T scores ≤ 5) ; - - : inhibition modérée (T scores ≤ 8) ; - - - : forte inhibition (T scores ≤ 13) ; - - - - : très forte inhibition (T scores ≥ 15).

Molécule	F13640									F15599								
	0,16 mg/kg			0,32 mg/kg			0,63 mg/kg			0,16 mg/kg			0,32 mg/kg			0,63 mg/kg		
Dose	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Régions d'intérêt/Périodes	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Cortex orbital	-	-	--	-	-	--	-	-	-	0	0	-	-	-	-	0	-	-
Cortex cingulaire	+	++	+++	+	++	+++	+	+	++	0	+	+	+	+++	+++	++	+++	++++
Cortex insulaire	0	+	+	+	+	++	0	0	0	0	0	+	0	0	0	+	+	+
Striatum	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	+	+
Noyaux magnocellulaires préoptiques	+	++	++	+	++	++	++	++	+++	+	+	++	++	+++	+++	+	++	+++
Bandelette horizontale de Broca	0	+	+	+	++	++	0	+	++	0	+	+	0	0	0	0	+	+
Septum latéral	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0	-	-	--	--	--	0	0	0
Hippocampe	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--	-	--	--
Cortex somatosensoriel	-	--	--	-	--	--	-	--	--	0	-	-	-	--	--	-	--	--
Amygdale	0	-	-	-	--	--	0	-	-	0	0	0	0	0	-	0	0	-
Hypothalamus	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-	--	-	0	0	-	0	0	0
Habenula	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
Thalamus dorsal	++	+++	++++	+++	++++	++++	+++	++++	++++	+	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
Cortex rétrosplénial	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+	++	++	++	+++	+++	++	+++	+++
Colliculus	++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+	++	++	++	+++	+++	++	+++	+++
Raphé	-	--	---	-	--	--	--	---	---	0	0	0	0	-	-	-	--	---
Cortex visuel	-	-	--	0	--	--	0	--	--	0	-	-	0	-	-	0	-	--
Subiculum	-	--	--	0	--	--	-	--	--	0	-	-	0	-	-	0	-	--
Cortex entorhinal	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	0	-	0	-	-	0	-	-
Tronc cérébral	---	---	---	---	----	----	---	----	----	-	--	--	--	--	--	-	--	---
Cervelet	--	---	---	--	---	---	--	---	---	-	-	--	-	-	-	-	-	--

3.1.2.3 Correction du signal par les cinétiques BOLD dans des régions non spécifiques

Au cours des acquisitions, nous avons enregistré en continu la fréquence respiratoire et la fréquence cardiaque des animaux. Il est important de prendre en compte ces variables pour interpréter des résultats en IRM fonctionnelle car le signal BOLD est influencé par les fluctuations d'activité cardiovasculaire (Jenkins, 2012 ; Mandeville *et al.*, 2014 ; Steward *et al.*, 2005). Cette question est d'autant plus critique dans notre analyse que les agonistes 5-HT_{1A} sont connus pour induire des modifications de la fréquence respiratoire et cardiaque. Dans notre étude, une augmentation de la fréquence respiratoire a été observée presque systématiquement dès les premières minutes après injection du F13640 ou du F15599, quelle que soit la dose. La fréquence respiratoire ne revenait à son niveau basal qu'après une dizaine de minutes. En revanche les modifications de fréquence cardiaque étaient moins évidentes. Compte tenu de ces observations, nous avons utilisé les cinétiques BOLD dans la

matière blanche et les ventricules comme régresseurs de non intérêt dans l'analyse SPM en faisant l'hypothèse que ces régions ne sont impactées que par des variations non spécifiques dues notamment à ces effets périphériques. Cette méthode est susceptible de corriger le signal et de révéler des modifications dans des régions supplémentaires comparé à l'analyse sans ces régresseurs (Mandeville *et al.*, 2014). La figure 66 illustre les différences de résultats de l'analyse SPM avec et sans ces régresseurs de non-intérêt dans notre étude. Cette correction met en évidence davantage d'effets inhibiteurs du F13640 et du F15599 notamment dans l'hippocampe, l'amygdale et le cortex somatosensoriel, avec peu de modifications concernant les patterns d'augmentation du signal.

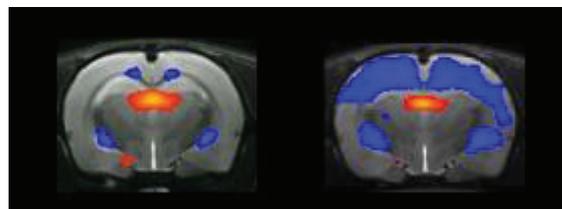


Figure 66 : Cartographie des effets du F13640 (ici à 0,32 mg/kg à T3) en pharmaco-IRM sans (à gauche) et avec (à droite) utilisation des cinétiques BOLD dans la matière blanche et les ventricules comme régresseurs de non intérêt.

3.2 MicroTEP [¹⁸F]FDG chez le rat

De manière complémentaire à la mesure du signal BOLD, il est également possible d'évaluer les modifications d'activité neuronale induites par des agents pharmacologiques en mesurant le métabolisme glucidique à l'aide du [¹⁸F]FDG. Les variations de capture du [¹⁸F]FDG par les neurones en conditions vigiles ont été comparées entre les rats recevant une injection de solution saline ou d'agoniste 5-HT_{1A}. Ces comparaisons ont permis d'établir des cartes d'activation ou d'inhibition suite à l'injection de F13640 ou de F15599, pour chaque dose.

3.2.1 F13640

Les patterns d'activation (en rouge) ou d'inhibition (en bleu) de la consommation de glucose induits par l'injection intrapéritonéale de F13640 chez le rat vigile sont comparables entre les doses (figure 67). On observe une activation diffuse au niveau cortical (cortex moteur, cortex somatosensoriel, cortex auditif, cortex visuel et cortex insulaire). La significativité des voxels activés dans ces régions corticales augmente avec la dose administrée. Une augmentation significative du [¹⁸F]FDG est également localisée dans les parties latérales du thalamus, les colliculi et le cervelet. Le F13640 provoque une diminution significative de la capture de [¹⁸F]FDG au niveau du striatum, du cortex piriforme et du tronc cérébral aux trois doses testées. A partir de 0,32 mg/kg, on observe aussi des voxels significatifs dans le cortex orbital et l'hypothalamus. A partir de 0,63 mg/kg une inhibition apparaît dans l'hippocampe ventral. Une tendance à la diminution du métabolisme glucidique a aussi été observée dans le raphé dorsal, mais non significative au seuil statistique de $p < 0.001$.

3.2.2 F15599

Les patterns d'activation et d'inhibition de la consommation de glucose induits par l'injection intrapéritonéale de F15599 sont comparables entre les doses (figure 68). La partie la plus rostrale du cortex moteur ainsi que les colliculi présentent une augmentation significative de la capture de [¹⁸F]FDG, pour toutes les doses évaluées. Le cortex insulaire apparaît activé à partir de 0,32 mg/kg. On retrouve quelques voxels activés à la plus haute dose dans le cervelet et le thalamus. Quelle que soit la dose on peut remarquer que le pattern d'activation de consommation glucidique du F15599 est beaucoup moins diffus que celui du F13640. Pour les trois doses, la capture de [¹⁸F]FDG est significativement inhibée au niveau du striatum et du cortex piriforme. A partir de 0,32 mg/kg on distingue également une inhibition au niveau du tronc cérébral et en partie latérale du raphé dorsal. Les diminutions de consommation de glucose induites par le F15599 sont beaucoup moins diffuses qu'avec le F13640.

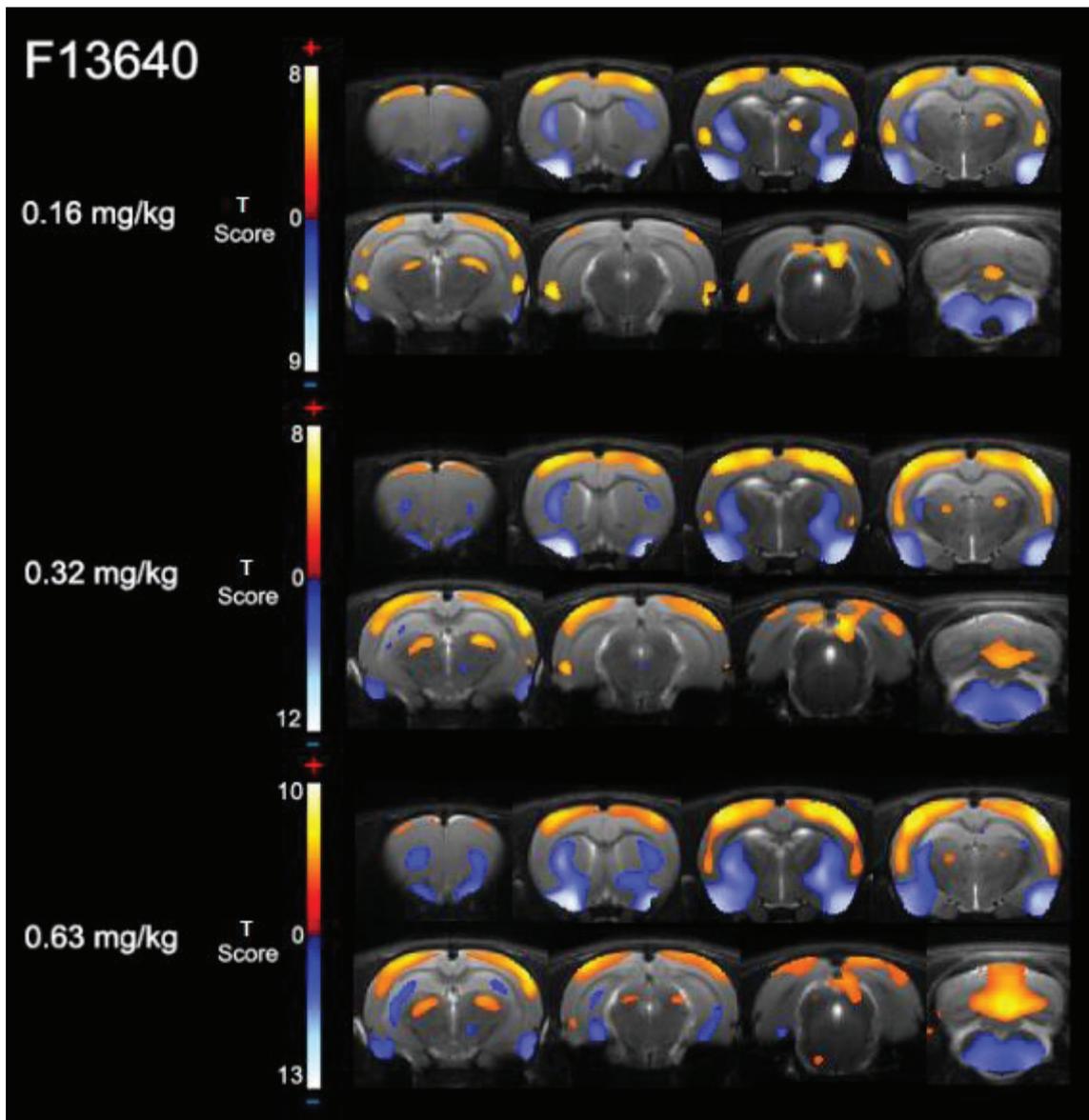


Figure 67 : Cartographie des modifications de captation du [^{18}F]FDG induites par le F13640 chez le rat, de 0,16 mg/kg à 0,63 mg/kg en intrapéritonéal (injection 15 minutes avant l'injection du radiotracteur). Les voxels significativement activés apparaissent en rouge, les voxels inhibés en bleu ($p < 0.001$).

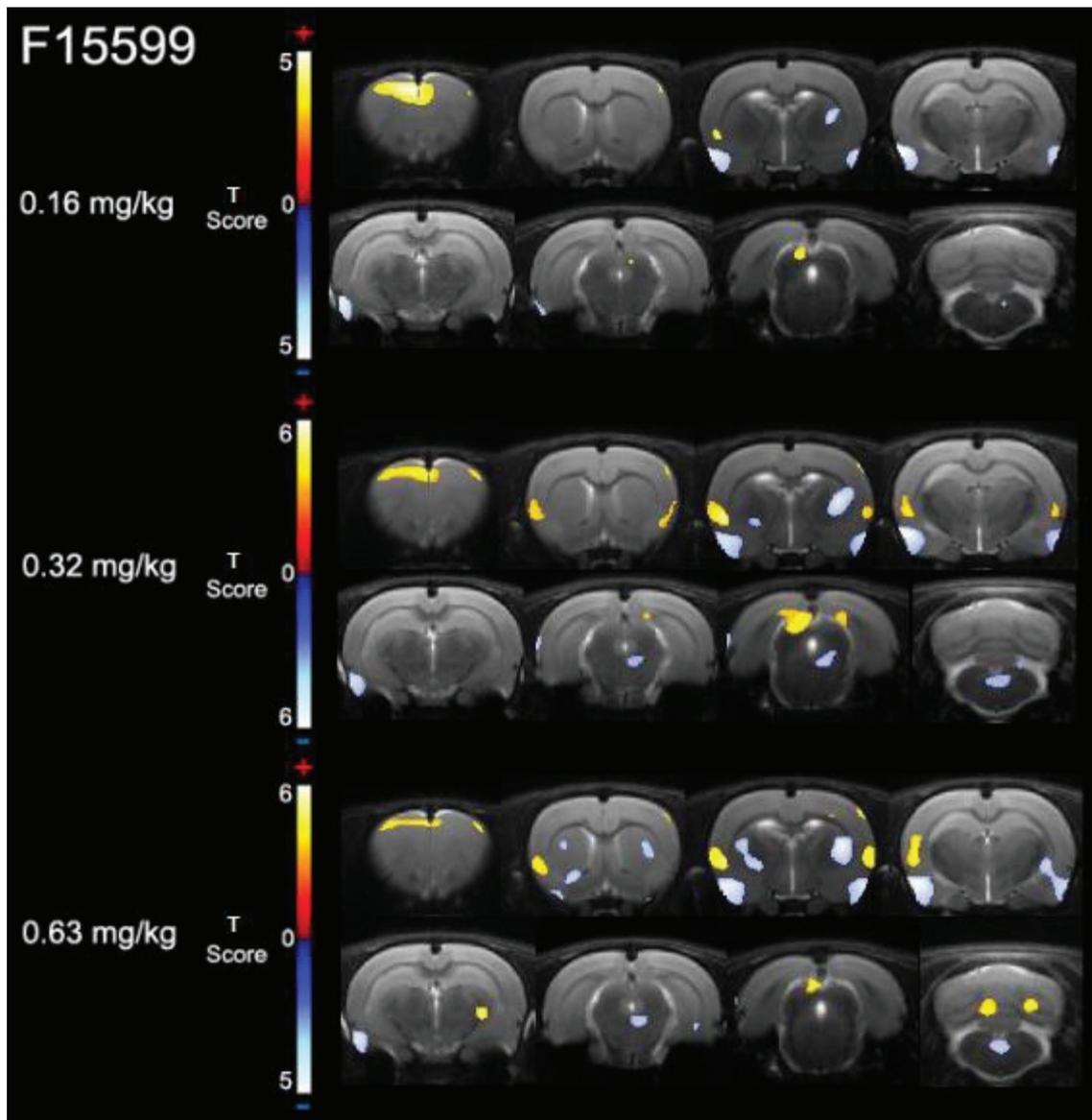


Figure 68 : Cartographie des modifications de captation du [^{18}F]FDG induites par le F13640 chez le rat, de 0,16 mg/kg à 0,63 mg/kg en intrapéritonéal (injection 15 minutes avant l'injection du radiotracteur). Les voxels significativement activés apparaissent en rouge, les voxels inhibés en bleu ($p < 0.001$).

3.3. Etude TEP-IRM chez le chat

3.3.1. Analyse TEP

3.3.1.1 Radiosynthèse du [^{18}F]MPPF

Le [^{18}F]MPPF a été synthétisé selon une procédure précédemment décrite (Le Bars *et al.*, 1998) avec un rendement radiochimique de 25% corrigé de la décroissance. La pureté radiochimique était supérieure à 98%, et l'activité spécifique comprise entre 90 et 260 GBq. μmol^{-1} .

3.3.1.2 Distribution et cinétiques du [^{18}F]MPPF

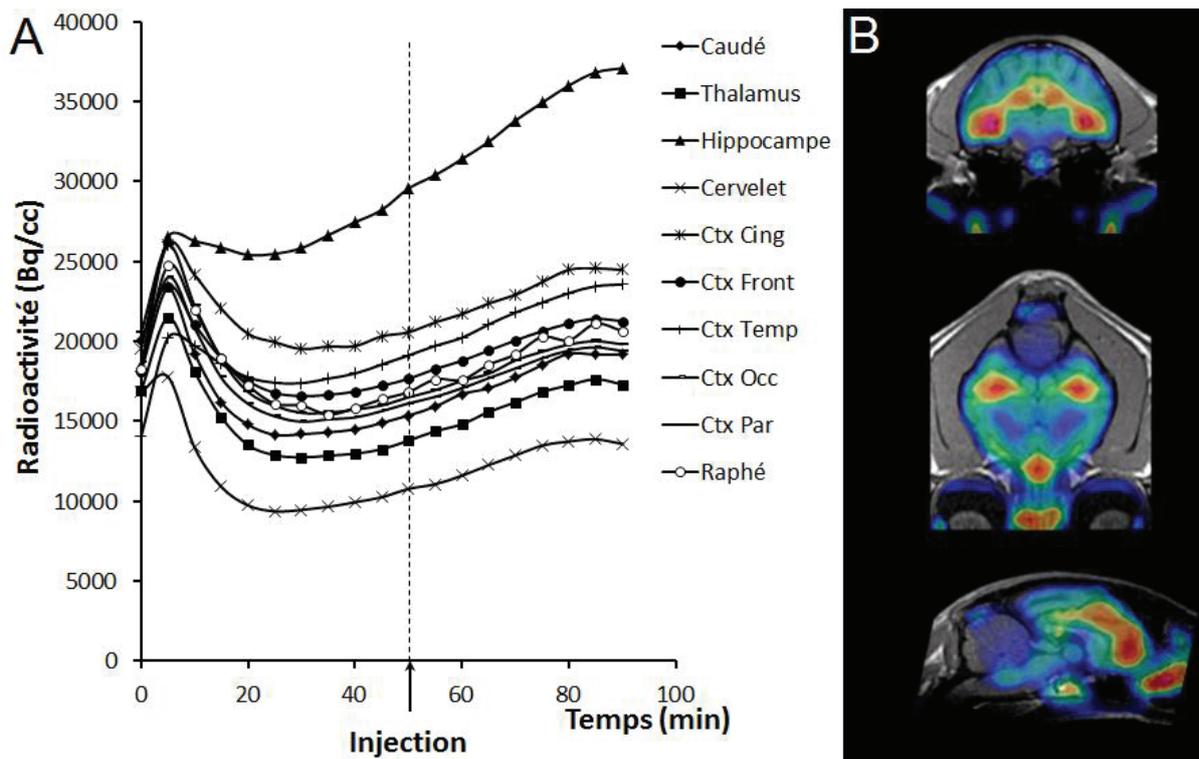


Figure 69 : Cinétiques et distribution cérébrale du [^{18}F]MPPF chez le chat. A – Cinétiques moyennes du [^{18}F]MPPF administré sous forme de bolus/infusion ($n=4$). B – Distribution du [^{18}F]MPPF dans le cerveau du chat (radioactivité moyenne sur toute l'acquisition ; bleu = basse, rouge = élevée).

La distribution du [^{18}F]MPPF dans ce protocole de bolus-infusion est en accord avec de précédentes études chez le chat obtenues en bolus simple (Ginovart *et al.*, 2000 ;

Aznavour *et al.*, 2006a et b), avec une accumulation importante dans l'hippocampe, le cortex cingulaire et le cortex temporal (figure 69). La fixation est modérée dans les autres régions corticales, le raphé dorsal et le reste du tronc cérébral, faible dans le thalamus et le striatum, et très faible dans le cervelet.

Les courbes temps-activité montrent un pic de radioactivité initial dans tout le cerveau après injection bolus, suivi par une élimination rapide du traceur mais rapidement compensée par l'infusion constante. Dans la plupart des acquisitions, les courbes cinétiques n'atteignaient pas un plateau mais l'activité augmentait graduellement jusqu'à atteindre un pseudo-équilibre à partir de 30 minutes après injection, c'est-à-dire que les ratios de fixation déterminés par rapport au cervelet atteignaient des valeurs stables jusqu'à la fin de l'acquisition (pour les acquisitions contrôle) ou jusqu'à injection de l'agent pharmacologique. Dans l'hippocampe en revanche on peut remarquer que ces ratios continuent à augmenter jusqu'à la fin de l'acquisition (de 2,6 à 40 minutes à 2,9 à 90 minutes). Dans les autres régions, ces ratios étaient en moyenne de 2 dans le cortex cingulaire, 1,9 dans le cortex temporal, 1,7 dans le cortex frontal, 1,6 dans le raphé dorsal et le cortex pariétal, 1,5 dans les noyaux caudés et le cortex occipital, et 1,3 dans le thalamus.

3.3.1.3 Occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par le F13640 et le F15599

Afin d'évaluer l'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par le F13640 et le F15599, nous avons utilisé deux approches. La première approche consiste à calculer la diminution de fixation spécifique du [¹⁸F]MPPF dans des régions d'intérêt définies par un atlas du cerveau de chat (Lancelot *et al.*, 2010), afin d'estimer un taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{1A}. La deuxième approche est une analyse par voxels sur SPM permettant de cartographier les zones où la compétition entre [¹⁸F]MPPF et les agonistes est la plus significative, sans *a priori* sur les régions.

Analyse par régions d'intérêt :

Au cours de cette analyse, nous avons normalisé pour chaque acquisition la radioactivité dans les différentes régions d'intérêt par rapport à la radioactivité présente dans le cervelet afin d'obtenir des cinétiques normalisées reflétant la fixation spécifique du [¹⁸F]MPPF. Pour définir le moment à partir duquel la compétition était significative pour le

calcul du taux d'occupation, ces cinétiques ont été centrées sur zéro par rapport à une ligne de base définie entre 40 minutes et 50 minutes, correspondant au moment d'injection de l'agoniste (voir figure 70).

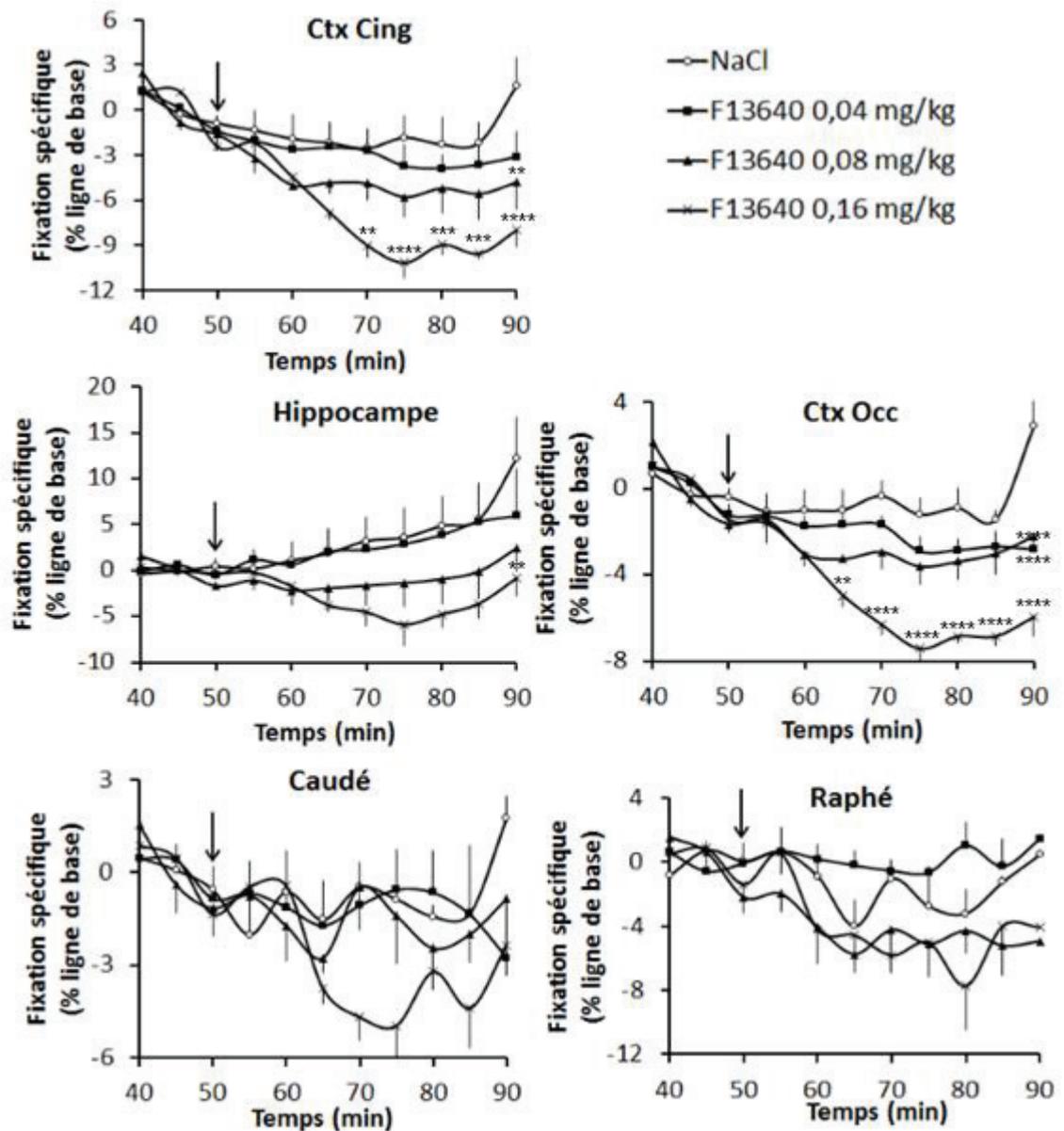


Figure 70 : Cinétiques du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ en présence de doses croissantes de F13640 dans différentes régions d'intérêt, normalisées par rapport au signal dans le cervelet. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fixation spécifique par rapport à la ligne de base comprise entre 40 et 50 minutes ($n=4$, \pm écart-type). ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$ (test post-hoc de Bonferroni par rapport à l'injection de NaCl 0,9%).

Pour le F13640, on observe une diminution de la fixation spécifique du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ de manière dose-dépendante dans les régions corticales (figure 70), avec une tendance visible

dès 0,04 mg/kg, un effet plus marqué à 0,08 mg/kg et un effet maximal à 0,16 mg/kg. Dans des régions plus pauvres en récepteurs comme le caudé, la compétition n'est visible sur les courbes qu'à 0,16 mg/kg. Dans le raphé, les résultats sont moins clairs avec des cinétiques superposées entre 0,08 mg/kg et 0,16 mg/kg, et une très légère tendance à l'augmentation de la fixation du [¹⁸F]MPPF à la dose de 0,04 mg/kg.

En termes statistiques, les effets du F13640 sont particulièrement significatifs au niveau de régions corticales comme le cortex cingulaire (ANOVA à deux facteurs ; traitement, $F(3,132) = 30.84$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 17.60$, $p < 0.0001$; interaction, $F(30,132) = 2.40$, $p = 0.0004$) et le cortex frontal (traitement, $F(3,132) = 42.86$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 26.44$, $p < 0.0001$; interaction, $F(30,132) = 3.75$, $p < 0.0001$), mais de manière encore plus prononcée dans des zones du cortex connues pour être moins denses en récepteurs 5-HT_{1A} comme le cortex pariétal (traitement, $F(3,132) = 47.79$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 35.43$, $p < 0.0001$; interaction, $F(30,132) = 4.00$, $p < 0.0001$) et le cortex occipital (traitement, $F(3,132) = 55.67$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 22.75$, $p < 0.0001$; interaction, $F(30,132) = 4.63$, $p < 0.0001$). L'effet du F13640 est aussi significatif dans le cortex temporal (traitement, $F(3,132) = 19.10$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 2.87$, $p = 0.0029$; interaction, $F(30,132) = 1.55$, $p = 0.049$), l'hippocampe (traitement, $F(3,132) = 13.89$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 2.18$, $p = 0.023$; interaction, $F(30,132) = 1.06$, $p = 0.3954$) et le raphé malgré des cinétiques plus bruitées (traitement, $F(3,132) = 13.61$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 4.52$, $p < 0.0001$; interaction, $F(30,132) = 1.10$, $p = 0.3484$). Enfin, l'effet du F13640 est moins marqué mais significatif dans les régions plus pauvres en récepteurs comme le caudé (traitement, $F(3,132) = 5.39$, $p = 0.0016$; temps, $F(10,132) = 4.05$, $p < 0.0001$; interaction, $F(30,132) = 1.28$, $p = 0.17$) et le thalamus (traitement, $F(3,132) = 4.15$, $p = 0.0076$; temps, $F(10,132) = 3.20$, $p = 0.001$; interaction, $F(30,132) = 0.98$, $p = 0.4999$). Dans les régions corticales, les tests post-hoc de Bonferroni montrent un effet significatif du F13640 comparé au sérum physiologique uniquement à 90 minutes pour les doses de 0,04 mg/kg et 0,08 mg/kg, et à partir de 65 minutes pour la dose de 0,16 mg/kg.

Le F15599 produit également un effet sur les cinétiques du [¹⁸F]MPPF mais pas proportionnellement à la dose tel qu'avec le F13640 (figure 71). Au niveau des régions corticales et de l'hippocampe, pour la dose de 0,04 mg/kg on observe une tendance à l'augmentation de la fixation du traceur comparé à la condition contrôle, tandis que les

cinétiques à la dose de 0,08 mg/kg sont proches de celles de la condition contrôle. Une diminution plus nette de la fixation du [¹⁸F]MPPF est visible à partir de 0,16 mg/kg dans ces régions ainsi qu'au niveau du raphé, du caudé et du thalamus.

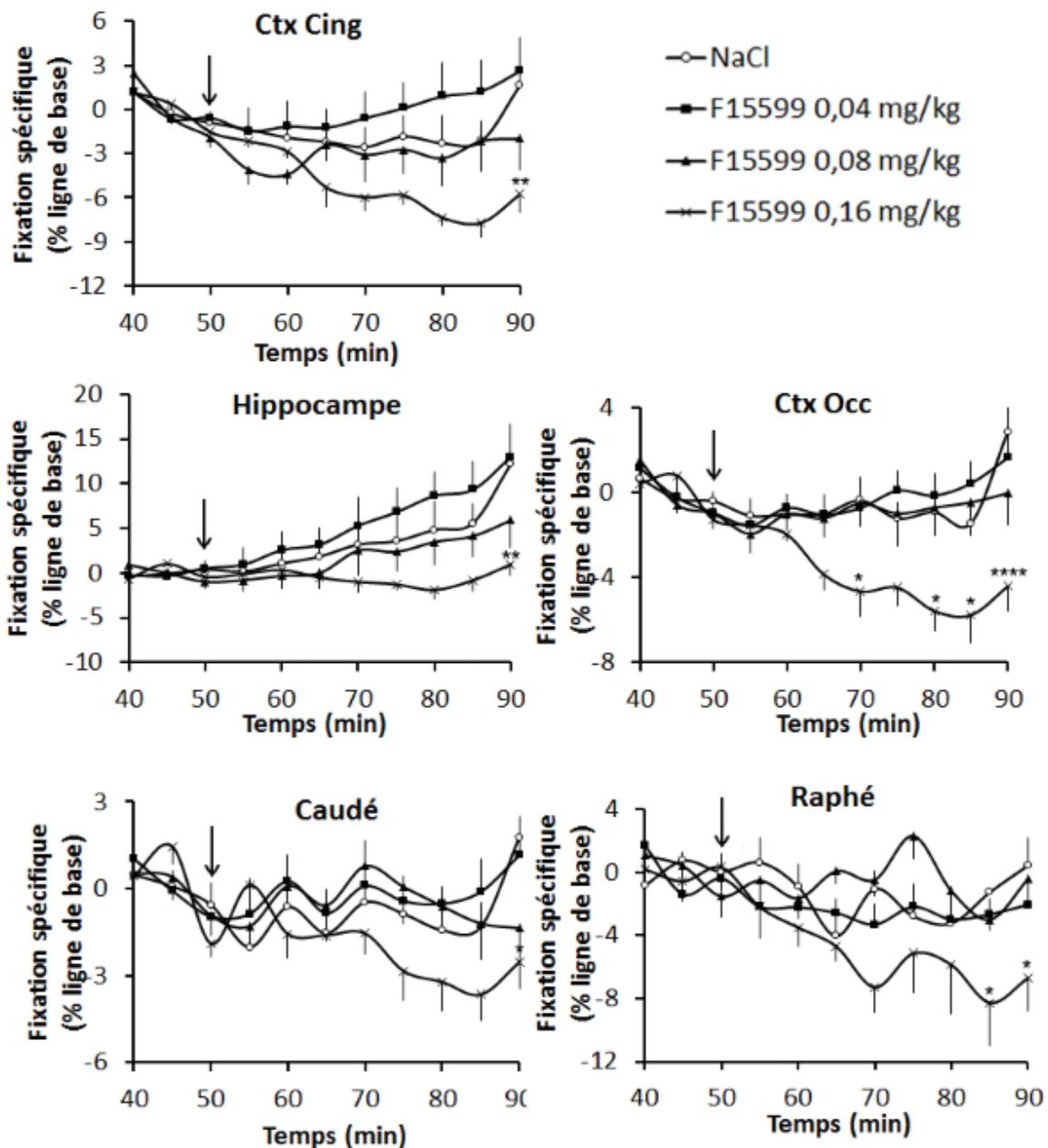


Figure 71 : Cinétiques du [¹⁸F]MPPF en présence de doses croissantes de F15599 dans différentes régions d'intérêt, normalisées par rapport au signal dans le cervelet. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fixation spécifique par rapport à la ligne de base comprise entre 40 et 50 minutes (n=4, ± écart-type). *p<0.05 ; **p<0.01 ; ****p<0.0001 (test post-hoc de Bonferroni par rapport à l'injection de NaCl 0,9%).

Les analyses statistiques par ANOVA à deux facteurs montrent un effet significatif du F15599 dans toutes les régions (moins marqué que le F13640), particulièrement dans le cortex pariétal (traitement, $F(3,132) = 45.94$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 14.50$, $p < 0.0001$; interaction, $F(30,132) = 3.56$, $p < 0.0001$), le cortex frontal (traitement, $F(3,132) = 30.97$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 5.95$, $p < 0.0001$; interaction, $F(30,132) = 2.62$, $p < 0.0001$), le cortex occipital (traitement, $F(3,132) = 21.28$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 4.09$, $p < 0.0001$; interaction, $F(30,132) = 2.03$, $p = 0.0035$) et le cortex cingulaire (traitement, $F(3,132) = 17.26$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 4.64$, $p < 0.0001$; interaction, $F(30,132) = 1.56$, $p = 0.0469$). Le F15599 modifie également de manière significative les cinétiques de fixation dans le cortex temporal (traitement, $F(3,132) = 13.41$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 2.88$, $p = 0.0028$; interaction, $F(30,132) = 1.23$, $p = 0.2138$), le raphé dorsal (traitement, $F(3,132) = 13.14$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 3.99$, $p < 0.001$; interaction, $F(30,132) = 1.39$, $p = 0.1084$) et l'hippocampe (traitement, $F(3,132) = 11.98$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 6.47$, $p < 0.0001$; interaction, $F(30,132) = 1.13$, $p = 0.3103$). L'effet est significatif dans le thalamus (traitement, $F(3,132) = 8.58$, $p < 0.0001$; temps, $F(10,132) = 2.08$, $p = 0.0307$; interaction, $F(30,132) = 1.07$, $p = 0.3811$) et le caudé, bien que plus réduit (traitement, $F(3,132) = 5.69$, $p = 0.0011$; temps, $F(10,132) = 2.93$, $p = 0.0024$; interaction, $F(30,132) = 1.22$, $p = 0.2190$). Dans les régions où l'effet est le plus marqué (cortex pariétal, cortex occipital et cortex frontal), les tests post-hoc de Bonferroni pour comparaison au sérum physiologique montrent un effet significatif du F15599 à partir de 65 minutes à 70 minutes pour la dose de 0,16 mg/kg, et non significatif aux doses de 0,08 mg/kg et 0,04 mg/kg.

Sur la base de ces cinétiques de fixation spécifique, nous avons comparé la période post-injection de 60 à 90 minutes par rapport à la ligne de base de 40 à 50 minutes pour calculer le taux d'occupation des différentes doses d'agonistes au niveau des récepteurs 5-HT_{1A} (figures 72 à 74). Comme le montrent les cinétiques précédentes, dans l'hippocampe la fixation spécifique continue d'augmenter par rapport à la ligne de base en conditions contrôle, c'est pourquoi les valeurs présentées ici correspondent à une différence $\Delta_{\text{Occupation}} = \text{Taux d'occupation}_{(\text{Agoniste})} - \text{Taux d'occupation}_{(\text{NaCl})}$, afin de prendre en compte les variations de fixation survenant en conditions contrôle.

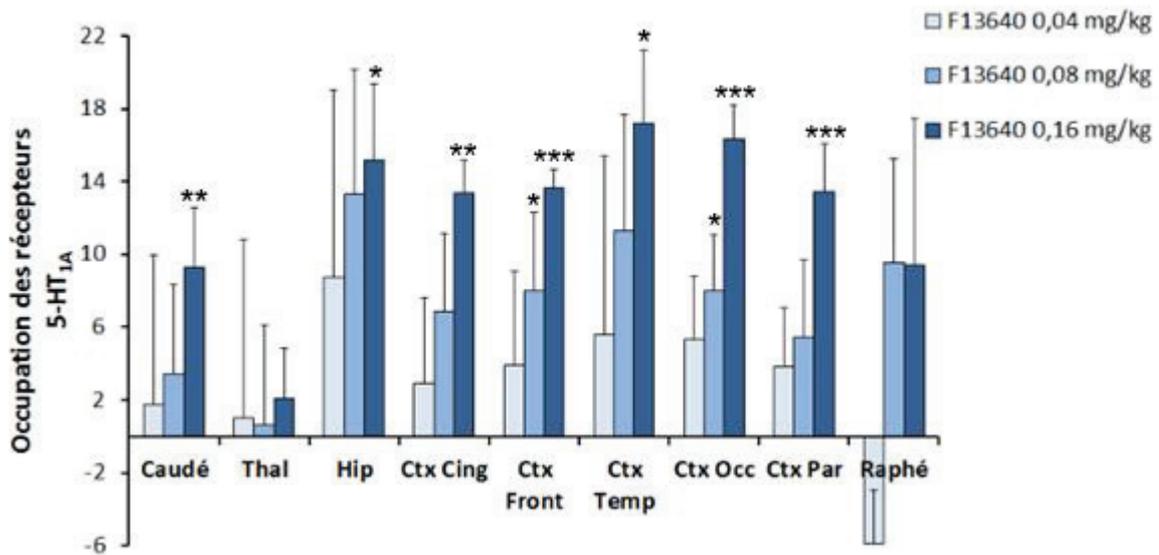


Figure 72 : Estimation du taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par le F13640 à doses croissantes chez le chat, dans différentes régions d'intérêt. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'occupation, et correspondent à une diminution de fixation spécifique après injection en comparaison avec la ligne de base (n=4, ± écart-type). *p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001 (test t de Student comparé à l'injection de NaCl à 0,9%).

A une dose de 0,04 mg/kg, l'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par le F13640 n'est significative dans aucune des régions d'intérêt (test t de Student) et se situe entre 4 et 5 % dans les régions corticales et 8% dans l'hippocampe. On peut aussi remarquer une tendance non significative à l'augmentation de la fixation spécifique dans le raphé dorsal se traduisant par un taux d'occupation « négatif », probablement dû à la difficulté de quantifier la radioactivité précisément dans cette région de volume restreint. A la dose intermédiaire, l'occupation des récepteurs est significative dans le cortex frontal et le cortex occipital (environ 8%), et proche du seuil significatif dans l'hippocampe, le raphé dorsal et le cortex pariétal (p=0.0666, p=0.0695 et p=0.0606, respectivement, et varie de 5 à 13%). Enfin, une dose de 0,16 mg/kg de F13640 occupe de manière significative les récepteurs dans toutes les régions, excepté le thalamus et le raphé dorsal, avec un taux d'occupation variant de 9% (noyaux caudés) à 17% (cortex temporal). Plus globalement, l'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par le F13640 semble proportionnelle à la dose dans la plupart des régions mis à part le thalamus et le raphé dorsal.

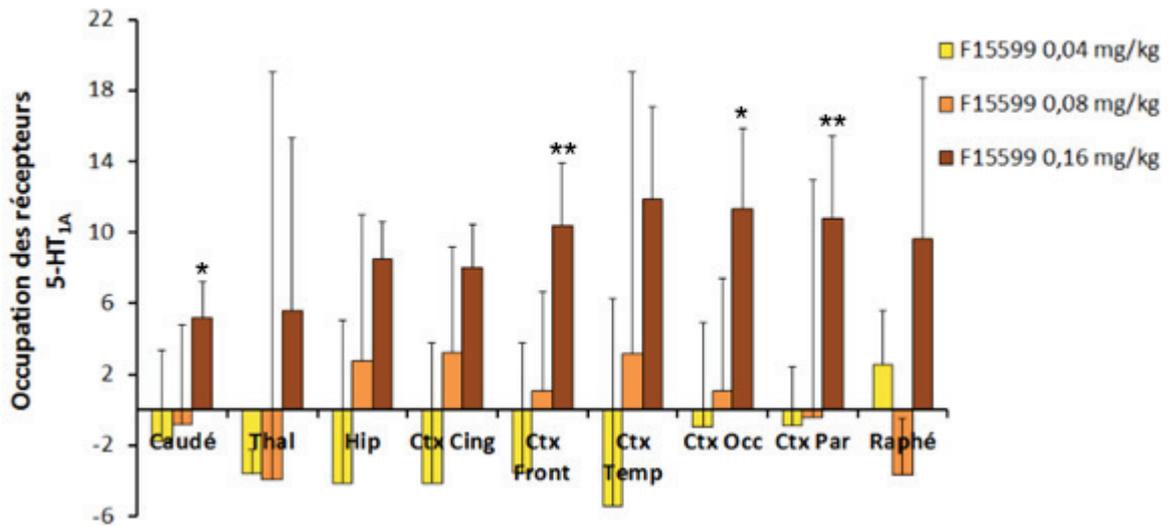


Figure 73 : Estimation du taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par le F15599 à doses croissantes chez le chat, dans différentes régions d'intérêt. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'occupation, et correspondent à une diminution de fixation spécifique après injection en comparaison avec la ligne de base (n=4, ± écart-type). *p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001 (test t de Student comparé à l'injection de NaCl à 0,9%).

Pour le F15599, l'injection d'une dose de 0,04 mg/kg s'accompagne d'une tendance à l'augmentation de fixation spécifique du [¹⁸F]MPPF. C'est pourquoi les taux d'occupation sont « négatifs » dans la plupart des régions d'intérêt à cette dose, mais pas statistiquement différents de zéro (test t de Student). A la dose de 0,08 mg/kg, les taux d'occupation sont légèrement plus élevés mais proches de zéro (valeur d'occupation maximale d'environ 3% dans le cortex cingulaire). A la dose de 0,16 mg/kg, l'occupation des récepteurs par le F15599 est significative au niveau des noyaux caudés, du cortex frontal, du cortex occipital et du cortex pariétal, et proche du seuil significatif dans le cortex cingulaire et le cortex temporal (p=0.0545 et p=0.0852, respectivement). Le taux d'occupation varie entre 5% (noyaux caudés) et 11% (cortex occipital). Contrairement au F13640, on remarque un effet « seuil » dans certaines régions comme le cortex occipital, avec un taux d'occupation qui varie de 1% à 11% en doublant la dose de F15599.

Ces mêmes données présentées sous forme de radars suggèrent que le F13640 et le F15599 présentent des profils de distribution bien différents entre les doses, c'est-à-dire que l'occupation ne varie pas de manière comparable dans les différentes régions en fonction de

la dose. On constate également que les patterns de distribution du F13640 et du F15599 sont moins différents à la dose de 0,16 mg/kg qu'aux doses inférieures, malgré un taux d'occupation globalement plus faible pour le F15599 que pour le F13640. Il faut cependant préciser que cette présentation des données se veut descriptive en termes de répartition spatiale des agonistes, et ne prend pas en compte la variance du taux d'occupation.

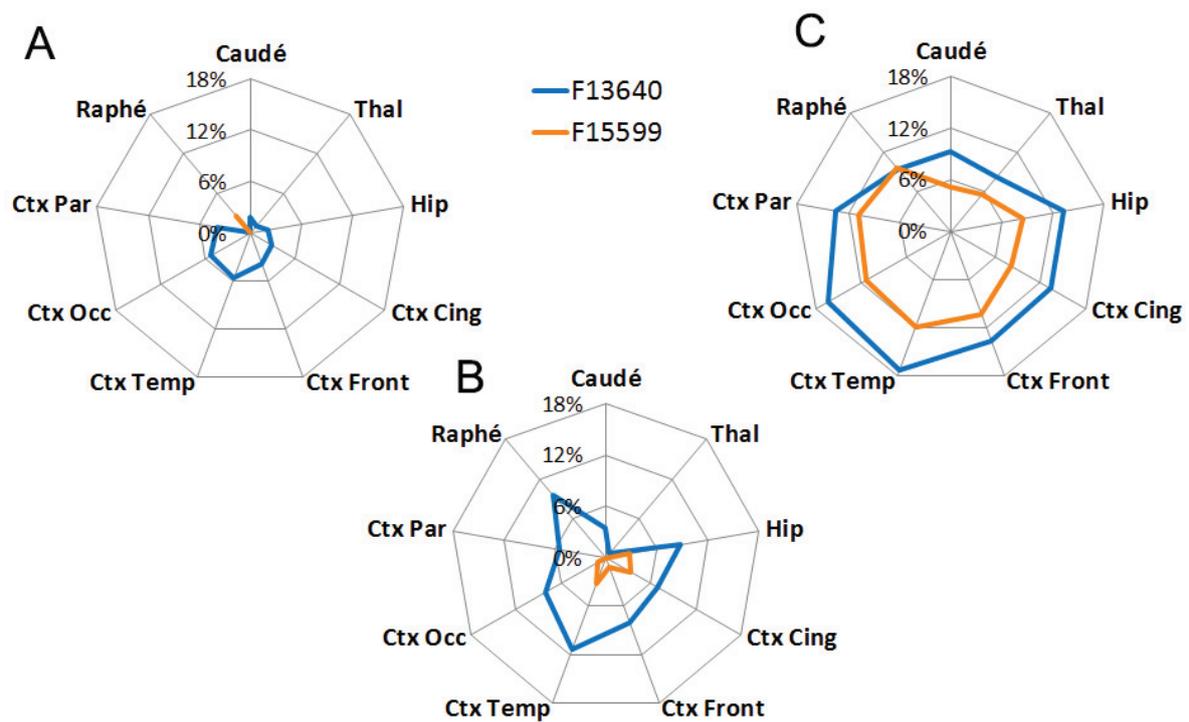


Figure 74 : Profils d'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} dans les différentes régions d'intérêt par le F15599 et le F13640 à doses croissantes chez le chat. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'occupation, et correspondent à une diminution de fixation spécifique après injection en comparaison avec la ligne de base (n=4). A - Doses de 0,04 mg/kg ; B - Doses de 0,08 mg/kg ; C - Doses de 0,16 mg/kg.

Analyses voxel à voxel

L'analyse par voxels permet de cartographier l'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par le F13640 et le F15599 sans *a priori* sur des régions d'intérêt, en complément de l'analyse précédente. Dans cette approche, pour chaque acquisition nous avons généré des images moyennées et normalisées par rapport au signal dans le cervelet, afin de permettre la comparaison entre les scans. Pour chaque condition (NaCl et les 3 doses de chaque agoniste), les images correspondant à la période post-injection entre 60 et 90 minutes ont été comparées aux images des mêmes acquisitions correspondant à la ligne de base entre 40

et 50 minutes grâce à un test t de Student de contraste [Image(Ligne de base) – Image(Post-injection)] afin de cartographier les voxels où la fixation spécifique du [¹⁸F]MPPF est significativement plus faible après injection de l'agent pharmacologique. Le seuil statistique est fixé à p<0.01 pour chaque voxel.

Tout d'abord, l'analyse SPM ne montre aucun voxel significatif pour la condition NaCl, signifiant que dans les acquisitions contrôle la fixation spécifique du [¹⁸F]MPPF n'est pas significativement réduite pendant la période de 60 minutes à 90 minutes comparée à la période de 40 à 50 minutes (figure 75). Cette condition doit être vérifiée avant d'interpréter les résultats obtenus avec les agonistes F13640 et F15599.

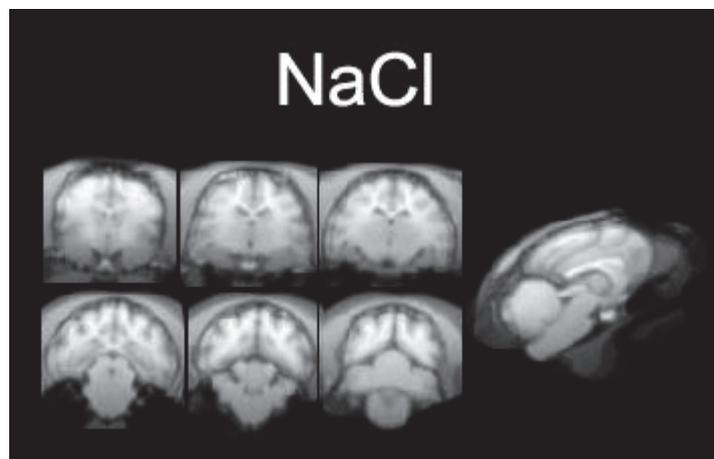


Figure 75 : Comparaison statistique entre images ratios du [¹⁸F]MPPF acquises entre 60 et 90 minutes et images ratios acquises entre 40 et 50 minutes dans le groupe contrôle ayant reçu une injection de NaCl à 0,9% (n=4). Aucun voxel significatif n'est présent à p<0.01, signifiant que la fixation du [¹⁸F]MPPF ne diminue pas au cours de l'acquisition.

Dès la faible dose de 0,04 mg/kg de F13640, une diminution significative de la fixation du [¹⁸F]MPPF est observée dans certains voxels comparé à la période avant injection. Les voxels significatifs se situent majoritairement dans le cortex cingulaire antérieur et postérieur, ainsi qu'au niveau du cortex insulaire et du cortex entorhinal. Quelques voxels sont aussi localisés dans le cortex occipital.

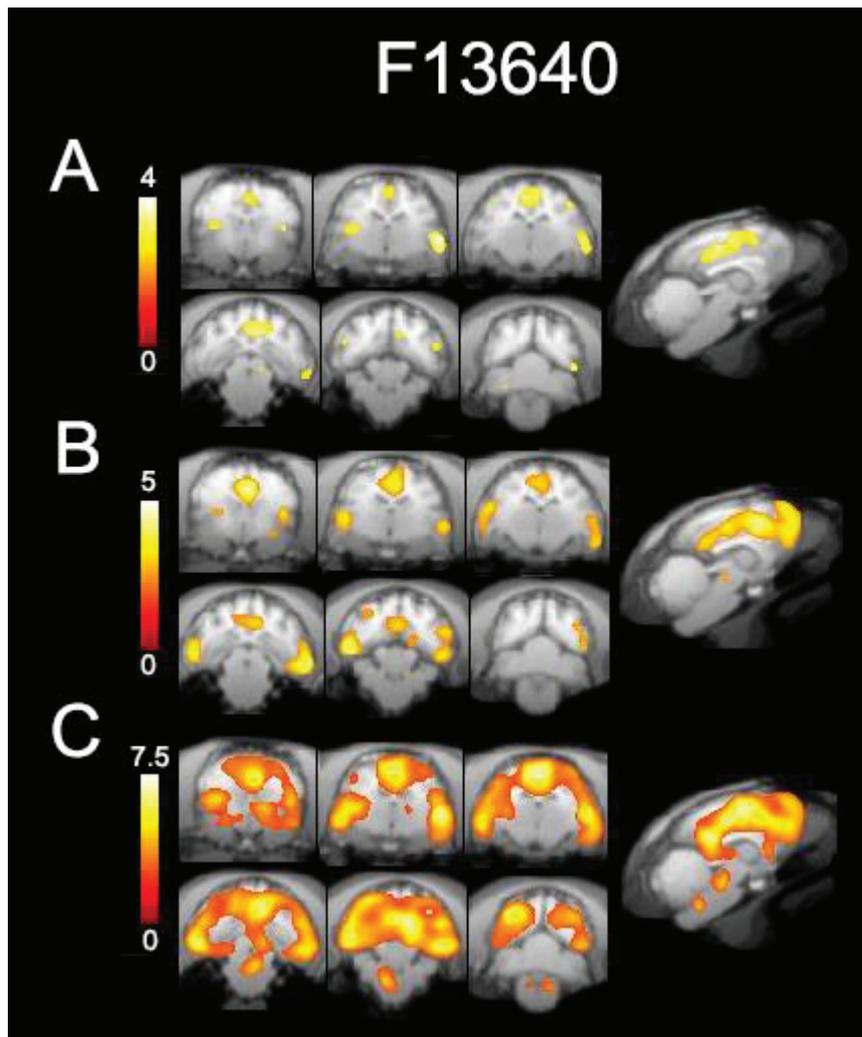


Figure 76 : Cartographie de la distribution du F13640 à 0,04 mg/kg (A), 0,08 mg/kg (B) et 0,16 mg/kg (C) dans le cerveau du chat, établie par mesure de la diminution significative de la fixation du [¹⁸F]MPPF après injection de l'agoniste par rapport à la ligne de base (n=4, p<0.01).

A la dose intermédiaire de 0,08 mg/kg de F13640, une compétition significative avec le [¹⁸F]MPPF a lieu dans tout le cortex cingulaire, ainsi qu'au niveau du cortex insulaire, entorhinal et occipital. Le pattern dans ces régions est plus diffus et plus significatif qu'à la dose précédente. On voit également apparaître une occupation significative au niveau du cortex frontal. Quelques voxels significatifs sont décelés au niveau du raphé dorsal (voir coupe sagittale de la figure 76B). La dose de 0,16 mg/kg entraîne une occupation très significative des sites de fixation du traceur dans tout le cortex, surtout le cortex cingulaire, entorhinal, occipital et insulaire comme précédemment. Des voxels apparaissent en avant du cerveau au niveau de l'amygdale, du septum latéral et d'une partie du striatum, et en

arrière au niveau des colliculi. Des clusters significatifs apparaissent clairement au niveau du raphé dorsal et du raphé obscurus (voir coupe sagittale de la figure 76C).

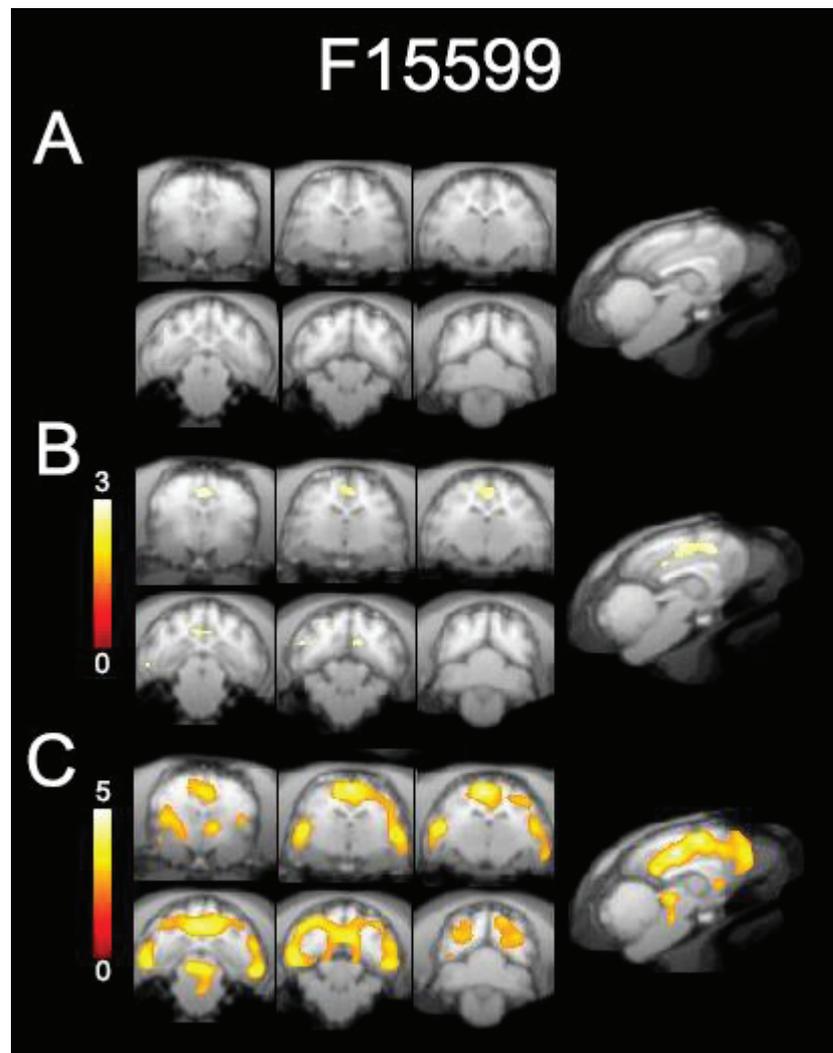


Figure 77 : Cartographie de la distribution du F15599 à 0,04 mg/kg (A), 0,08 mg/kg (B) et 0,16 mg/kg (C) dans le cerveau du chat, établie par mesure de la diminution significative de la fixation du [¹⁸F]MPPF après injection de l'agoniste par rapport à la ligne de base (n=4, p<0.01).

Concernant le F15599, aucun voxel significatif n'est observé à la dose de 0,04 mg/kg, similairement à l'injection de sérum physiologique (figure 77). A 0,08 mg/kg, on décèle une faible occupation spécifiquement localisée au niveau du cortex cingulaire. A 0,16 mg/kg, le F15599 occupe de manière significative et diffuse les sites de fixation du [¹⁸F]MPPF principalement au niveau cortex frontal, du cortex cingulaire, du cortex insulaire et du cortex occipital. On peut remarquer que la fixation du F15599 dans ces régions est moins significative et moins diffuse que le F13640 à la même dose. Enfin, quelques voxels sont

significativement occupés au niveau du septum latéral, des colliculi et du raphé dorsal (que l'on distingue toutefois beaucoup moins qu'avec le F13640 à doses comparables).

3.3.2. Analyse pharmaco-IRM

En parallèle aux mesures relatives aux taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} en TEP, nous avons mesuré les variations hémodynamiques induites par le F13640 et le F15599. Similairement à l'étude chez le rat, nous avons réalisé sur SPM des cartes d'activation ou d'inhibition du signal BOLD en réalisant des contrastes de premier niveau intra-acquisition pour comparer le signal avant (30 à 50 minutes) et après injection (50 à 70 minutes), puis des contrastes de second niveau pour comparer les modifications dans chaque condition par rapport à la condition contrôle.

3.3.2.1 Cartes d'activation

F13640 :

A faible dose, le F13640 semble avoir principalement des effets inhibiteurs sur le signal BOLD. Les voxels inactivés apparaissent de manière disparate, au niveau du cortex cingulaire postérieur, de l'amygdale, dans le cortex temporal en périphérie de l'hippocampe et dans le cortex occipital. Quelques voxels activés sont visualisés ponctuellement au niveau du cortex frontal et du cervelet.

A la dose de 0,08 mg/kg, les voxels présentant une diminution du signal BOLD sont localisés au niveau de l'amygdale, de l'hippocampe ventral et de l'hypothalamus, et absents des régions corticales. Similairement à la dose précédente, des voxels activés sont situés dans le cortex frontal (voir coupe sagittale de la figure 78B) et dans le cervelet. On voit également apparaître une augmentation du signal BOLD au niveau du raphé dorsal et du raphé obscurus.

A la dose de 0,16 mg/kg le F13640 induit des changements plus diffus, avec une inhibition principalement au niveau du cortex cingulaire, du cortex temporal, du cortex insulaire, de l'amygdale et du cortex occipital. L'hippocampe, le caudé, le thalamus et l'hypothalamus contiennent aussi quelques voxels significativement inactivés. Le signal BOLD est significativement augmenté au niveau cortex frontal de manière plus étendue qu'aux

doses précédentes, ainsi qu'au niveau du raphé dorsal et dans le cervelet. On observe des activations unilatérales sur les coupes coronales dans le cortex temporal droit.

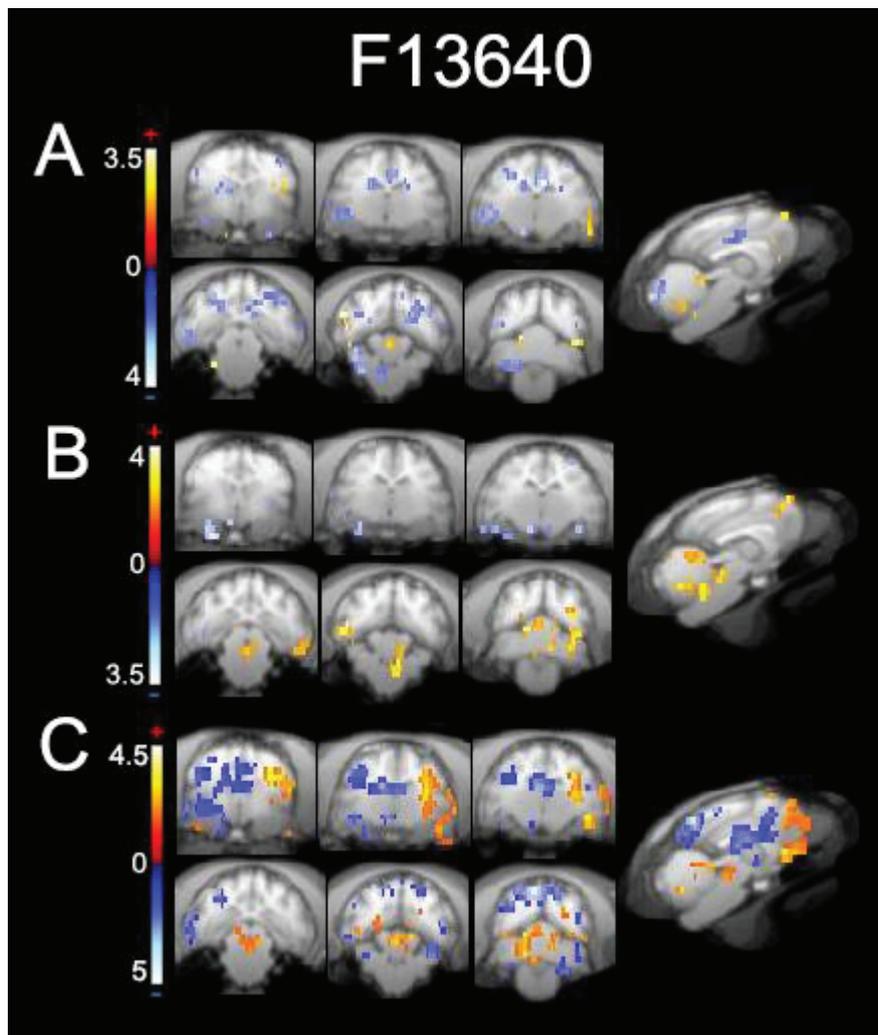


Figure 78 : Cartographie des modifications du signal BOLD induites par le F13640 à 0,04 mg/kg (A), 0,08 mg/kg (B) et 0,16 mg/kg (C) chez le chat. Les voxels significativement activés apparaissent en rouge, les voxels inhibés en bleu ($p < 0.05$).

F15599 :

A la plus faible dose, le F15599 induit de nombreuses modifications significatives du signal BOLD, avec une inhibition principalement au niveau du cortex moteur, du thalamus et de l'hypothalamus. Le cortex occipital présente également des voxels inhibés. Les zones activées sont plus restreintes et se situent au niveau du septum latéral, dans le raphé médian, dans le cervelet et dans le cortex frontal, ainsi que de manière unilatérale dans le cortex insulaire droit.

A 0,08 mg/kg, les voxels significativement inhibés sont moins nombreux et surtout localisés dans l'hippocampe ventral, ainsi que dans l'amygdale et le thalamus. Les voxels significativement activés se situent dans le cervelet et le cortex frontal, ou de manière très légère et unilatérale dans le cortex temporal.

A la dose maximale, le pattern visualisé est très proche avec une diminution du signal BOLD dans l'amygdale et l'hippocampe, et une activation dans le cortex frontal, le cervelet et le colliculus. On devine à peine quelques voxels au niveau du raphé dorsal en coupe sagittale.

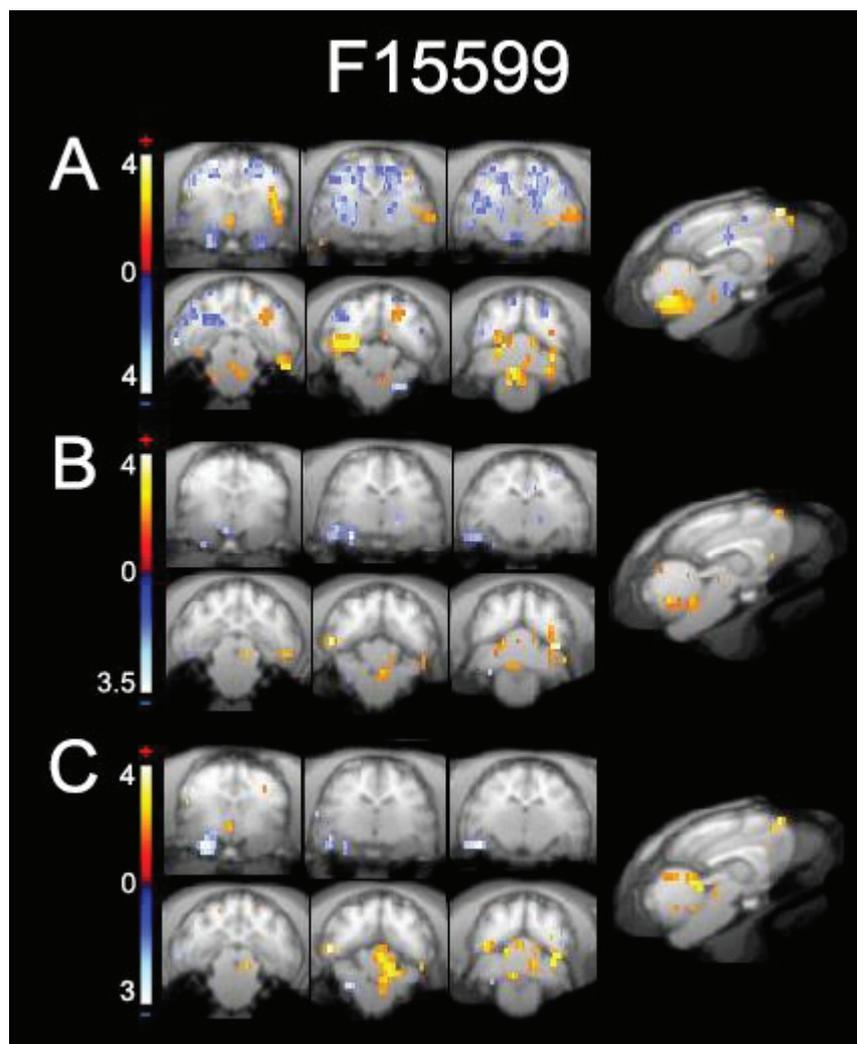


Figure 79 : Cartographie des modifications du signal BOLD induites par le F15599 à 0,04 mg/kg (A), 0,08 mg/kg (B) et 0,16 mg/kg (C) chez le chat. Les voxels significativement activés apparaissent en rouge, les voxels inhibés en bleu ($p < 0.05$).

3.3.3 Analyse par corrélation entre TEP et pharmaco-IRM

Compte tenu de la complémentarité de la spécificité du signal TEP et de l'information fonctionnelle apportée par la pharmaco-IRM, ainsi que de la possibilité de cartographier les effets des ligands par ces deux techniques, nous avons analysé les deux types de données de manière simultanée par études de corrélation à l'échelle du voxel afin de cartographier les zones où l'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par le ligand induit une réponse BOLD positivement ou négativement corrélée.

Par cette approche, nous obtenons deux cartes de corrélation très différentes entre les deux agonistes (figure 80). Le F13640 induit une diminution du signal BOLD proportionnelle à l'augmentation de l'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} au niveau du cortex cingulaire, du septum latéral, du cortex insulaire, de l'amygdale et du cortex occipital, et de manière plus subtile au niveau du raphé obscurus et en partie latérale du pons. Le signal BOLD augmente proportionnellement à l'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} dans une zone assez diffuse du mésencéphale comprenant le raphé dorsal, ainsi qu'unilatéralement dans le cortex moteur et temporal droit. Le profil du F15599 est différent, avec une diminution du signal BOLD proportionnellement à l'occupation des récepteurs dans des zones restreintes à quelques voxels dans le raphé obscurus, le pont et le cortex occipital. L'augmentation du signal BOLD relative à l'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} s'observe de manière très marquée dans le cortex cingulaire, et également dans le cortex entorhinal et les colliculi.

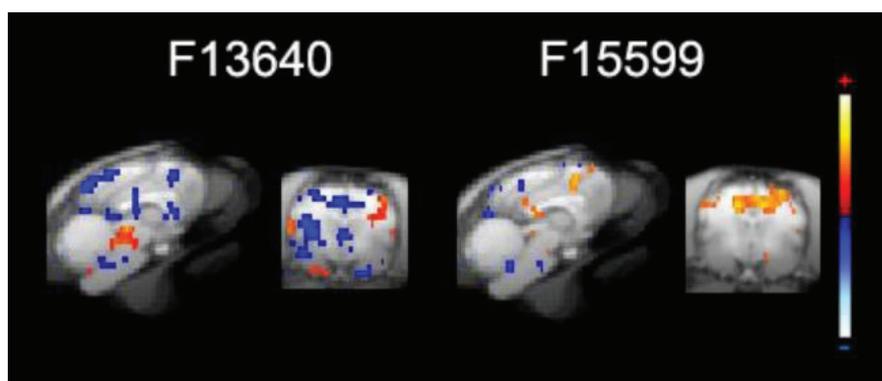


Figure 80 : Cartographie des corrélations significatives entre les variations du signal BOLD et l'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} pour le F13640 et le F15599. Les corrélations positives apparaissent en rouge, les corrélations négatives en bleu ($p < 0.05$).

IV - Discussion

Dans cette partie, nous avons utilisé de manière complémentaire la TEP et la pharmaco-IRM afin d'explorer le principe de sélectivité fonctionnelle au niveau des récepteurs 5-HT_{1A}. Nous avons comparé deux analogues structuraux très proches, le F13640 et le F15599, qui sont actuellement développés en vue d'un futur usage clinique en neurologie (respectivement pour le traitement des dyskinésies dans la maladie de Parkinson, et des troubles respiratoires et cognitifs dans le syndrome de Rett). Ces agonistes entiers présentent une affinité d'ordre comparable pour les récepteurs 5-HT_{1A} (K_i de 2,2 nM pour le F15599 et 1 nM pour le F13640 – Maurel *et al.*, 2007), avec une haute spécificité (Colpaert *et al.*, 2002 ; Newman-Tancredi *et al.*, 2009). Outre les différences entre ces deux ligands en termes de signalisation intracellulaire *in vitro* (Newman-Tancredi *et al.*, 2009 ; Newman-Tancredi *et al.*, 2017), la principale différence entre F13640 et F15599 rapportée *in vivo* concerne la capacité du F15599 à interagir préférentiellement avec les récepteurs postsynaptiques et notamment les récepteurs corticaux, avec peu de capacité à stimuler les récepteurs présynaptiques du raphé (Newman-Tancredi, 2011). En comparaison, le F13640 interagit de manière comparable entre les récepteurs pré et postsynaptiques (Llado-Pelfort *et al.*, 2012 ; McCreary *et al.*, 2016). Nous allons ici discuter point par point les résultats des différentes études avant de mettre en parallèle nos observations.

4.1 Effets du F13640 et du F15599 en pharmaco-IRM chez le rat

Considérations méthodologiques

L'IRM pharmacologique est un outil idéal pour explorer cette problématique car elle permet de cartographier les effets des molécules *in vivo* dans l'ensemble du cerveau avec une bonne résolution temporelle et spatiale (Jenkins, 2012). Cette technique a été utilisée pour l'étude d'autres ligands du système sérotoninergique, à la fois chez l'animal et chez l'humain (Martin et Sibson, 2008). Dans une précédente étude, le laboratoire a fait la preuve de concept de l'intérêt de l'utilisation de l'IRM pharmacologique pour l'étude de l'agonisme biaisé des récepteurs 5-HT_{1A}, en comparant les agonistes biaisés F13714 et F15599 avec l'agoniste « classique » 8-OH-DPAT et l'antagoniste MPPF. Cette étude a montré des différences importantes entre ces molécules en termes de pattern d'activation. Toutefois,

l'effet des ligands avait été mesuré sur 15 minutes post-injection et à une seule dose (qui était très différente entre F13714 et F15599, car le F13714 induit des signes de syndromes sérotoninergiques aux doses de F15599 pharmacologiquement actives), ce qui limite l'interprétation des résultats.

Cette nouvelle étude visait donc à utiliser au maximum le potentiel de l'imagerie fonctionnelle en comparant le F15599 et le F13640, deux agonistes biaisés d'affinité proches pour les récepteurs 5-HT_{1A}, utilisables à des doses comparables et tous deux en développement comme futurs médicaments. Nous avons évalué les effets de ces agonistes aux trois doses de 0,16 mg/kg, 0,32 mg/kg et 0,63 mg/kg, pour lesquelles les effets pharmacologiques chez le rat sont bien documentés (Llado-Pelfort *et al.*, 2010 ; Llado-Pelfort *et al.*, 2012 ; Newman-Tancredi, 2011 ; Iderberg *et al.*, 2015a et b ; McCreary *et al.*, 2016). De plus nous avons effectué des acquisitions d'une durée totale d'une heure, ce qui permet de quantifier la réponse induite pendant 45 minutes après le challenge pharmacologique.

Afin d'assurer la meilleure reproductibilité possible, chaque rat était son propre contrôle et recevait les 3 doses d'agoniste (F13640 ou F15599) ainsi que le sérum physiologique. L'ordre de passage était randomisé avec un minimum de 3 jours entre les acquisitions pour assurer l'élimination complète de la molécule et minimiser les perturbations liées aux injections et aux acquisitions répétées. Le volume injecté était standardisé et la température corporelle, la fréquence cardiaque et la fréquence respiratoire était suivis au cours de l'acquisition pour s'assurer que l'effet mesuré n'était pas perturbé par des variations de ces paramètres.

Remarques générales

Avant de discuter de manière détaillée les différences entre les cartes d'activation du F13640 et F15599, nous pouvons énoncer plusieurs remarques globales. La première remarque est que l'effet des agonistes 5-HT_{1A} sur le signal BOLD est mixte : on observe à la fois des activations et des inhibitions très marquées, selon les régions considérées. Il apparaît nécessaire de prendre en compte les deux types d'effet pour bien caractériser les propriétés de ces ligands. Malgré la difficulté d'interprétation des variations négatives du signal BOLD (Lauritzen *et al.*, 2012), il n'est pas rare d'observer ces inhibitions en IRM pharmacologique (Jenkins, 2012). Il n'est pas surprenant d'observer des phénomènes mixtes

pour les récepteurs 5-HT_{1A}, à la fois parce qu'ils sont exprimés par des populations neuronales diverses (notamment des neurones glutamatergiques ou GABAergiques), et parce que leur stimulation induit classiquement une hyperpolarisation des neurones les exprimant (pour revue Polter et Li, 2010). Plusieurs études précédentes utilisant des agents de contraste ont montré que l'injection de 8-OH-DPAT s'accompagne d'une baisse du volume sanguin cérébral relatif (rCBV) dans l'hippocampe et d'autres structures exprimant les récepteurs 5-HT_{1A}, chez le rat et la souris (Scanley *et al.*, 2001 ; Gozzi *et al.*, 2010 ; Mueggler *et al.*, 2011 ; Razoux *et al.*, 2013). Ces études n'ont pas démontré d'effets positifs du 8-OH-DPAT en conditions physiologiques ; toutefois, le signal BOLD n'est qu'indirectement relié au flux sanguin cérébral et dépend aussi du taux d'oxygène métabolique cérébral (CMRO₂), ces deux processus étant liés à des mécanismes différents même si ils sont deux modifiés par l'activité neuronale (Lauritzen *et al.*, 2012). Cette nuance est susceptible d'expliquer pourquoi les agonistes 5-HT_{1A} peuvent provoquer des augmentations du signal BOLD dans certaines régions, à la fois dans notre étude, dans l'étude précédente (Becker *et al.*, 2016) et dans une étude se focalisant sur les récepteurs 5-HT₇ mais utilisant le 8-OH-DPAT (Canese *et al.*, 2011).

Malgré une augmentation considérable du temps d'acquisition par rapport à la précédente étude (Becker *et al.*, 2016), on peut constater que la grande majorité des effets observés sont plus significatifs au bout d'une demi-heure après injection plutôt que pendant les 15 premières minutes, et persistent probablement après 45 minutes. Pour analyser complètement le profil d'action de ces agonistes il faudrait encore augmenter la durée d'acquisition, ce qui constitue un challenge étant donné le volume d'informations générées par ce type d'études (1200 images par acquisition dans notre protocole). Ces résultats semblent peu surprenants au vu de la lente dissociation entre ces agonistes et les récepteurs 5-HT_{1A} observée par notre équipe chez le rat avec le [¹⁸F]F15599 et surtout le [¹⁸F]F13640 (Lemoine *et al.*, 2010 ; première partie expérimentale de cette thèse). Cependant, les cinétiques TEP d'une molécule radiomarquée ne sont pas fortement prédictives des cinétiques d'action de la molécule *in vivo* à doses pharmacologiques ; il apparaît donc difficile de prévoir la durée d'acquisition sur ce critère (Jenkins, 2012).

Enfin, la remarque globale majeure vis-à-vis de ces résultats est que les deux agonistes possèdent des « signatures » fonctionnelles qui sont propres à chaque dose. En

effet, si pour chaque agoniste les zones recrutées sont globalement les mêmes, certaines régions n'apparaissent activées ou inhibées qu'à certaines doses. De plus, selon les régions considérées l'effet observé n'est pas forcément proportionnel à la dose, ce qui a déjà été rapporté dans d'autres études à la fois en termes d'extension spatiale et d'intensité (Steward *et al.*, 2005). Ces résultats soulignent l'importance du choix des doses lors de la conception d'un protocole d'IRM pharmacologique. Etant donné la complexité des résultats observés, pour bien distinguer les deux agonistes en termes de caractéristiques fonctionnelles il convient de commenter les variations région par région.

Comparaison des cartes d'activation et d'inactivation du signal BOLD

On observe tout d'abord une zone étendue où les deux molécules produisent une activation rapide et persistante, à toutes les doses et proportionnellement à la dose : cette zone s'étend rostro-caudalement depuis le thalamus antérieur jusqu'aux colliculi supérieurs, latéralement de l'habenula jusqu'à la partie ventrale de l'hippocampe, ainsi que dorsalement jusqu'au cortex rétrosplénial. Plus en avant du cerveau, F13640 et F15599 provoquent systématiquement une activation dose-dépendante au niveau des noyaux magnocellulaires préoptiques. A partir de 15 minutes après injection, cette activation s'étend de manière plus ou moins prononcée dans la diagonale de Broca, située ventralement par rapport au septum latéral. Dans les régions citées, l'intensité de l'effet des deux molécules est assez comparable, excepté dans le thalamus dorsal où l'activation produite par F13640 est bien plus significative (même à la plus faible dose de F13640 l'effet est plus significatif que la plus forte dose de F15599).

Les différences entre les molécules sont plus notables au niveau du cortex cingulaire, où le F13640 provoque un effet « en cloche » (maximal à la dose intermédiaire, minimal à la plus haute dose), tandis que le F15599 induit une activation proportionnelle à la dose avec un effet maximal bien plus prononcé que celui du F13640.

Certaines régions ne sont activées qu'à certaines doses, comme l'insula où le signal BOLD n'est significativement augmenté qu'à 0,16 et 0,32 mg/kg de F13640. A l'inverse le F15599 ne produit une activation dans cette région qu'à 0,63 mg/kg. C'est également le cas du striatum, où des activations apparaissent aux doses de 0,32 mg/kg et 0,63 mg/kg de F15599, ou 0,32 mg/kg de F13640. Enfin, on peut mentionner quelques activations

retrouvées de manière isolée à la plus faible dose de F15599 dans le cortex somatosensoriel (bregma +0.90 mm) et auditif (bregma -4.20 mm).

De même, les patterns d'inhibition sont différents en termes d'intensité et d'étendue entre F13640 et F15599. Dans le cervelet et surtout le tronc cérébral, les deux molécules produisent une baisse du signal BOLD apparaissant dès les 15 premières minutes après injection, à toutes les doses. Toutefois l'inhibition du F13640 est au moins deux fois plus significative que celle produite par le F15599 dans ces deux régions (le T score maximum du F15599 ne dépassant pas 9 à 0,63 mg/kg contre 18 pour le F13640). L'effet du F13640 est très prononcé dans le tronc cérébral comparé aux autres régions, tandis que le F15599 agit de manière plus équilibrée.

Les deux molécules provoquent également une inhibition qui s'étend de l'hippocampe dorsal au cortex somatosensoriel, avec une significativité comparable à la fois entre les molécules et les doses. Il semble toutefois que l'effet du F13640 est plus diffus au niveau du cortex tandis que l'effet du F15599 reste plus localisé au niveau de l'hippocampe dorsal, surtout à faible dose. Le F13640 provoque aussi une réponse BOLD négative dans l'amygdale à toutes les doses tandis que l'effet du F15599 est restreint à seulement quelques voxels dans cette région, à partir de 0,32 mg/kg. Au niveau du cortex orbital préfrontal, le F13640 induit une inhibition modérée mais diffuse à toutes les doses sauf la plus forte dose. A l'inverse, l'inhibition induite par le F15599 est plus fine mais observées à toutes les doses. Il faut également mentionner le cortex visuel, le subiculum et le cortex entorhinal où les deux molécules exercent un effet inhibiteur aux différentes doses, sans que différences notables, et plus ponctuellement dans l'hypothalamus et la partie ventrale du thalamus. Le septum latéral est une des régions les plus inhibées par le F15599 aux doses de 0,16 mg/kg et 0,32 mg/kg, tandis que le F13640 semble dépourvu d'effet significatif dans cette région quelle que soit la dose.

Enfin, le F13640 produit une inhibition au niveau du raphé, qui démarre dans les noyaux pontiques et le raphé médian pendant les 15 premières minutes puis s'étend latéralement et jusqu'au raphé dorsal. Cette inhibition est très marquée à 0,16 mg/kg, s'estompe légèrement à 0,32 mg/kg et devient maximale à 0,63 mg/kg. Pour le F15599, aucun effet n'est observé à 0,16 mg/kg, tandis qu'un effet différé et modeste apparaît à la

dose intermédiaire (à partir de 30 minutes). A 0,63 mg/kg de F15599, l'inhibition comparable à celle produite par le F13640 à 0,16 mg/kg.

Cette analyse détaillée région par région est en faveur de différences fonctionnelles, aussi bien en termes d'activation que d'inhibition du signal BOLD, entre les deux molécules. Parmi les différences majeures :

- Le F13640 possède un effet activateur très prononcé au niveau du thalamus dorsal, mais semble atteindre un seuil d'activation maximale dans le cortex cingulaire bien plus faible que le F15599.

- L'effet inhibiteur du F13640 est très prononcé dans le tronc cérébral, tandis que l'effet du F15599 reste plus modéré et augmente peu avec la dose.

- On remarque également une action inhibitrice du F15599 au niveau du septum latéral à de faibles doses, contrairement au F13640.

- Enfin, le F13640 inhibe de façon importante et aux trois doses testées le signal BOLD dans le raphé dorsal et le raphé médian, tandis que l'effet du F15599 est plus réduit dans ces régions et n'est pas observé à 0,16 mg/kg.

A travers ces quelques exemples il paraît peu probable que les particularités de chaque agoniste soient expliquées simplement par l'affinité légèrement plus basse du F15599 vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{1A} : dans certaines régions l'effet maximal est clairement plus élevé avec le F13640 (raphé, tronc cérébral, cervelet, thalamus dorsal) ou le F15599 (cortex cingulaire, septum latéral).

Interprétation des effets du F13640 et du F15599 sur le signal BOLD

Cette étude se veut avant tout descriptive et il apparaît difficile de décrypter précisément le lien entre l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} et signal BOLD dans les différentes régions. En effet, le signal BOLD varie en fonction de l'activité neuronale de manière non spécifique aux récepteurs, c'est-à-dire que dans notre étude les variations observées peuvent résulter de l'activation directe des récepteurs 5-HT_{1A} ou de modifications indirectes de l'activité d'autres neurones qui sont sous l'influence de populations neuronales exprimant les 5-HT_{1A}. Ceci est à prendre en compte d'autant plus que les autorécepteurs

présents au niveau du raphé modulent la libération de sérotonine dans les aires de projection, qui elle-même peut modifier le signal BOLD, à la fois en stimulant des récepteurs neuronaux et des récepteurs potentiellement présents sur des microvaisseaux, avec un effet vasodilatateur ou vasoconstricteur direct (Jenkins, 2012). Il faut aussi noter que la nature du couplage neurovasculaire est mal connue et les mécanismes sous-jacents peuvent varier en fonction du système de neurotransmission (Jenkins, 2012) et des régions (Lauritzen *et al.*, 2012). Compte tenu de tous ces éléments, l'interprétation des effets de ces molécules reste spéculative en l'absence d'études supplémentaires.

Il est probable que l'inhibition observée dans un certain nombre de régions comme l'hippocampe, l'amygdale, le septum latéral, le raphé et diverses régions corticales est directement liée à la stimulation des récepteurs 5-HT_{1A} dans ces régions de par leur caractère inhibiteur (notamment par l'activation des canaux GIRKs qui produisent une hyperpolarisation importante et rapide – voir Polter et Li, 2010), de manière comparable aux diminutions de rCBV induites par le 8-OH-DPAT dans ces régions (Scanley *et al.*, 2001 ; Gozzi *et al.*, 2010 ; Mueggler *et al.*, 2011).

Le raphé est une région critique dans notre problématique d'agonistes biaisés, puisque plusieurs études ont montré que chez le rat le F15599 active préférentiellement les récepteurs postsynaptiques avec peu d'effet au niveau des autorécepteurs (Newman-Tancredi, 2011). Ces résultats semblent confirmés par notre étude puisqu'à 0,16 mg/kg le F15599 ne produit aucune réponse dans cette région, les effets n'apparaissent qu'à partir de 0,32 mg/kg. Au contraire le F13640 provoque une inhibition marquée dès 0,16 mg/kg et à toutes les doses. Dans d'autres travaux, le F15599 induit similairement une augmentation de l'expression c-Fos à 0,63 mg/kg mais pas 0,16 mg/kg dans le raphé dorsal (Newman-Tancredi *et al.*, 2009). De plus, le F15599 ne diminue le taux de phosphorylation de la protéine ERK 1/2 dans l'hippocampe qu'à partir de 0,63 mg/kg et pas à 0,16 mg/kg, un effet qui est interprété comme le signe d'une diminution de libération de sérotonine dans l'hippocampe via la stimulation des autorécepteurs (Newman-Tancredi *et al.*, 2009). Au contraire et comparativement à nos résultats, le F13640 est capable de diminuer fortement la phosphorylation ERK 1/2 dans l'hippocampe à 0,16 mg/kg (Buritova *et al.*, 2009). En microdialyse les résultats sont plus nuancés, le F15599 provoquant une diminution de libération de sérotonine dans l'hippocampe avec une ED₅₀ de 0,24 mg/kg, et un effet plutôt

faible et transitoire à 0,16 mg/kg (Llado-Pelfort *et al.*, 2010). Cette diminution de libération s'observe également dans le striatum à partir de 0,16 mg/kg (Ilderberg *et al.*, 2015). Bien que nous n'observions pas d'effet dans le raphé à 0,16 mg/kg dans notre étude, il est donc probable que le F15599 active transitoirement et modestement les autorécepteurs à cette dose. Étant donné la sensibilité satisfaisante de nos mesures dans cette étude, il serait judicieux de tester les effets de ces agonistes biaisés à doses inférieures où la préférence postsynaptique du F15599 est plus marquée. En comparaison, le F13640 diminue la libération de sérotonine dans l'hippocampe avec une ED₅₀ de 0,09 mg/kg (Llado-Pelfort *et al.*, 2012) et un effet déjà important à 0,04 mg/kg dans le striatum (Ilderberg *et al.*, 2015 ; McCreary *et al.*, 2016). L'effet présynaptique du F13640 devrait donc toujours être vérifié à doses inférieures en pHRM.

La forte diminution du signal BOLD dans le tronc cérébral est assez inattendue étant donné que cette région n'est pas classiquement décrite comme très riche en récepteurs 5-HT_{1A}, et leur rôle fonctionnel dans cette région est encore mal connu. En revanche cette zone est fortement marquée par le [¹⁸F]F13640 (voir partie expérimentale I de cette thèse) et le [¹⁸F]F15599 (Lemoine *et al.*, 2010) en microTEP, il est donc légitime de supposer que le tronc cérébral comporte de nombreux récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels. Ces récepteurs sont probablement impliqués dans les effets pharmacologiques de ces agonistes, en particulier l'effet antidouleur du F13640 (Buritova *et al.*, 2005) et les effets pro-respiratoires des deux agonistes (Levitt *et al.*, 2013 ; Ren *et al.*, 2015).

De même, l'inhibition du signal BOLD dans le cervelet reste à élucider compte tenu du fait que cette région est connue comme très pauvre en récepteurs 5-HT_{1A}, mais on y observe également du signal en microTEP avec les deux agonistes radiomarqués. Similairement, on peut mentionner une précédente étude qui a montré que l'administration de WAY-100635 provoque une augmentation rCBV au niveau du cervelet (Scanley *et al.*, 2001). Ces éléments laissent supposer qu'une population de récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels est présente, en dépit des nombreuses études qui sont en faveur d'une absence de récepteurs dans le cervelet ; il est aussi possible que dans cette région les effets observés soient secondaires à l'activation de récepteurs 5-HT_{1A} dans d'autres régions, notamment dans le raphé. Toutefois et comme mentionné par Scanley *et al.*, le WAY-100635 ne provoque pas d'augmentation de libération de sérotonine suite au blocage des

autorécepteurs. De plus, une étude chez le chat a montré que l'application de sérotonine et de 8-OH-DPAT en iontophorèse dans la matière grise du cervelet diminue l'activité des cellules de Purkinje via des récepteurs 5-HT_{1A}, car ces effets sont bloqués par l'antagoniste spipérone (Kerr et Bishop, 1992), en faveur de la première hypothèse. Étant donné l'importance fonctionnelle du cervelet dans le contrôle des fonctions motrices (Sutton *et al.*, 2015), les effets produits par le F15599 et surtout le F13640 dans notre étude sont peut-être liés à la modification du comportement locomoteur des rats hémiparkinsoniens, qui sont mineurs avec le F15599 et très importants avec le F13640 à 0,16 mg/kg (Iderberg *et al.*, 2015a et b).

Les mêmes observations peuvent être faites vis-à-vis de l'activation importante dans les colliculi et le thalamus dorsal : ces régions sont décrites comme moyennement à peu denses en récepteurs 5-HT_{1A} mais sont fortement marquées par le [¹⁸F]F13640 et le [¹⁸F]F15599 en TEP chez le rat. Ces mêmes régions étaient activées par le F13714 et le 8-OH-DPAT dans l'étude précédente (Becker *et al.*, 2016), et expriment possiblement des récepteurs 5-HT_{1A} fonctionnels. Dans une précédente étude de pharmacologie-IRM par connectivité fonctionnelle, Razoux *et al.* ont montré que le thalamus dorsomédian constitue un nœud fonctionnel interagissant de manière majeure avec les autres régions du cerveau chez la souris suite à l'injection de 8-OH-DPAT (Razoux *et al.*, 2013). De même les deux agonistes radiomarqués se fixent également de manière modérée dans le striatum, une région souvent décrite comme pauvre en récepteurs mais pour laquelle plusieurs études récentes ont montré qu'elle contient des récepteurs fonctionnels exprimés par des populations neuronales diverses (Bishop *et al.*, 2009 ; Meadows *et al.*, 2017), pouvant expliquer les ponctuelles activations observées.

Enfin, l'activation importante dans le cortex cingulaire est probablement due à des effets indirects liés à l'activation de récepteurs 5-HT_{1A} dans cette région, qui est connue pour entraîner une libération locale de dopamine (Llado-Pelfort *et al.*, 2010 ; Newman-Tancredi, 2011). Or, il a été montré que le signal BOLD augmente avec la libération de dopamine (Jenkins, 2012). Cette explication est pertinente étant donné que le F15599 est capable d'induire une activation BOLD avec une efficacité supérieure à celle du F13640 dans cette région, ce qui est compatible avec les travaux précédents montrant que le F15599 possède une préférence pour les hétérorécepteurs corticaux. On peut ajouter que plusieurs

populations de neurones différents expriment les récepteurs 5-HT_{1A} dans cette région, et il peut y avoir un effet mixte à la fois activateur ou inhibiteur selon les neurones stimulés, ce qui expliquerait l'effet plus faible du F13640 à 0,63 mg/kg qu'à 0,32 mg/kg (Newman-Tancredi, 2011).

D'une manière plus générale, la réponse hémodynamique observée peut résulter de l'activation des récepteurs postsynaptiques et des autorécepteurs, surtout dans le cas du F13640. Etant donné que la sérotonine peut avoir un effet activateur ou inhibiteur selon les régions et les espèces considérées (Preece *et al.*, 2009 ; McKie *et al.*, 2005 ; Schwarz *et al.*, 2007), il est probable que des augmentations ou des diminutions du signal BOLD aient lieu au niveau des aires de projection du système sérotoninergique comme l'hippocampe, le cortex, le thalamus et le striatum, si la stimulation des autorécepteurs par l'agoniste est suffisante pour diminuer la libération de sérotonine.

Limites et perspectives

Malgré la spécificité bien documentée des molécules, il serait judicieux de compléter l'étude avec des expériences supplémentaires avec une préinjection de l'antagoniste 5-HT_{1A} WAY-100635, pour confirmer que les effets prononcés du F13640 et du F15599 dans des régions inhabituelles comme le thalamus et le cervelet font bien intervenir les récepteurs 5-HT_{1A}.

Une autre limite d'ordre méthodologique concerne l'influence des paramètres cardiovasculaires. En effet, le signal BOLD est sensible aux variations systémiques comme la pression artérielle, la fréquence respiratoire, la fréquence cardiaque ou la pCO₂ (Jenkins, 2012 ; Mandeville *et al.*, 2015 ; Steward *et al.*, 2005 ; Martin et Sibson, 2008). Les substances pharmacologiques administrées induisent souvent des effets systémiques qui sont susceptibles de perturber le signal mesuré. Il a par exemple été montré que l'effet dépresseur respiratoire induit par certaines agonistes opioïdes entraîne un « masquage » des effets centraux de ces molécules (Steward *et al.*, 2005). Il est donc préconisé de réaliser un suivi continu de ces paramètres au cours de l'acquisition pour vérifier qu'ils ne sont pas modifiés après administration de la molécule. Dans notre étude, nous avons observé une augmentation de la fréquence respiratoire après injection des deux ligands, quelle que soit la dose. Afin de remédier à ce problème nous avons utilisé les ventricules et la matière

blanche comme des régions de référence, puisque ces structures n'incluent pas de récepteurs 5-HT_{1A} et que le liquide céphalo-rachidien est sensible aux changements de fréquence respiratoire (Birn *et al.*, 2009 ; Mandeville *et al.*, 2015). Cette approche semble utile car nous avons remarqué un pattern d'inhibition plus diffus et concordant avec la distribution des récepteurs 5-HT_{1A} après correction par ces régresseurs de non intérêt. Toutefois, il conviendrait à l'avenir de développer des méthodes d'intubation des animaux pour normaliser la fréquence respiratoire, et d'améliorer encore le matériel de monitoring afin de suivre de manière automatique et continue les différents paramètres physiologiques. Ces points d'amélioration sont compliqués à réaliser en pratique et nécessitent du matériel spécifique compatible avec le champ magnétique de l'IRM.

L'influence de l'anesthésie doit également être prise en compte dans l'interprétation de ces résultats. En effet, l'anesthésique est susceptible de modifier l'activité et le métabolisme neuronal, la réactivité vasculaire et le couplage neurovasculaire (Jenkins, 2012). Ces effets sont difficiles à estimer et peuvent perturber directement le système de neurotransmission étudié. Il n'existe pas d'anesthésique idéal, mais l'isoflurane à faible dose (2% ou moins) est très souvent utilisé dans les expériences d'IRM pharmacologique, car il permet de contrôler précisément et facilement l'anesthésie et d'induire un état relativement stable durant toute l'acquisition (Haensel *et al.*, 2015). Toutefois et comme précisé précédemment, l'isoflurane perturbe l'activité du système sérotoninergique (Massey *et al.*, 2015 ; Mukaida *et al.*, 2007) et peut même altérer l'état de couplage des récepteurs (Seeman et Kapur, 2003).

4.2 Effets du F13640 et du F15599 sur l'utilisation du glucose cérébral

Nous avons mis en place une seconde étude permettant de cartographier les effets du F13640 et du F15599 en mesurant le métabolisme glucidique en microTEP à l'aide du [¹⁸F]FDG. Lorsque les neurones sont activés, il y a augmentation des besoins énergétiques et de consommation de glucose ; en tant qu'analogue du glucose, le [¹⁸F]FDG est capturé dans la cellule mais ne subit pas la glycolyse et s'accumule sous forme de [¹⁸F]FDG-6-phosphate (Phelps *et al.*, 1979). La consommation de glucose par les cellules neuronales est donc proportionnelle à la radioactivité accumulée. Cette approche est complémentaire de la technique d'IRM pharmacologique car elle mesure un processus souvent décrit comme plus

directement relié à l'activité neuronale (Jenkins, 2012), et permet des explorations chez le rat vigile. En revanche, elle présente une résolution spatiale et temporelle bien moindre (Lancelot et Zimmer, 2010), et plusieurs paramètres sont susceptibles d'influencer la distribution du [¹⁸F]FDG au cours de l'expérience, notamment le stress, la température corporelle et la glycémie (Deleye *et al.*, 2014).

Considérations méthodologiques

Dans cette étude microTEP, nous avons comparé le F13640 et le F15599 aux mêmes doses que l'étude phIRM, de 15 minutes à 45 minutes après injection des agonistes (correspondant donc aux temps T2 et T3 en phIRM). Afin d'assurer la meilleure reproductibilité possible, chaque rat était son propre contrôle et recevait les 3 doses d'agoniste (F13640 ou F15599) ainsi que le sérum physiologique. L'ordre de passage était randomisé avec un minimum de 3 jours entre les acquisitions pour assurer l'élimination complète de la molécule et minimiser les perturbations liées aux injections et aux scans répétés. Le volume injecté était standardisé et l'activité injectée rapportée au poids de l'animal (environ 37 kBq/g). La durée de jeun était fixée à 12 heures afin d'améliorer la reproductibilité des résultats.

Comparaison des cartes d'activation et d'inactivation de la consommation de glucose

De manière générale, pour chaque agoniste les effets observés sont moins diffus qu'en IRM pharmacologique et localisés à quelques régions en particulier, avec un pattern similaire entre les doses.

Le F13640 produit une augmentation de consommation de glucose significative dans diverses zones corticales (cortex moteur, cortex somatosensoriel, cortex insulaire, cortex auditif, cortex entorhinal et cortex visuel), ainsi que dans le thalamus dorsal, le colliculus et le cervelet. Ces activations sont dose-dépendantes et retrouvées pour toutes les doses de F13640. Comme en pharmaco-IRM le F13640 provoque aussi des effets inhibiteurs, avec une baisse de consommation de glucose dose-dépendante dans le cortex orbital préfrontal, le cortex piriforme, le striatum et le tronc cérébral. Aux doses plus importantes un effet apparaît aussi dans l'hippocampe et l'hypothalamus.

Le F15599 induit des changements beaucoup plus restreints et moins significatifs. La capture de [¹⁸F]FDG est augmentée principalement dans le cortex frontal, le cortex insulaire et les colliculi avec un effet maximum dès 0,32 mg/kg. A 0,63 mg/kg on voit aussi apparaître une activation dans le thalamus et le cervelet. Les inhibitions ont lieu surtout dans le cortex piriforme et le striatum, ainsi que de manière très localisée dans le tronc cérébral. A partir de 0,32 mg/kg on retrouve aussi quelques voxels situés latéralement au raphé dorsal.

On peut donc constater que dans cette étude les différences entre F13640 et F15599 sont très marquées quelles que soient les doses, et que la capture de glucose par les neurones s'étend et augmente en intensité avec la dose. Le F13640 produit une activation beaucoup large au niveau cortical alors que l'effet du F15599 reste limité au cortex insulaire et au cortex moteur. De plus, l'activation dans le cervelet et le thalamus est quasiment indétectée avec le F15599. Similairement les effets inhibiteurs du F15599 sont cantonnés au cortex piriforme, au striatum et à la partie médiane du tronc cérébral, tandis que le F13640 inhibe également le cortex orbital et de manière plus diffuse l'ensemble du tronc. Cependant on peut remarquer que le F15599 provoque une diminution de la consommation de glucose dans une zone proche du raphé dorsal à partir de 0,32 mg/kg, qui n'a pas été détectée avec le F13640 dans ce protocole.

Interprétation des effets du F13640 et du F15599 sur le métabolisme glucidique et comparaison avec le signal BOLD

Concernant la distribution des différents effets mesurés, les résultats sont concordants entre les études en microTEP et en pharmaco-IRM pour certaines régions comme le thalamus dorsal et les colliculi (bien que l'activation mesurée avec le [¹⁸F]FDG soit moins étendue), ainsi que le cortex insulaire (qui est systématiquement activé dans l'étude microTEP et ponctuellement activé pour certaines doses en pharmaco-IRM). De même, le tronc cérébral est fortement inhibé à la fois en termes de signal BOLD ou de consommation de glucose avec le F13640. Le cortex orbital préfrontal et l'hippocampe sont également inhibés par le F13640 dans les deux études, mais uniquement en pharmaco-IRM concernant pour le F15599. On remarque aussi que l'inhibition observée avec le [¹⁸F]FDG est localisée à l'intérieur de l'hippocampe ventral, tandis qu'en pharmaco-IRM les voxels sont situés plutôt dans l'hippocampe dorsal et en bordure de l'hippocampe ventral, du côté cortical.

Pour d'autres régions les résultats sont clairement discordants. En pharmaco-IRM une partie du striatum apparaît activée par le F15599 ou le F13640 à certaines doses. Cette même région est ici significativement inhibée à toutes les doses des deux agonistes. A l'inverse, dans le cervelet le F13640 et dans une moindre mesure le F15599 ont tendance à provoquer une augmentation du métabolisme glucidique, alors qu'ils provoquent une diminution du signal BOLD. Par ailleurs, il est surprenant de constater que quelques voxels inhibés apparaissent dans l'étude microTEP au niveau du raphé à 0,32 mg/kg et 0,63 mg/kg pour le F15599 mais pas le F13640, compte tenu des résultats précédents et de la littérature. Une autre différence est l'activation corticale très diffuse induite par le F13640 en termes de consommation de glucose alors que l'agoniste a plutôt tendance à inhiber le signal BOLD dans le cortex (mis à part le cortex cingulaire, insulaire et rétrosplénial). Enfin, le cortex piriforme est systématiquement inhibé en microTEP alors que cette région n'est pas impactée dans le protocole d'IRM.

Il apparaît donc que les deux méthodes délivrent des messages différents et complémentaires relatifs à l'activité centrale des agonistes 5-HT_{1A}. Il est clair que pharmaco-IRM comme microTEP tendent à montrer que malgré leur structure chimique proche et leur affinité pour les mêmes récepteurs, F13640 et F15599 produisent des réponses dont la répartition spatiale et l'intensité sont différentes, possiblement par le biais de l'agonisme biaisé. De nombreux facteurs peuvent expliquer les discordances entre les deux techniques, à commencer par la résolution spatiale et temporelle bien meilleure en pharmaco-IRM, expliquant peut être le fait que dans de nombreuses régions l'effet n'est visible qu'en IRMf (et notamment le manque d'effet du F13640 dans le raphé en microTEP, peut-être camouflé par des effets de volume partiel et l'augmentation de capture du [¹⁸F]FDG dans des régions adjacentes). De plus le protocole pharmaco-IRM est réalisé chez l'animal anesthésié, tandis qu'en microTEP la capture du [¹⁸F]FDG se fait dans des conditions vigiles. Il s'agit d'un avantage au vu des perturbations du système sérotoninergique par les anesthésiques, mais par conséquent l'effet des agonistes sur le comportement du rat est susceptible d'augmenter ou de diminuer l'activité neuronale dans certaines régions sans que cela implique directement les récepteurs 5-HT_{1A}. En ce sens, il faut préciser que l'activité motrice des rats était globalement augmentée de manière proportionnelle à la dose, pour les deux agonistes. L'injection de 0,63 mg/kg de F13640 chez les rats entraînait aussi des secousses

latérales de la tête, un signe comportemental du syndrome sérotoninergique. Il est probable que l'augmentation importante de l'activité locomotrice induite par le F13640 explique l'activation diffuse du cortex moteur, somatosensoriel et du cervelet par cette molécule, comme déjà rapporté dans une précédente étude en autoradiographie *ex vivo* après injection de 8-OH-DPAT (Kelly *et al.*, 1988).

Enfin, il faut rappeler que les deux types de phénomènes mesurés sont différemment reliés à l'activité neuronale et il reste possible d'observer à la fois une activation en IRMf et une inhibition du métabolisme glucidique, notamment parce que l'inhibition neuronale peut constituer une certaine demande énergétique se traduisant par une augmentation du signal BOLD (Steward *et al.*, 2005 ; Lauritzen *et al.*, 2012), ou encore par l'intermédiaire d'effets vasoactifs. Dans une même étude en autoradiographie chez le rat (utilisant la [¹⁴C]iodoantipyrine pour évaluer le CBF et le 2-deoxy-D-[¹⁴C]glucose pour estimer le métabolisme glucidique), une équipe a notamment montré une augmentation massive du CBF dans de nombreuses régions par le 8-OH-DPAT alors qu'une diminution de la consommation de glucose était observée dans l'hippocampe (McBean *et al.*, 1991). A l'inverse, des molécules stimulatrices comme la caféine peuvent augmenter le métabolisme énergétique et diminuer le signal IRMf par vasoconstriction (Jenkins, 2012). Une étude TEP/IRMf simultanée chez le rat mesurant à la fois la consommation glucidique et le signal BOLD a clairement montré une dichotomie des deux paramètres mesurés, avec des différences spatiales et quantitatives des patterns d'activation et de connectivité fonctionnelle mesurés (Wehrl *et al.*, 2013).

Limites et perspectives

Cette étude visait à prouver qu'il est possible de mesurer les effets centraux du F13640 et du F15599 grâce au [¹⁸F]FDG, mais le protocole expérimental serait perfectible. En effet, la température de la cage n'était ici pas entièrement contrôlée et c'est un paramètre qui peut grandement altérer les effets mesurés, notamment parce que les agonistes 5-HT_{1A} peuvent provoquer une hypothermie. Il serait également informatif de pouvoir quantifier précisément les déplacements des animaux pendant la phase de captation, et de prendre davantage en compte les effets comportementaux des molécules pour comprendre comment ces effets sont reliés aux patterns observés.

Tout comme pour l'étude précédente, il conviendrait d'utiliser un groupe contrôle recevant une pré-injection de l'antagoniste WAY-100635 pour vérifier la spécificité des récepteurs 5-HT_{1A} dans les phénomènes observés. Pour discuter plus en détail l'influence de l'anesthésie sur l'activité du F13640 et du F15599 il serait intéressant de refaire la même étude chez des animaux anesthésiés à l'isoflurane, ce qui permettrait de comparer directement les résultats avec l'étude pharmaco-IRM.

Enfin, dans ces deux études il est difficile de connaître l'influence de la diminution de libération de sérotonine induite lors de la stimulation des autorécepteurs du raphé, notamment pour le F13640. Pour comprendre comment cela impacte les patterns mesurés il faudrait effectuer des études similaires chez des animaux ayant subi une déplétion en sérotonine.

4.3 Profils du F13640 et du F15599 en TEP/IRMf chez le chat

Cette partie de l'étude visait à tirer profit de la TEP et de l'IRM de manière simultanée afin de caractériser de manière plus précise les effets biaisés du F13640 et du F15599. En effet, la pharmaco-IRM apporte la possibilité de cartographier les modifications d'activité cérébrale après injection des agonistes mais sans information sur la fixation des agonistes à leurs récepteurs spécifiques. A l'inverse, en TEP il est possible de quantifier le taux d'occupation de récepteurs par les agonistes à doses pharmacologiquement actives dans les différentes régions cérébrales en mesurant la diminution de fixation d'un radioligand spécifique. La mesure simultanée du signal BOLD et de l'occupation de récepteurs particuliers est susceptible d'apporter des informations inédites sur le mécanisme d'action de molécules à visée centrale et sur le couplage neurovasculaire (Mandeville *et al.*, 2015 ; Wey *et al.*, 2014 ; Sander *et al.*, 2013). Actuellement peu d'études ont été effectuées mais cette méthode est capable d'évaluer *in vivo* la désensibilisation et l'internalisation de récepteurs suite à la stimulation par un agoniste (Sander *et al.*, 2016). Dans le contexte de l'agonisme biaisé, cette technique pourrait permettre de montrer que deux agonistes du même récepteur peuvent stimuler des voies de transduction différentes (indirectement grâce à la pharmaco-IRM) tout en se fixant aux mêmes récepteurs (quantifié par la TEP), voire que deux agonistes du même récepteur induisent des réponses BOLD dans des régions distinctes dû à la stimulation de différentes populations de récepteurs.

Considérations méthodologiques

Les études de taux d'occupation des récepteurs (« drug occupancy ») nécessitent de disposer d'un radiotracer spécifique. Dans notre étude nous avons utilisé l'antagoniste 5-HT_{1A} [¹⁸F]MPPF car il s'agit d'un radiotracer bien validé pour l'imagerie des récepteurs 5-HT_{1A} chez l'animal et l'humain, et dont les paramètres de fixation sont faciles à estimer étant donné l'absence de signal spécifique dans le cervelet (Aznavour et Zimmer, 2007 ; Costes *et al.*, 2007). Le modèle du chat a été choisi car son cerveau est de taille suffisante pour être visualisé avec la caméra clinique TEP/IRM, et plusieurs études précédentes ont déjà été effectuées avec le [¹⁸F]MPPF chez cette espèce (Ginovart *et al.*, 2000 ; Aznavour *et al.*, 2006a et b).

Le [¹⁸F]MPPF était administré sous forme de bolus/infusion afin de permettre la quantification directe du taux d'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} en une acquisition (Carson, 2000). Le moment d'injection de l'agoniste (à 50 minutes d'acquisition) a été choisi afin d'assurer une durée suffisante permettant aux cinétiques TEP d'atteindre un pseudo-équilibre. Comme dans les études précédentes, plusieurs doses de F13640 et de F15599 ont été administrées. Le choix des doses a été déterminé par extrapolation par rapport aux doses chez le rat. Au total quatre chats ont été utilisés pour la totalité du protocole incluant les sept différentes conditions, pour permettre à chaque animal d'être son propre contrôle et d'augmenter la puissance statistique de l'étude. Pour chaque chat, les acquisitions étaient séparées par au moins deux semaines, et les doses ont été randomisées afin de réduire les facteurs confondants. Étant donné que le signal IRMf peut être perturbé par des changements de paramètres physiologiques, les animaux étaient intubés et artificiellement ventilés pour contrôler la fréquence respiratoire, et la fréquence cardiaque, la température corporelle, la SpO₂ et le CO₂ expiré ont été continuellement suivis au cours des acquisitions. Dans ce protocole, aucune différence de ces paramètres physiologiques n'a été détectée en fonction des différentes conditions. Les doses injectées et les activités spécifiques du [¹⁸F]MPPF étaient comparables entre les groupes.

Pour l'analyse des données TEP, nous avons utilisé un script permettant la coregistration automatique des images TEP sur une même IRM anatomique pour chaque chat, puis la normalisation des images TEP sur un template IRM anatomique (Lancelot *et al.*,

2010). Cette méthode a permis d'assurer la reproductibilité nécessaire pour l'analyse, et une vérification visuelle sur toutes les acquisitions a été effectuée afin de valider ce prétraitement des données. Les cinétiques ont ensuite été extraites dans des régions d'intérêt correspondant à l'atlas défini sur le template IRM. Pour l'analyse de ces cinétiques, nous avons défini une ligne de base entre 40 et 50 minutes car c'est à partir de cette période que les cinétiques atteignent l'état le plus proche de l'équilibre. Pour chaque région d'intérêt les cinétiques ont ensuite été rapportées au cervelet afin de quantifier la fixation spécifique du [^{18}F]MPPF, permettant la comparaison entre les scans.

Occupation des récepteurs 5-HT_{1A} par le F13640 et le F15599

Pour évaluer la dynamique de l'effet de l'injection du F13640 et du F15599 sur les cinétiques du [^{18}F]MPPF, nous avons centré ces cinétiques autour de zéro par rapport à la ligne de base. Cette première analyse nous montre des différences notables entre les deux agonistes. Le F13640 entre en compétition avec le [^{18}F]MPPF de manière dose-dépendante dans les régions corticales (que ce soit le cortex frontal, cingulaire, pariétal ou occipital), et au niveau de l'hippocampe et du cortex temporal de manière moins prononcée (effet non visible à 0,04 mg/kg). La fixation du F13640 est visible dans le caudé et le thalamus à partir de 0,16 mg/kg.

Pour le F15599, l'effet est également significatif dans toutes ces régions mais contrairement au F13640 le déplacement du [^{18}F]MPPF n'augmente pas linéairement avec la dose. Dans certaines régions comme le cortex frontal, le cortex cingulaire, l'hippocampe et le cortex temporal, on observe une tendance à l'augmentation de la fixation du traceur à la dose de 0,04 mg/kg de F15599 par rapport aux cinétiques avec injection de NaCl. La comparaison de ces courbes avec celles du F13640 suggère donc que, dans ces régions riches en récepteurs 5-HT_{1A}, le F15599 à faibles doses a tendance à favoriser la fixation de l'antagoniste [^{18}F]MPPF. Bien que cette augmentation paradoxale ne soit pas significative, cela pose question étant donné que ce phénomène est visible dans les régions les plus riches en récepteurs. A dose intermédiaire, la compétition avec le radiotraceur est très transitoire, les courbes diminuent jusqu'à environ 65 minutes pour se superposer aux courbes en conditions contrôle. Même si le F15599 est déjà actif à ces doses chez le rat (Newman-Tancredi, 2011), il est possible que le [^{18}F]MPPF ne soit pas assez sensible pour détecter des

variations d'occupation des récepteurs 5-HT_{1A} à des doses peu élevées. Cependant, l'augmentation paradoxale observée à 0,04 mg/kg dans les régions riches en récepteurs 5-HT_{1A} reste inexplicée. Cette observation n'est probablement pas due à une éventuelle diminution de la libération de sérotonine endogène qui aurait pu être induite par le F15599, car le [¹⁸F]MPPF n'est sensible qu'à des variations très importantes de concentration de sérotonine extracellulaire (Udo De Haes *et al.*, 2006 ; Zimmer *et al.*, 2002b). C'est seulement à la dose de 0,16 mg/kg que la fixation du [¹⁸F]MPPF est clairement diminuée dans ces régions. Au niveau des autres régions, il y a un effet seuil avec une diminution visible seulement à 0,16 mg/kg et peu de changements aux autres conditions.

Nous avons ensuite estimé le taux d'occupation au niveau des récepteurs 5-HT_{1A} en comparant la fixation spécifique du [¹⁸F]MPPF après et avant injection. Le taux d'occupation du F15599 est plus réduit que celui du F13640 et varie entre 5 et 11% contre 9 à 17% pour le F13640 aux doses les plus élevées. Cette analyse par régions d'intérêt suggère aussi que la distribution régionale des agonistes varie en fonction de la dose, particulièrement dans le cas du F15599 où l'effet est très subtil à 0,08 mg/kg et devient beaucoup plus élevé dans toutes les régions à partir de 0,16 mg/kg. Au vu de ces résultats, le phénomène d'agonisme biaisé et de sélectivité des régions semble dose-dépendant, ce qui est en accord avec de précédentes études sur le F15599 (Newman-Tancredi *et al.*, 2009) et nos propres études chez le rat. On constate également une fixation spécifique du F13640 et du F15599 dans des régions pauvres en récepteurs comme le caudé et le thalamus, conformément à la distribution des molécules radiomarquées au fluor 18 chez le chat (Lemoine *et al.*, 2010).

Concernant le raphé dorsal, cette approche ne permet pas de mettre en évidence des différences claires entre les agonistes compte tenu de la taille de la structure et des effets de volume partiel. Cette région est d'ailleurs difficile à définir sur une image IRM anatomique, c'est pourquoi nous avons dû utiliser une image moyenne de l'ensemble des acquisitions TEP pour définir la région de manière « fonctionnelle » et non manuelle, par seuillage, pour l'intégrer à l'atlas.

Pour explorer des variations plus subtiles entre agonistes, notamment concernant cette région, les données ont été analysées voxels à voxels avec le logiciel SPM. Pour cela, des images ratio (où l'intensité des voxels était rapportée à l'intensité moyenne du cervelet)

ont été générées avant et après injection, puis comparées dans SPM. Ces résultats confirment que la fixation du F13640 est plus prononcée que celle du F15599. L'inhibition significative du marquage du [¹⁸F]MPPF est observée principalement dans diverses régions corticales (cortex cingulaire, insulaire, entorhinal et occipital) pour les trois doses de F13640. Grâce à cette approche on constate aussi une fixation très légère à 0,08 mg/kg dans le raphé dorsal, qui s'intensifie fortement à 0,16 mg/kg (aussi significative que dans le cortex) et s'étend au raphé obscurus.

En comparaison le F15599 n'occupe significativement les sites de fixation du radiotracteur qu'à partir de 0,08 mg/kg, de manière très fine et spécifiquement dans le cortex cingulaire, conformément à aux études précédentes suggérant que une préférence corticale du F15599 (Depoortere *et al.*, 2010 ; Becker *et al.*, 2016). A 0,16 mg/kg la distribution s'étend fortement au reste du cortex et au septum latéral. Quelques voxels significatifs sont également localisés dans les colliculi et une partie du raphé dorsal. Comme pour l'analyse par régions d'intérêt, ces résultats indiquent donc que la préférence corticale du F15599 dépend de la dose. La fixation dans le raphé reste toutefois bien plus restreinte que celle du F13640 et ne comprend pas le raphé obscurus en arrière du cerveau.

Effets du F13640 et du F15599 sur le signal BOLD chez le chat

Ces différents patterns de fixation aux récepteurs 5-HT_{1A} s'accompagnent de différents patterns de modification du signal en pharmaco-IRM. Le F13640 provoque une inhibition du signal BOLD dans l'amygdale et l'hippocampe mais aussi dans diverses zones du cortex (cortex cingulaire, insulaire, pariétal et occipital) et dans le caudé à certaines doses. Globalement, l'effet inhibiteur du F13640 est diffus à 0,04 mg/kg, s'estompe à 0,08 mg/kg et devient maximal à 0,16 mg/kg, dose à laquelle le pattern d'inhibition BOLD est visuellement comparable avec le pattern de fixation du F13640 en TEP. Le signal BOLD est augmenté à 0,08 et 0,16 mg/kg au niveau du cortex frontal, du raphé dorsal et de la matière grise du cervelet. A 0,16 mg/kg il y a aussi une activation unilatérale observée au niveau du cortex insulaire et temporal. On peut supposer que ce pattern unilatéral résulte d'effets mixtes du F13640 (à la fois pré et postsynaptiques) puisqu'à cette dose la fixation dans le raphé dorsal est élevée en TEP, ce qui est susceptible d'entraîner une diminution de la libération de

sérotonine avec des effets variables sur le signal BOLD dans les aires de projection (Preece *et al.*, 2009 ; McKie *et al.*, 2005).

Quant au F15599, on observe un pattern proche entre 0,08 mg/kg et 0,16 mg/kg, avec une baisse du signal BOLD dans l'amygdale et l'hippocampe, et une activation dans le cortex frontal et la matière grise du cervelet. On voit donc que malgré une occupation des récepteurs 5-HT_{1A} beaucoup plus diffuse à 0,16 mg/kg qu'à 0,08 mg/kg, le F15599 ne produit pas de larges effets comme le F13640. Enfin, à 0,04 mg/kg le F15599 produit des inhibitions étendues au niveau du cortex et quelques clusters de voxels activés dans le cortex frontal, le cervelet et le raphé médian. Ces observations sont difficiles à interpréter car à cette dose le F15599 ne produit aucune occupation significative des récepteurs 5-HT_{1A}, mais au contraire une augmentation paradoxale de la fixation du [¹⁸F]MPPF. On peut émettre l'hypothèse qu'à cette dose la fixation est trop faible pour être quantifiée en TEP mais induit des effets BOLD assez reproductibles pour être significatifs en pharmaco-IRM. Il conviendrait d'effectuer une étude plus poussée pour comparer le F13640 et le F15599 à plus faibles doses et avec un nombre d'animaux plus important pour confirmer et comprendre ces effets paradoxaux.

Cartes de corrélation entre l'occupation des récepteurs et l'effet BOLD

Enfin, une approche d'analyse intégrant les deux modalités d'imagerie a été utilisée sous la forme de cartes de corrélation voxel à voxel entre occupation des récepteurs en TEP et effet BOLD en pharmaco-IRM. A notre connaissance, il s'agit de la première étude conjointe des deux modalités acquises simultanément à l'échelle du voxel. Cette approche est potentiellement utile à la fois pour mieux comprendre et interpréter l'effet BOLD, et pour comparer les effets de différents ligands.

Ici les différences sont très marquées, le F13640 possédant globalement un effet BOLD inhibiteur en parallèle à la fixation aux récepteurs 5-HT_{1A} au niveau des récepteurs de l'amygdale, du cortex cingulaire, du septum latéral et dans certaines zones du cortex pariétal et du cortex occipital, ainsi que dans le tronc cérébral. Une corrélation positive importante et diffuse est située au niveau du raphé dorsal, ce qui signifie que la stimulation des autorécepteurs induit une augmentation proportionnelle du signal BOLD (déjà visible sur les cartes d'activation en pharmaco-IRM). Ce résultat est en opposition avec l'étude pharmaco-IRM chez le rat où le F13640 diminue fortement le signal BOLD dans le raphé. Les différences

sont probablement liées aux changements d'espèces et de protocole d'anesthésie entre les deux protocoles (l'effet conjoint de la kétamine et de l'isoflurane étant susceptible d'impacter fortement les effets observés). Si la stimulation des récepteurs du raphé entraîne une hyperpolarisation des neurones sérotoninergiques et une baisse du taux de décharge, il est néanmoins possible que le « freinage » du système sérotoninergique dans son activité de décharge spontanée et régulière crée une demande d'énergie locale, s'accompagnant d'une augmentation de l'effet BOLD (Lauritzen *et al.*, 2012).

Dans cette approche la carte TEP-phIRM du F15599 est très différente : peu de corrélations négatives sont retrouvées, signifiant que la fixation du F15599 sur les récepteurs 5-HT_{1A} ne s'accompagne que de manière très localisée (ou peu marquée) d'une diminution du signal BOLD (au niveau du tronc cérébral, du cortex occipital et de l'hippocampe, principalement). On observe principalement des corrélations positives au niveau du cortex, surtout du cortex cingulaire. Dans cette région l'effet est contraire à celui du F13640 pour lequel la corrélation est négative. Ces résultats sont en accord avec les effets biaisés et pro-activateurs du F15599 au niveau cortical, et en faveur d'une capacité du F15599 à distinguer différentes populations de récepteurs au sein du cortex (Newman-Tancredi, 2011). De plus, seuls quelques voxels apparaissent au niveau du raphé dorsal, en faveur d'une action du F15599 préférentiellement postsynaptique tandis que le F13640 exerce un effet pré et postsynaptique (Llado Pelfort *et al.*, 2012 ; Newman-Tancredi, 2011).

Limites et perspectives

Si cette étude se révèle être une preuve de concept de l'intérêt prometteur de la TEP-IRM simultanée en neuropharmacologique, quelques limites d'ordre méthodologique peuvent être énoncées.

Tout d'abord, le choix du radioligand est critique et conditionne les résultats observés en termes de taux d'occupation. Nous avons ici opté pour le [¹⁸F]MPPF car c'est un radioligand bien caractérisé et déjà utilisé chez le chat. En revanche en tant qu'antagoniste 5-HT_{1A} il se fixe à la fois sur les récepteurs de haute affinité et de basse affinité, et est susceptible d'être peu sensible à la compétition avec des agonistes, particulièrement des agonistes supposés biaisés, même à doses très actives (Bantick *et al.*, 2004b). Il est donc possible que dans notre étude nous sous-estimions le taux d'occupation réel par ces

agonistes. Les paramètres choisis pour ce protocole de bolus/infusion sont également importants : dans notre étude le ratio de fixation du [^{18}F]MPPF au niveau de l'hippocampe continue d'augmenter pendant toute l'acquisition en conditions contrôle. Pour optimiser le protocole et permettre une quantification plus stricte du taux d'occupation il aurait fallu atteindre des conditions d'équilibre avec un plateau des cinétiques (Carson, 2000). Cela aurait probablement nécessité d'augmenter considérablement la durée d'acquisition au vu de la durée utilisée dans un autre protocole de ce type avec le [^{18}F]MPPF (Udo de Haes *et al.*, 2006), ce qui est plus difficile à mettre en place dans notre étude dans la mesure où une trop longue période d'anesthésie est susceptible d'altérer encore davantage l'effet BOLD. De plus les chats étaient utilisés pour un total de 7 acquisitions chacun, il paraissait donc plus raisonnable de limiter la durée de l'examen.

Concernant la pharmaco-IRM, nous avons veillé dans cette étude à limiter au maximum les variations périphériques induites par les agonistes en intubant les animaux. Nous n'avons pas observé de modifications des paramètres physiologiques après injection, validant la comparaison entre les agonistes et l'injection de sérum physiologique. Toutefois, dans ce protocole nous utilisons des animaux avec un cerveau d'une taille relativement restreinte par rapport à la taille de la caméra, et un champ magnétique de 3 T contre 7 T dans notre protocole chez le rat. La taille de l'effet mesuré était donc proche de la sensibilité de la machine, c'est pourquoi le seuil de significativité utilisé pour illustrer les résultats SPM est beaucoup moins restrictif que chez le rat. Cela nécessite une certaine prudence dans l'interprétation des résultats car certains voxels peuvent apparaître faussement significatifs dû au fait que l'on effectue des comparaisons multiples sur des milliers de voxels avec un seuil peu restrictif. Nous aurions également pu utiliser des agents de contraste (nanoparticules de fer) pour augmenter la taille de l'effet et mesurer les fluctuations de volume sanguin cérébral (Jenkins, 2012) ; toutefois, étant donné le nombre d'acquisitions à réaliser par animal et le manque d'informations sur l'impact éventuel de l'administration répétée de nanoparticules de fer, nous avons préféré minimiser le caractère invasif de l'étude autant que possible. Enfin, la durée de mesure du signal BOLD était de 40 minutes seulement (de 30 à 70 minutes par rapport à l'acquisition TEP) à cause des limites techniques liées à la caméra (une durée supérieure de la séquence EPI induisait parfois une surchauffe, altérant le signal mesuré à partir d'environ 50 minutes). Ce point constitue une

limite importante car compte-tenu des résultats obtenus chez le rat on peut s'attendre à un effet plus significatif en fin d'acquisition. De plus, disposer du signal BOLD sur la totalité de l'acquisition aurait permis de mesurer une corrélation temporelle entre TEP et IRMf voxel à voxel ; dans notre cas nous sommes limités à une analyse simultanée sur une période de 20 minutes post-injection.

L'anesthésie des animaux constitue une dernière limite : conformément aux recommandations vétérinaires, nous avons utilisé la médétomidine et la kétamine pour l'induction ainsi que l'isoflurane pour l'entretien, afin de minimiser le stress de l'animal durant la phase d'induction (l'induction à l'isoflurane étant la cause d'un stress important) et de faciliter l'intubation. Il est difficile de connaître l'impact de l'utilisation conjointe de ces différents agents sur la neurotransmission. Ce point doit être pris en compte lors de l'interprétation des résultats, même si les acquisitions ont été effectuées dans des conditions expérimentales très comparables.

Ces limites sont pour la plupart inhérentes au fait que le protocole soit conçu pour mesurer à la fois le taux d'occupation et l'effet BOLD des molécules en une acquisition, et pour être effectué de nombreuses fois chez les animaux sans effet délétère. Toutefois les acquisitions étaient toutes réalisées dans des conditions strictement comparables, validant les différences observées entre F13640 et F15599. La principale perspective serait d'effectuer de nouvelles études avec un temps accru de mesure du signal IRMf, un protocole TEP optimisé permettant d'atteindre les conditions d'équilibre, et des mesures répétées pour chaque animal avec les mêmes doses afin d'augmenter la puissance statistique. De telles études pourraient permettre de révéler davantage de caractéristiques fonctionnelles de ces agonistes.

4.4 Résumé des principales caractéristiques fonctionnelles du F13640 et du F15599 *in vivo*

Pour conclure et résumer les principaux résultats, cette partie était dédiée à l'exploration en imagerie *in vivo* non invasive du phénomène de sélectivité fonctionnelle, à travers la comparaison de deux agonistes biaisés des récepteurs 5-HT_{1A} administrés aux mêmes doses. En utilisant de manière combinée différentes approches en TEP et en

pharmaco-IRM, nous avons pu mettre en évidence des différences importantes entre ces deux ligands, en lien avec les travaux précédemment publiés.

Chez le rat, les deux agonistes recrutent globalement des régions similaires mais avec une efficacité variable en IRM pharmacologique : le F15599 possède une efficacité plus importante pour provoquer une activation du cortex cingulaire, tandis que le F13640 active plus fortement le thalamus et inhibe plus fortement le tronc cérébral et le cervelet. De plus le F15599 n'agit pas au niveau du raphé à 0,16 mg/kg, en faveur d'une action préférentiellement postsynaptique à faibles doses. En conditions vigiles, les deux agonistes provoquent des modifications du métabolisme glucidique des neurones chez le rat avec des effets beaucoup plus prononcés du F13640, notamment au niveau du tronc cérébral, sauf dans le cortex frontal où le F15599 produit une activation supérieure.

Chez le chat, la proportion de récepteurs 5-HT_{1A} occupés par le F13640 est plus importante que le F15599 ; l'occupation n'augmente pas de manière comparable entre les régions en augmentant les doses d'agonistes. Ce point est important dans notre problématique de ciblage de régions spécifiques par les agonistes biaisés. De plus, le F13640 cible les récepteurs du raphé dorsal de manière notable à partir de 0,08 mg/kg et importante à 0,16 mg/kg, tandis qu'une fixation modeste du F15599 est observée à 0,16 mg/kg uniquement, également en faveur d'une préférence postsynaptique du F15599. Ces différences de fixation se traduisent par des patterns très différents en pharmaco-IRM, le F13640 produisant de multiples inhibitions dans les aires postsynaptiques et une activation importante dans le raphé dorsal, tandis que le F15599 possède un effet activateur au niveau du cortex cingulaire et peu d'effets sur le raphé dorsal.

CONCLUSION GENERALE

Un des enjeux majeurs de santé publique actuels concerne les pathologies affectant le système nerveux central, en particulier les maladies neurodégénératives et les troubles psychiatriques. Etant donné l'importance du système sérotoninergique et des récepteurs 5-HT_{1A} dans la physiopathologie de ces maladies, il apparaît crucial de développer des biomarqueurs permettant d'évaluer le fonctionnement de ces récepteurs *in vivo* chez le patient. Depuis quelques années, la possibilité de visualiser l'expression et la distribution des récepteurs 5-HT_{1A} en imagerie TEP à l'aide de radiotraceurs antagonistes a grandement contribué à la compréhension de leur rôle fonctionnel ; pouvoir évaluer l'état de couplage voire certaines voies de transduction spécifiques associées aux récepteurs par l'imagerie non-invasive devrait constituer une avancée tout aussi importante. Ces efforts s'inscrivent dans un modèle actuel qui tend vers une « médecine de précision », visant à prendre en considération la complexité des phénomènes biologiques et l'importance des variabilités interindividuelles, et nécessitant de pouvoir disposer de biomarqueurs aussi précis que possible.

Dans cette problématique, nous avons focalisé notre attention sur une série de molécules présentant des caractéristiques idéales pour l'investigation du couplage des récepteurs 5-HT_{1A} en imagerie. Ces molécules, parfois qualifiées de « super-agonistes » étant donné leur efficacité et leur affinité élevées, sont très spécifiques des récepteurs 5-HT_{1A} et leurs propriétés ont été finement caractérisées à la fois *in vitro* et *in vivo*, chez l'animal sain ou dans des modèles pathologiques. De plus, ces composés présentent un atome de fluor remplaçable par un fluor 18 sans modifier la structure chimique et sont donc directement utilisables en imagerie TEP.

Dans une première partie expérimentale nous avons évalué l'un de ces agonistes, le [¹⁸F]F13640, comme radioligand utilisable en imagerie TEP pour visualiser les récepteurs 5-HT_{1A} couplés. Nous en avons conclu que le [¹⁸F]F13640 présente des caractéristiques prometteuses pour une future utilisation chez l'humain, avec un ratio signal/bruit satisfaisant, une fixation spécifique et une possible sensibilité à la sérotonine endogène. Les propriétés *in vivo* du [¹⁸F]F13640 sont très différentes de celles des radiotraceurs antagonistes comme le [¹⁸F]MPPF, ce qui souligne le caractère inédit de l'imagerie des

récepteurs 5-HT_{1A} de haute affinité mais nécessitera probablement d'autres études précliniques de caractérisation du traceur.

La seconde partie expérimentale visait à évaluer l'intérêt de l'utilisation du [¹⁸F]F13640 en tant qu'agoniste dans un contexte pathologique, en plus de l'imagerie avec un radiotracer antagoniste. Dans cette étude postmortem, la fixation du [¹⁸F]F13640 a été comparée à la fixation du [¹⁸F]MPPF à différents stades de la maladie d'Alzheimer, chez les mêmes patients. Nous en avons conclu qu'une altération du couplage des récepteurs semble apparaître de manière précoce dans la maladie, tandis que la perte des récepteurs en eux-mêmes survient beaucoup plus tardivement. Ces observations autoradiographiques démontrent la complémentarité entre traceurs agonistes et antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A} dans un contexte pathologique et soutiennent l'utilisation future du [¹⁸F]F13640 en imagerie TEP chez l'humain.

Au cours de la dernière partie, nous avons étendu la problématique au phénomène d'agonisme biaisé, aussi appelé sélectivité fonctionnelle. Ce paradigme d'apparition assez récente en pharmacologie stipule que différents agonistes d'un même récepteur sont capables de stimuler préférentiellement différentes voies de signalisations liées à ce même récepteur. Etant donné que les récepteurs 5-HT_{1A} peuvent être couplés à des voies de transduction variables en fonction de leur localisation cérébrale, cela ouvre des perspectives prometteuses à la fois en termes de développement de biomarqueurs et de médicaments. Le potentiel de l'agonisme biaisé en thérapeutique est pour l'heure mal connu par manque de techniques non-invasives permettant de comparer différents ligands biaisés *in vivo*. Dans notre contexte, il s'avère que les agonistes évalués par notre équipe comme radiotraceurs sont également des agonistes biaisés stimulant préférentiellement des voies de transduction différentes de celles d'autres agonistes 5-HT_{1A}. Dans le cas du F15599 cela se traduit *in vivo* par une stimulation préférentielle des récepteurs postsynaptiques chez le rat, montrée par diverses expériences notamment en microdialyse et en électrophysiologie. Cette troisième partie avait pour objectif de comparer les propriétés fonctionnelles du F13640 et du F15599 en imagerie sur la base de ces précédents travaux. Nous pouvons en conclure que l'imagerie TEP tout comme la pharmaco-IRM permettent de comparer et distinguer différents ligands spécifiques d'un même récepteur en fonction de leur caractère biaisé, ce qui est très prometteur vis-à-vis du manque de recherche translationnelle sur le phénomène de

sélectivité fonctionnelle. L'imagerie TEP/pHIRM simultanée semble particulièrement adaptée à cette problématique.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdala, A. P., Bissonnette, J. M., Newman-Tancredi, A., 2014. Pinpointing brainstem mechanisms responsible for autonomic dysfunction in Rett syndrome: therapeutic perspectives for 5-HT_{1A} agonists. *Front Physiol* 5, 205.
- Abdala, A. P., Dutschmann, M., Bissonnette, J. M., Paton, J. F., 2010. Correction of respiratory disorders in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18208-18213.
- Adell, A., Celada, P., Abellan, M. T., Artigas, F., 2002. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Brain Res Rev* 39, 154-180.
- Ago, Y., Koyama, Y., Baba, A., Matsuda, T., 2003. Regulation by 5-HT_{1A} receptors of the *in vivo* release of 5-HT and DA in mouse frontal cortex. *Neuropharmacology* 45, 1050-1056.
- Akimova, E., Lanzenberger, R., Kasper, S., 2009. The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. *Biol Psychiatry* 66, 627-635.
- Alafuzoff, I., Arzberger, T., Al-Sarraj, S., Bodi, I., Bogdanovic, N., Braak, H., Bugiani, O., Del-Tredici, K., Ferrer, I., Gelpi, E., Giaccone, G., Graeber, M. B., Ince, P., Kamphorst, W., King, A., Korkolopoulou, P., Kovacs, G. G., Larionov, S., Meyronet, D., Monoranu, C., Parchi, P., Patsouris, E., Roggendorf, W., Seilhean, D., Tagliavini, F., Stadelmann, C., Streichenberger, N., Thal, D. R., Wharton, S. B., Kretschmar, H., 2008. Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Brain Pathol* 18, 484-496.
- Albert, P. R., Lemonde, S., 2004. 5-HT_{1A} receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *Neuroscientist* 10, 575-593.
- Albert, P. R., Vahid-Ansari, F., Luckhart, C., 2014. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT_{1A} receptor expression. *Front Behav Neurosci* 8, 199.
- Alexander, S. P., Benson, H. E., Faccenda, E., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Spedding, M., Peters, J. A., Harmar, A. J., Collaborators, C., 2013. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 170, 1459-1581.
- Altieri, S. C., Garcia-Garcia, A. L., Leonardo, E. D., Andrews, A. M., 2013. Rethinking 5-HT_{1A} receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. *ACS Chem Neurosci* 4, 72-83.
- Amilhon, B., Lopicard, E., Renoir, T., Mongeau, R., Popa, D., Poirel, O., Miot, S., Gras, C., Gardier, A. M., Gallego, J., Hamon, M., Lanfumey, L., Gasnier, B., Giros, B., El Mestikawy, S., 2010. VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety. *J Neurosci* 30, 2198-2210.
- Anderson, I. M., McKie, S., Elliott, R., Williams, S. R., Deakin, J. F., 2008. Assessing human 5-HT function *in vivo* with pharmacMRI. *Neuropharmacology* 55, 1029-1037.
- Andrade, R., Haj-Dahmane, S., 2013. Serotonin neuron diversity in the dorsal raphe. *ACS Chem Neurosci* 4, 22-25.
- Andrade, R., Huereca, D., Lyons, J. G., Andrade, E. M., McGregor, K. M., 2015. 5-HT_{1A} Receptor-Mediated Autoinhibition and the Control of Serotonergic Cell Firing. *ACS Chem Neurosci* 6, 1110-1115.

- Andree, B., Halldin, C., Pike, V. W., Gunn, R. N., Olsson, H., Farde, L., 2002. The PET radioligand [carbonyl-(11)C]desmethyl-WAY-100635 binds to 5-HT(1A) receptors and provides a higher radioactive signal than [carbonyl-(11)C]WAY-100635 in the human brain. *J Nucl Med* 43, 292-303.
- Arnt, J., Olsen, C. K., 2011. 5-HT₆ receptor ligands and their antipsychotic potential. *Int Rev Neurobiol* 96, 141-161.
- Arthurs, O. J., Boniface, S., 2002. How well do we understand the neural origins of the fMRI BOLD signal? *Trends Neurosci* 25, 27-31.
- Assie, M. B., Bardin, L., Auclair, A. L., Carilla-Durand, E., Depoortere, R., Koek, W., Kleven, M. S., Colpaert, F., Vacher, B., Newman-Tancredi, A., 2010. F15599, a highly selective post-synaptic 5-HT(1A) receptor agonist: in-vivo profile in behavioural models of antidepressant and serotonergic activity. *Int J Neuropsychopharmacol* 13, 1285-1298.
- Assie, M. B., Cosi, C., Koek, W., 1999. Correlation between low/high affinity ratios for 5-HT(1A) receptors and intrinsic activity. *Eur J Pharmacol* 386, 97-103.
- Assie, M. B., Lomenech, H., Ravailhe, V., Faucillon, V., Newman-Tancredi, A., 2006. Rapid desensitization of somatodendritic 5-HT_{1A} receptors by chronic administration of the high-efficacy 5-HT_{1A} agonist, F13714: a microdialysis study in the rat. *Br J Pharmacol* 149, 170-178.
- Assie, M. B., Ravailhe, V., Faucillon, V., Newman-Tancredi, A., 2005. Contrasting contribution of 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation to neurochemical profile of novel antipsychotics: frontocortical dopamine and hippocampal serotonin release in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 265-272.
- Avissar, S., Schreiber, G., 2006. The involvement of G proteins and regulators of receptor-G protein coupling in the pathophysiology, diagnosis and treatment of mood disorders. *Clin Chim Acta* 366, 37-47.
- Azmitia, E. C., Gannon, P. J., Kheck, N. M., Whitaker-Azmitia, P. M., 1996. Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology* 14, 35-46.
- Aznavour, N., Rbah, L., Leger, L., Buda, C., Sastre, J. P., Imhof, A., Charnay, Y., Zimmer, L., 2006. A comparison of *in vivo* and *in vitro* neuroimaging of 5-HT 1A receptor binding sites in the cat brain. *J Chem Neuroanat* 31, 226-232.
- Aznavour, N., Rbah, L., Riad, M., Reilhac, A., Costes, N., Descarries, L., Zimmer, L., 2006. A PET imaging study of 5-HT(1A) receptors in cat brain after acute and chronic fluoxetine treatment. *Neuroimage* 33, 834-842.
- Aznavour, N., Zimmer, L., 2007. [18F]MPPF as a tool for the *in vivo* imaging of 5-HT_{1A} receptors in animal and human brain. *Neuropharmacology* 52, 695-707.
- Baker, K. G., Halliday, G. M., Hornung, J. P., Geffen, L. B., Cotton, R. G., Tork, I., 1991. Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 42, 757-775.
- Baker, K. G., Halliday, G. M., Tork, I., 1990. Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* 301, 147-161.
- Bakker, A., Krauss, G. L., Albert, M. S., Speck, C. L., Jones, L. R., Stark, C. E., Yassa, M. A., Bassett, S. S., Shelton, A. L., Gallagher, M., 2012. Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron* 74, 467-474.

- Ballanger, B., Klinger, H., Eche, J., Lerond, J., Vallet, A. E., Le Bars, D., Tremblay, L., Sgambato-Faure, V., Broussolle, E., Thobois, S., 2012. Role of serotonergic 1A receptor dysfunction in depression associated with Parkinson's disease. *Mov Disord* 27, 84-89.
- Bantick, R. A., Montgomery, A. J., Bench, C. J., Choudhry, T., Malek, N., McKenna, P. J., Quedsted, D. J., Deakin, J. F., Grasby, P. M., 2004. A positron emission tomography study of the 5-HT_{1A} receptor in schizophrenia and during clozapine treatment. *J Psychopharmacol* 18, 346-354.
- Bantick, R. A., Rabiner, E. A., Hirani, E., de Vries, M. H., Hume, S. P., Grasby, P. M., 2004. Occupancy of agonist drugs at the 5-HT_{1A} receptor. *Neuropsychopharmacology* 29, 847-859.
- Bardin, L., Assie, M. B., Pelissou, M., Royer-Urios, I., Newman-Tancredi, A., Ribet, J. P., Sautel, F., Koek, W., Colpaert, F. C., 2005. Dual, hyperalgesic, and analgesic effects of the high-efficacy 5-hydroxytryptamine 1A (5-HT_{1A}) agonist F 13640 [(3-chloro-4-fluoro-phenyl)-[4-fluoro-4-[(5-methylpyridin-2-ylmethyl)-amino]-me thyl]piperidin-1-yl]methanone, fumaric acid salt]: relationship with 5-HT_{1A} receptor occupancy and kinetic parameters. *J Pharmacol Exp Ther* 312, 1034-1042.
- Bardin, L., Tarayre, J. P., Malfetes, N., Koek, W., Colpaert, F. C., 2003. Profound, non-opioid analgesia produced by the high-efficacy 5-HT(1A) agonist F 13640 in the formalin model of tonic nociceptive pain. *Pharmacology* 67, 182-194.
- Barnes, N. M., Sharp, T., 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083-1152.
- Barrett, K. E., Barman, S.M., Boitano, S., Brooks, H., 2012. *Ganong's Review of Medical Physiology*, 24th Edition, Ed. McGraw Hill.
- Baumgarten, H. G., Lachenmayer, L., 1972. 5,7-dihydroxytryptamine: improvement in chemical lesioning of indoleamine neurons in the mammalian brain. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 135, 399-414.
- Bayer, S.A, 1985. Hippocampal region. In : *The Rat Nervous System*, Vol 1, forebrain and midbrain (Paxinos, G., ed.), 335-352.
- Bayliss, D. A., Li, Y. W., Talley, E. M., 1997. Effects of serotonin on caudal raphe neurons: activation of an inwardly rectifying potassium conductance. *J Neurophysiol* 77, 1349-1361.
- Beck, S. G., Choi, K. C., List, T. J., 1992. Comparison of 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated hyperpolarization in CA1 and CA3 hippocampal pyramidal cells. *J Pharmacol Exp Ther* 263, 350-359.
- Becker, G., Bolbos, R., Costes, N., Redoute, J., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L., 2016. Selective serotonin 5-HT_{1A} receptor biased agonists elicit distinct brain activation patterns: a pharmacMRI study. *Sci Rep* 6, 26633.
- Becker, G., Streichenberger, N., Billard, T., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L., 2014. A postmortem study to compare agonist and antagonist 5-HT_{1A} receptor-binding sites in Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* 20, 930-934.
- Benhamu, B., Martin-Fontecha, M., Vazquez-Villa, H., Pardo, L., Lopez-Rodriguez, M. L., 2014. Serotonin 5-HT₆ receptor antagonists for the treatment of cognitive deficiency in Alzheimer's disease. *J Med Chem* 57, 7160-7181.
- Berg, K.A., Clarke, W.P, 2006. Development of functionally selective agonists as novel therapeutic agents. *Drug Discovery Today : Therapeutic Strategies* 3, 421-428.

- Berger, M., Gray, J. A., Roth, B. L., 2009. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 60, 355-366.
- Billard, T., Le Bars, D., Zimmer, L., 2014. PET radiotracers for molecular imaging of serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Curr Med Chem* 21, 70-81.
- Birn, R. M., Murphy, K., Handwerker, D. A., Bandettini, P. A., 2009. fMRI in the presence of task-correlated breathing variations. *Neuroimage* 47, 1092-1104.
- Bishop, C., Krolewski, D. M., Eskow, K. L., Barnum, C. J., Dupre, K. B., Deak, T., Walker, P. D., 2009. Contribution of the striatum to the effects of 5-HT_{1A} receptor stimulation in L-DOPA-treated hemiparkinsonian rats. *J Neurosci Res* 87, 1645-1658.
- Bjorklund, A., Baumgarten, H. G., Rensch, A., 1975. 5,7-Dihydroxytryptamine: improvement of its selectivity for serotonin neurons in the CNS by pretreatment with desipramine. *J Neurochem* 24, 833-835.
- Boadle-Biber, M. C., 1993. Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* 60, 1-15.
- Bockaert, J., Claeysen, S., Compan, V., Dumuis, A., 2008. 5-HT₄ receptors: history, molecular pharmacology and brain functions. *Neuropharmacology* 55, 922-931.
- Boekhoorn, K., Joels, M., Lucassen, P. J., 2006. Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiol Dis* 24, 1-14.
- Bohmker, K., Bordi, F., Meller, E., 1992. The effects of pertussis toxin on dopamine D₂ and serotonin 5-HT_{1A} autoreceptor-mediated inhibition of neurotransmitter synthesis: relationship to receptor reserve. *Neuropharmacology* 31, 451-459.
- Bonanno, G., Fassio, A., Severi, P., Ruelle, A., Raiteri, M., 1994. Fenfluramine releases serotonin from human brain nerve endings by a dual mechanism. *J Neurochem* 63, 1163-1166.
- Borg, J., 2008. Molecular imaging of the 5-HT_{1A} receptor in relation to human cognition. *Behav Brain Res* 195, 103-111.
- Borsini, F., Evans, K., Jason, K., Rohde, F., Alexander, B., Pollentier, S., 2002. Pharmacology of flibanserin. *CNS Drug Rev* 8, 117-142.
- Bortolozzi, A., Masana, M., Diaz-Mataix, L., Cortes, R., Scorza, M. C., Gingrich, J. A., Toth, M., Artigas, F., 2010. Dopamine release induced by atypical antipsychotics in prefrontal cortex requires 5-HT_{1A} receptors but not 5-HT_{2A} receptors. *Int J Neuropsychopharmacol* 13, 1299-1314.
- Bowen, D. M., Najlerahim, A., Procter, A. W., Francis, P. T., Murphy, E., 1989. Circumscribed changes of the cerebral cortex in neuropsychiatric disorders of later life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9504-9508.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259.
- Buritova, J., Berrichon, G., Cathala, C., Colpaert, F., Cussac, D., 2009. Region-specific changes in 5-HT_{1A} agonist-induced Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2 phosphorylation in rat brain: a quantitative ELISA study. *Neuropharmacology* 56, 350-361.
- Buritova, J., Larrue, S., Aliaga, M., Besson, J. M., Colpaert, F., 2005. Effects of the high-efficacy 5-HT_{1A} receptor agonist, F 13640 in the formalin pain model: a c-Fos study. *Eur J Pharmacol* 514, 121-130.

- Buritova, J., Tarayre, J. P., Besson, J. M., Colpaert, F., 2003. The novel analgesic and high-efficacy 5-HT_{1A} receptor agonist, F 13640 induces c-Fos protein expression in spinal cord dorsal horn neurons. *Brain Res* 974, 212-221.
- Burnet, P. W., Eastwood, S. L., Harrison, P. J., 1996. 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 15, 442-455.
- Burnet, P. W., Eastwood, S. L., Harrison, P. J., 1997. [³H]WAY-100635 for 5-HT_{1A} receptor autoradiography in human brain: a comparison with [³H]8-OH-DPAT and demonstration of increased binding in the frontal cortex in schizophrenia. *Neurochem Int* 30, 565-574.
- Burnet, P. W., Eastwood, S. L., Lacey, K., Harrison, P. J., 1995. The distribution of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNA in human brain. *Brain Res* 676, 157-168.
- Buxton, R. B., 2013. The physics of functional magnetic resonance imaging (fMRI). *Rep Prog Phys* 76, 096601.
- Canese, R., Marco, E. M., De Pasquale, F., Podo, F., Laviola, G., Adriani, W., 2011. Differential response to specific 5-HT₇ versus whole-serotonergic drugs in rat forebrains: a pHMRI study. *Neuroimage* 58, 885-894.
- Carlsson, A., Falck, B., Hillarp, N. A., 1962. Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiol Scand Suppl* 56, 1-28.
- Carson, R. E., 2000. PET physiological measurements using constant infusion. *Nucl Med Biol* 27, 657-660.
- Casanova, R., Srikanth, R., Baer, A., Laurienti, P. J., Burdette, J. H., Hayasaka, S., Flowers, L., Wood, F., Maldjian, J. A., 2007. Biological parametric mapping: A statistical toolbox for multimodality brain image analysis. *Neuroimage* 34, 137-143.
- Casanovas, J. M., Berton, O., Celada, P., Artigas, F., 2000. *In vivo* actions of the selective 5-HT_{1A} receptor agonist BAY x 3702 on serotonergic cell firing and release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362, 248-254.
- Chaput, Y., Blier, P., de Montigny, C., 1986. *In vivo* electrophysiological evidence for the regulatory role of autoreceptors on serotonergic terminals. *J Neurosci* 6, 2796-2801.
- Charnay, Y., Leger, L., Vallet, P.G., Greggio, B., Hof, P.R., Cespuglio, R., Jouvret, M., Bouras, C., 1997. Mapping of 5-HT_{1a} receptor binding sites in the feline brain : A quantitative autoradiographic study using [³H]8-OH-DPAT. *Biogenic Amines* 13, 217-232.
- Charnay, Y., Leger, L., 2010. Brain serotonergic circuitries. *Dialogues Clin Neurosci* 12, 471-487.
- Chemel, B. R., Roth, B. L., Armbruster, B., Watts, V. J., Nichols, D. E., 2006. WAY-100635 is a potent dopamine D₄ receptor agonist. *Psychopharmacology (Berl)* 188, 244-251.
- Chen, Y. C., Galpern, W. R., Brownell, A. L., Matthews, R. T., Bogdanov, M., Isacson, O., Keltner, J. R., Beal, M. F., Rosen, B. R., Jenkins, B. G., 1997. Detection of dopaminergic neurotransmitter activity using pharmacologic MRI: correlation with PET, microdialysis, and behavioral data. *Magn Reson Med* 38, 389-398.
- Cheng, L. L., Wang, S. J., Gean, P. W., 1998. Serotonin depresses excitatory synaptic transmission and depolarization-evoked Ca²⁺ influx in rat basolateral amygdala via 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Neurosci* 10, 2163-2172.

- Chilmonczyk, Z., Bojarski, A. J., Pilc, A., Sylte, I., 2015. Functional Selectivity and Antidepressant Activity of Serotonin 1A Receptor Ligands. *Int J Mol Sci* 16, 18474-18506.
- Christian, B. T., Wooten, D. W., Hillmer, A. T., Tudorascu, D. L., Converse, A. K., Moore, C. F., Ahlers, E. O., Barnhart, T. E., Kalin, N. H., Barr, C. S., Schneider, M. L., 2013. Serotonin transporter genotype affects serotonin 5-HT_{1A} binding in primates. *J Neurosci* 33, 2512-2516.
- Clarke, W. P., Yocca, F. D., Maayani, S., 1996. Lack of 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther* 277, 1259-1266.
- Coccaro, E. F., Lee, R., 2010. Cerebrospinal fluid 5-hydroxyindolacetic acid and homovanillic acid: reciprocal relationships with impulsive aggression in human subjects. *J Neural Transm (Vienna)* 117, 241-248.
- Colpaert, F. C., Deseure, K., Stinus, L., Adriaensen, H., 2006. High-efficacy 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation counteracts opioid hyperalldynia and affective conditioning. *J Pharmacol Exp Ther* 316, 892-899.
- Colpaert, F. C., Tarayre, J. P., Koek, W., Pauwels, P. J., Bardin, L., Xu, X. J., Wiesenfeld-Hallin, Z., Cosi, C., Carilla-Durand, E., Assie, M. B., Vacher, B., 2002. Large-amplitude 5-HT_{1A} receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia. *Neuropharmacology* 43, 945-958.
- Cooper, D. M., Londos, C., 1982. GTP-dependent stimulation and inhibition of adenylyl cyclase. *Horiz Biochem Biophys* 6, 309-333.
- Corcoran, A. E., Hodges, M. R., Wu, Y., Wang, W., Wylie, C. J., Deneris, E. S., Richerson, G. B., 2009. Medullary serotonin neurons and central CO₂ chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol* 168, 49-58.
- Costes, N., Merlet, I., Ostrowsky, K., Faillenot, I., Lavenne, F., Zimmer, L., Ryvlin, P., Le Bars, D., 2005. A 18F-MPPF PET normative database of 5-HT_{1A} receptor binding in men and women over aging. *J Nucl Med* 46, 1980-1989.
- Costes, N., Zimmer, L., Reilhac, A., Lavenne, F., Ryvlin, P., Le Bars, D., 2007. Test-retest reproducibility of 18F-MPPF PET in healthy humans: a reliability study. *J Nucl Med* 48, 1279-1288.
- Cross, A. J., Slater, P., Perry, E. K., Perry, R. H., 1988. An autoradiographic analysis of serotonin receptors in human temporal cortex: Changes in Alzheimer-type dementia. *Neurochem Int* 13, 89-96.
- Dahlstrom, A., Fuxe, K., 1964. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20, 398-399.
- DaRocha-Souto, B., Scotton, T. C., Coma, M., Serrano-Pozo, A., Hashimoto, T., Sereno, L., Rodriguez, M., Sanchez, B., Hyman, B. T., Gomez-Isla, T., 2011. Brain oligomeric beta-amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 70, 360-376.
- de Boer, S. F., Newman-Tancredi, A., 2016. Anti-aggressive effects of the selective high-efficacy 'biased' 5-HT(1)A receptor agonists F15599 and F13714 in male WTG rats. *Psychopharmacology (Berl)* 233, 937-947.
- de Figueiredo, E. H., Borgonovi, A. F., Doring, T. M., 2011. Basic concepts of MR imaging, diffusion MR imaging, and diffusion tensor imaging. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 19, 1-22.
- de Flores, R., La Joie, R., Chetelat, G., 2015. Structural imaging of hippocampal subfields in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 309, 29-50.

- De Vivo, M., Maayani, S., 1986. Characterization of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 238, 248-253.
- DeKosky, S. T., Ikonomic, M. D., Styren, S. D., Beckett, L., Wisniewski, S., Bennett, D. A., Cochran, E. J., Kordower, J. H., Mufson, E. J., 2002. Upregulation of choline acetyltransferase activity in hippocampus and frontal cortex of elderly subjects with mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 51, 145-155.
- Deleye, S., Verhaeghe, J., wyffels, L., Dedeurwaerdere, S., Stroobants, S., Staelens, S., 2014. Towards a reproducible protocol for repetitive and semi-quantitative rat brain imaging with (18) F-FDG: exemplified in a memantine pharmacological challenge. *Neuroimage* 96, 276-287.
- Demarquay, G., Lothe, A., Royet, J. P., Costes, N., Mick, G., Mauguier, F., Ryvlin, P., 2011. Brainstem changes in 5-HT_{1A} receptor availability during migraine attack. *Cephalalgia* 31, 84-94.
- Depoortere, R., Auclair, A. L., Bardin, L., Colpaert, F. C., Vacher, B., Newman-Tancredi, A., 2010. F15599, a preferential post-synaptic 5-HT_{1A} receptor agonist: activity in models of cognition in comparison with reference 5-HT_{1A} receptor agonists. *Eur Neuropsychopharmacol* 20, 641-654.
- Derkach, V., Surprenant, A., North, R. A., 1989. 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Nature* 339, 706-709.
- Descarries, L., Mechawar, N., 2000. Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Prog Brain Res* 125, 27-47.
- Descarries, L., Riad, M., 2012. Effects of the antidepressant fluoxetine on the subcellular localization of 5-HT_{1A} receptors and SERT. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 2416-2425.
- Deseure, K., Koek, W., Adriaensen, H., Colpaert, F. C., 2003. Continuous administration of the 5-hydroxytryptamine_{1A} agonist (3-Chloro-4-fluoro-phenyl)-[4-fluoro-4-[[[(5-methyl-pyridin-2-ylmethyl)-amino]-methyl]piperidin-1-yl]-methadone (F 13640) attenuates allodynia-like behavior in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 505-514.
- Detre, J. A., Rao, H., Wang, D. J., Chen, Y. F., Wang, Z., 2012. Applications of arterial spin labeled MRI in the brain. *J Magn Reson Imaging* 35, 1026-1037.
- Di Chiara, G., Valentini, V., Fenu, S., 2011. Behavioral and neurochemical pharmacology of 5-HT₆ receptors related to reward and reinforcement. *Int Rev Neurobiol* 96, 111-139.
- Diaz-Mataix, L., Artigas, F., Celada, P., 2006. Activation of pyramidal cells in rat medial prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area by a 5-HT_{1A} receptor agonist. *Eur Neuropsychopharmacol* 16, 288-296.
- Diaz-Mataix, L., Scorza, M. C., Bortolozzi, A., Toth, M., Celada, P., Artigas, F., 2005. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. *J Neurosci* 25, 10831-10843.
- Dickerson, B. C., Salat, D. H., Bates, J. F., Atiya, M., Killiany, R. J., Greve, D. N., Dale, A. M., Stern, C. E., Blacker, D., Albert, M. S., Sperling, R. A., 2004. Medial temporal lobe function and structure in mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 56, 27-35.
- Dickerson, B. C., Salat, D. H., Greve, D. N., Chua, E. F., Rand-Giovannetti, E., Rentz, D. M., Bertram, L., Mullin, K., Tanzi, R. E., Blacker, D., Albert, M. S., Sperling, R. A., 2005. Increased hippocampal activation in mild cognitive impairment compared to normal aging and AD. *Neurology* 65, 404-411.

- Donovan, M. H., Yazdani, U., Norris, R. D., Games, D., German, D. C., Eisch, A. J., 2006. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 495, 70-83.
- Drevets, W. C., Thase, M. E., Moses-Kolko, E. L., Price, J., Frank, E., Kupfer, D. J., Mathis, C., 2007. Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nucl Med Biol* 34, 865-877.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Dekosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P. J., Scheltens, P., 2007. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6, 734-746.
- Duncan, J. R., Paterson, D. S., Hoffman, J. M., Mokler, D. J., Borenstein, N. S., Belliveau, R. A., Krous, H. F., Haas, E. A., Stanley, C., Nattie, E. E., Trachtenberg, F. L., Kinney, H. C., 2010. Brainstem serotonergic deficiency in sudden infant death syndrome. *JAMA* 303, 430-437.
- Dupre, K. B., Eskow, K. L., Barnum, C. J., Bishop, C., 2008. Striatal 5-HT_{1A} receptor stimulation reduces D1 receptor-induced dyskinesia and improves movement in the hemiparkinsonian rat. *Neuropharmacology* 55, 1321-1328.
- Dutschmann, M., Waki, H., Manzke, T., Simms, A. E., Pickering, A. E., Richter, D. W., Paton, J. F., 2009. The potency of different serotonergic agonists in counteracting opioid evoked cardiorespiratory disturbances. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 2611-2623.
- Duvernoy, H.M., Cattin, F., Fatterpekar, G., Naidich, T., Raybaud, C., Risold, P.Y., Salvolini, U., Scarabino, T., 2005. *The Human Hippocampus*, third ed. Springer.
- Egerton, A., Mehta, M. A., Montgomery, A. J., Lappin, J. M., Howes, O. D., Reeves, S. J., Cunningham, V. J., Grasby, P. M., 2009. The dopaminergic basis of human behaviors: A review of molecular imaging studies. *Neurosci Biobehav Rev* 33, 1109-1132.
- el Mestikawy, S., Riad, M., Laporte, A. M., Verge, D., Daval, G., Gozlan, H., Hamon, M., 1990. Production of specific anti-rat 5-HT_{1A} receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide. *Neurosci Lett* 118, 189-192.
- Elhwuegi, A. S., 2004. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28, 435-451.
- Erspamer, V. Vialli, M., 1937. Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Boll Soc Med-chir Pavia* 51,357-363.
- Erspamer, V., Asero, B., 1952. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169, 800-801.
- Ettrup, A., Svarer, C., McMahon, B., da Cunha-Bang, S., Lehel, S., Moller, K., Dyssegaard, A., Ganz, M., Beliveau, V., Jorgensen, L. M., Gillings, N., Knudsen, G. M., 2016. Serotonin 2A receptor agonist binding in the human brain with [(11)C]Cimbi-36: Test-retest reproducibility and head-to-head comparison with the antagonist [(18)F]altanserin. *Neuroimage* 130, 167-174.
- Fabbrini, G., Brotchie, J. M., Grandas, F., Nomoto, M., Goetz, C. G., 2007. Levodopa-induced dyskinesias. *Mov Disord* 22, 1379-1389; quiz 1523.

- Fargin, A., Raymond, J. R., Lohse, M. J., Kobilka, B. K., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., 1988. The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature* 335, 358-360.
- Fernstrom, J. D., 1977. Effects on the diet on brain neurotransmitters. *Metabolism* 26, 207-223.
- Filip, M., Bader, M., 2009. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep* 61, 761-777.
- Finnema, S. J., Scheinin, M., Shahid, M., Lehto, J., Borroni, E., Bang-Andersen, B., Sallinen, J., Wong, E., Farde, L., Halldin, C., Grimwood, S., 2015. Application of cross-species PET imaging to assess neurotransmitter release in brain. *Psychopharmacology (Berl)* 232, 4129-4157.
- Francis, P.T., Pangalos, M.N., Pearson, R.C., Middlemiss, D.N., Stratmann, G.C., Bowen, D.M., 1992. 5-Hydroxytryptamine_{1A} but not 5-hydroxytryptamine₂ receptors are enriched on neocortical pyramidal neurones destroyed by intrastriatal volkensin. *J Pharmacol Exp Ther* 261, 1273-1281.
- Freret, T., Lelong-Boulouard, V., Lecouflet, P., Hamidouche, K., Dauphin, F., Boulouard, M., 2017. Co-modulation of an allosteric modulator of nicotinic receptor-cholinesterase inhibitor (galantamine) and a 5-HT₄ receptor agonist (RS-67333): effect on scopolamine-induced memory deficit in the mouse. *Psychopharmacology* 234, 2365-2374.
- Fujio, M., Nagata, S., Kawamura, K., Sugiyama, N., Tanaka, H., Uno, K., Ishiwata, K., 2002. Synthesis and evaluation of (11)C-labeled (S)-N-[[1-(2-phenylethyl) pyrrolidin-2-yl]methyl]-3-methylthiobenzamide as a PET 5-HT(1A) receptor ligand. *Nucl Med Biol* 29, 657-663.
- Gaddum, J. H., Picarelli, Z. P., 1957. Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother* 12, 323-328.
- Ganz, M., Feng, L., Hansen, H. D., Beliveau, V., Svarer, C., Knudsen, G. M., Greve, D. N., 2017. Cerebellar heterogeneity and its impact on PET data quantification of 5-HT receptor radioligands. *J Cereb Blood Flow Metab*, 271678X16686092.
- Garcia-Jimenez, A., Cowburn, R. F., Ohm, T. G., Lasn, H., Winblad, B., Bogdanovic, N., Fastbom, J., 2002. Loss of stimulatory effect of guanosine triphosphate on [(35)S]GTPgammaS binding correlates with Alzheimer's disease neurofibrillary pathology in entorhinal cortex and CA1 hippocampal subfield. *J Neurosci Res* 67, 388-398.
- Garnovskaya, M. N., van Biesen, T., Hawe, B., Casanas Ramos, S., Lefkowitz, R. J., Raymond, J. R., 1996. Ras-dependent activation of fibroblast mitogen-activated protein kinase by 5-HT_{1A} receptor via a G protein beta gamma-subunit-initiated pathway. *Biochemistry* 35, 13716-13722.
- Gaspar, P., Lillesaar, C., 2012. Probing the diversity of serotonin neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 2382-2394.
- Gershon, M. D., Tack, J., 2007. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 132, 397-414.
- Gettys, T. W., Fields, T. A., Raymond, J. R., 1994. Selective activation of inhibitory G-protein alpha-subunits by partial agonists of the human 5-HT_{1A} receptor. *Biochemistry* 33, 4283-4290.
- Ghanouni, P., Gryczynski, Z., Steenhuis, J. J., Lee, T. W., Farrens, D. L., Lakowicz, J. R., Kobilka, B. K., 2001. Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 276, 24433-24436.

- Giannoni, P., Gaven, F., de Bundel, D., Baranger, K., Marchetti-Gauthier, E., Roman, F.S., Valjent, E., Marin, P., Bockaert, J., Rivera, S., Claeysen, S., 2013. Early administration of RS 67333, a specific 5-HT₄ receptor agonist, prevents amyloidogenesis and behavioral deficits in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 24, 96.
- Ginovart, N., 2005. Imaging the dopamine system with *in vivo* [¹¹C]raclopride displacement studies: understanding the true mechanism. *Mol Imaging Biol* 7, 45-52.
- Ginovart, N., Galineau, L., Willeit, M., Mizrahi, R., Bloomfield, P. M., Seeman, P., Houle, S., Kapur, S., Wilson, A. A., 2006. Binding characteristics and sensitivity to endogenous dopamine of [¹¹C]-(+)-PHNO, a new agonist radiotracer for imaging the high-affinity state of D₂ receptors *in vivo* using positron emission tomography. *J Neurochem* 97, 1089-1103.
- Ginovart, N., Hassoun, W., Le Bars, D., Weissmann, D., Leviel, V., 2000. *In vivo* characterization of p-[(¹⁸F)MPPF], a fluoro analog of WAY-100635 for visualization of 5-HT_{1A} receptors. *Synapse* 35, 192-200.
- Gonzalez-Maeso, J., Torre, I., Rodriguez-Puertas, R., Garcia-Sevilla, J. A., Guimon, J., Meana, J. J., 2002. Effects of age, postmortem delay and storage time on receptor-mediated activation of G-proteins in human brain. *Neuropsychopharmacology* 26, 468-478.
- Gozlan, H., Thibault, S., Laporte, A. M., Lima, L., Hamon, M., 1995. The selective 5-HT_{1A} antagonist radioligand [³H]WAY 100635 labels both G-protein-coupled and free 5-HT_{1A} receptors in rat brain membranes. *Eur J Pharmacol* 288, 173-186.
- Gray, J. A., Roth, B. L., 2001. Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT_{2A} receptors by agonists and antagonists. *Brain Res Bull* 56, 441-451.
- Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S., Hen, R., 2002. Serotonin_{1A} receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416, 396-400.
- Haensel, J. X., Spain, A., Martin, C., 2015. A systematic review of physiological methods in rodent pharmacological MRI studies. *Psychopharmacology (Berl)* 232, 489-499.
- Hajos, M., Hajos-Korcsok, E., Sharp, T., 1999. Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT_{1A} receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br J Pharmacol* 126, 1741-1750.
- Hajos, M., Richards, C. D., Szekely, A. D., Sharp, T., 1998. An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience* 87, 95-108.
- Hall, H., Lundkvist, C., Halldin, C., Farde, L., Pike, V. W., McCarron, J. A., Fletcher, A., Cliffe, I. A., Barf, T., Wikstrom, H., Sedvall, G., 1997. Autoradiographic localization of 5-HT_{1A} receptors in the post-mortem human brain using [³H]WAY-100635 and [¹¹C]way-100635. *Brain Res* 745, 96-108.
- Hall, M. D., el Mestikawy, S., Emerit, M. B., Pichat, L., Hamon, M., Gozlan, H., 1985. [³H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin binding to pre- and postsynaptic 5-hydroxytryptamine sites in various regions of the rat brain. *J Neurochem* 44, 1685-1696.
- Halliday, G. M., McCann, H. L., Pamphlett, R., Brooks, W. S., Creasey, H., McCusker, E., Cotton, R. G., Broe, G. A., Harper, C. G., 1992. Brain stem serotonin-synthesizing neurons in Alzheimer's disease: a clinicopathological correlation. *Acta Neuropathol* 84, 638-650.

- Hamon, M., Gozlan, H., el Mestikawy, S., Emerit, M. B., Bolanos, F., Schechter, L., 1990. The central 5-HT_{1A} receptors: pharmacological, biochemical, functional, and regulatory properties. *Ann N Y Acad Sci* 600, 114-129; discussion 129-131.
- Hannon, J., Hoyer, D., 2008. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 195, 198-213.
- Heisler, L. K., Chu, H. M., Brennan, T. J., Danao, J. A., Bajwa, P., Parsons, L. H., Tecott, L. H., 1998. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15049-15054.
- Hendry, N., Christie, I., Rabiner, E. A., Laruelle, M., Watson, J., 2011. *In vitro* assessment of the agonist properties of the novel 5-HT_{1A} receptor ligand, CUMI-101 (MMP), in rat brain tissue. *Nucl Med Biol* 38, 273-277.
- Hensler, J. G., 2006. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev* 30, 203-214.
- Hercend, C., Hannon, J., Hoyer, D., 2012. Les récepteurs sérotoninergiques. Spreux-Varoquaux, O. *Sérotonine: Aspects biologiques et cliniques*. Lavoisier ; p. 13-56.
- Herholz, K., 2010. Cerebral glucose metabolism in preclinical and prodromal Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 10, 1667-1673.
- Hertz, L., Rothman, D.L., Li, B., Peng, L., 2015. Chronic SSRI stimulation of astrocytic 5-HT_{2B} receptors change multiple gene expressions/editings and metabolism of glutamate, glucose and glycogen: a potential paradigm shift. *Front Behav Neurosci* 9,25.
- Heusler, P., Palmier, C., Tardif, S., Bernois, S., Colpaert, F. C., Cussac, D., 2010. [(3)H]-F13640, a novel, selective and high-efficacy serotonin 5-HT_{1A} receptor agonist radioligand. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 382, 321-330.
- Heusler, P., Pauwels, P. J., Wurch, T., Newman-Tancredi, A., Tytgat, J., Colpaert, F. C., Cussac, D., 2005. Differential ion current activation by human 5-HT_{1A} receptors in *Xenopus* oocytes: evidence for agonist-directed trafficking of receptor signalling. *Neuropharmacology* 49, 963-976.
- Hirani, E., Opacka-Juffry, J., Gunn, R., Khan, I., Sharp, T., Hume, S., 2000. Pindolol occupancy of 5-HT_{1A} receptors measured *in vivo* using small animal positron emission tomography with carbon-11 labeled WAY 100635. *Synapse* 36, 330-341.
- Hirst, W. D., Cheung, N. Y., Rattray, M., Price, G. W., Wilkin, G. P., 1998. Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes, without functional coupling of 5-HT₁ receptor subtypes to adenylyl cyclase. *Brain Res Mol Brain Res* 61, 90-99.
- Hirvonen, J., Kajander, J., Allonen, T., Oikonen, V., Nagren, K., Hietala, J., 2007. Measurement of serotonin 5-HT_{1A} receptor binding using positron emission tomography and [carbonyl-(11)C]WAY-100635-considerations on the validity of cerebellum as a reference region. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 185-195.
- Hjorth, S., Suchowski, C. S., Galloway, M. P., 1995. Evidence for 5-HT autoreceptor-mediated, nerve impulse-independent, control of 5-HT synthesis in the rat brain. *Synapse* 19, 170-176.
- Holbrook, J. D., Gill, C. H., Zebda, N., Spencer, J. P., Leyland, R., Rance, K. H., Trinh, H., Balmer, G., Kelly, F. M., Yusaf, S. P., Courtenay, N., Luck, J., Rhodes, A., Modha, S., Moore, S. E., Sanger, G. J., Gunthorpe, M. J., 2009. Characterisation of 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} and 5-HT_{3E} receptor subunits: evolution, distribution and function. *J Neurochem* 108, 384-396.

- Hornung, J. P., 2003. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat* 26, 331-343.
- Houston, G. C., Papadakis, N. G., Carpenter, T. A., Hall, L. D., Mukherjee, B., James, M. F., Huang, C. L., 2001. Mapping of brain activation in response to pharmacological agents using fMRI in the rat. *Magn Reson Imaging* 19, 905-919.
- Hoyer, D., 1990. Serotonin 5-HT₃, 5-HT₄, and 5-HT-M receptors. *Neuropsychopharmacology* 3, 371-383.
- Hoyer, D., 2017. 5-HT Receptor Nomenclature: Naming Names, Does It Matter? A Tribute to Maurice Rapport. *ACS Chem Neurosci* 8, 908-919.
- Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., Saxena, P. R., Humphrey, P. P., 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46, 157-203.
- Hume, S., Hirani, E., Opacka-Juffry, J., Myers, R., Townsend, C., Pike, V., Grasby, P., 2001. Effect of 5-HT on binding of [(11)C] WAY 100635 to 5-HT(1A) receptors in rat brain, assessed using *in vivo* microdialysis and PET after fenfluramine. *Synapse* 41, 150-159.
- Hume, S. P., Gunn, R. N., Jones, T., 1998. Pharmacological constraints associated with positron emission tomographic scanning of small laboratory animals. *Eur J Nucl Med* 25, 173-176.
- Hwang, D., Huang, Y., Ngo, K., Savenkova, L., Guo, N., Zhu, Z., Laruelle, M., 2001. Preparation and evaluation of [11C]-labeled 5HT1A agonist: (R)-10-Methyl-11-hydroxyaporphine. *J Label Compd Radiopharm* 44, S176-S178.
- Hwang, D., Ngo, K., Savenkova, L., Huang, Y., Guo, N., Zhu, Z., Laruelle, M., 2001. Preparation and evaluation of [F-18]-labeled 5-HT1A Agonist: 1-[2-(4-[F-18]Fluorobenzamido)-1-Ethyl]-4-(1,2,3,4-Tetrahydronaphth-1-yl)-Piperidine (FBP). *J Label Compd Radiopharm* 44, S179-S181.
- Iderberg, H., McCreary, A. C., Varney, M. A., Cenci, M. A., Newman-Tancredi, A., 2015. Activity of serotonin 5-HT(1A) receptor 'biased agonists' in rat models of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. *Neuropharmacology* 93, 52-67.
- Iderberg, H., McCreary, A. C., Varney, M. A., Kleven, M. S., Koek, W., Bardin, L., Depoortere, R., Cenci, M. A., Newman-Tancredi, A., 2015. NLX-112, a novel 5-HT1A receptor agonist for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia: Behavioral and neurochemical profile in rat. *Exp Neurol* 271, 335-350.
- Ishibashi, T., Ohno, Y., 2004. Antiparkinsonian actions of a selective 5-HT1A agonist, tandospirone, in rats. *Biog Amines* 8, 329-338.
- Jacobs, B. L., Azmitia, E. C., 1992. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72, 165-229.
- Jagoda, E. M., Lang, L., Tokugawa, J., Simmons, A., Ma, Y., Contoreggi, C., Kiesewetter, D., Eckelman, W. C., 2006. Development of 5-HT1A receptor radioligands to determine receptor density and changes in endogenous 5-HT. *Synapse* 59, 330-341.
- Jenkins, B. G., 2012. Pharmacologic magnetic resonance imaging (phMRI): imaging drug action in the brain. *Neuroimage* 62, 1072-1085.

Jiang, M., Gold, M. S., Boulay, G., Spicher, K., Peyton, M., Brabet, P., Srinivasan, Y., Rudolph, U., Ellison, G., Birnbaumer, L., 1998. Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3269-3274.

Jiang, M., Spicher, K., Boulay, G., Martin-Requero, A., Dye, C. A., Rudolph, U., Birnbaumer, L., 2002. Mouse gene knockout and knockin strategies in application to alpha subunits of Gi/Go family of G proteins. *Methods Enzymol* 344, 277-298.

Jin, K., Galvan, V., Xie, L., Mao, X. O., Gorostiza, O. F., Bredesen, D. E., Greenberg, D. A., 2004. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw,Ind}) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13363-13367.

Jin, K., Peel, A. L., Mao, X. O., Xie, L., Cottrell, B. A., Henshall, D. C., Greenberg, D. A., 2004. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 343-347.

Jin, L. Q., Wang, H. Y., Friedman, E., 2001. Stimulated D(1) dopamine receptors couple to multiple Galpha proteins in different brain regions. *J Neurochem* 78, 981-990.

Johnson, K. W., Schaus, J. M., Durkin, M. M., Audia, J. E., Kaldor, S. W., Flaugh, M. E., Adham, N., Zgombick, J. M., Cohen, M. L., Branchek, T. A., Phebus, L. A., 1997. 5-HT_{1F} receptor agonists inhibit neurogenic dural inflammation in guinea pigs. *Neuroreport* 8, 2237-2240.

Johnson, R. G., Fiorella, D., Winter, J. C., Rabin, R. A., 1997. [³H]8-OH-DPAT labels a 5-HT site coupled to inhibition of phosphoinositide hydrolysis in the dorsal raphe. *Eur J Pharmacol* 329, 99-106.

Jones, B. J., Blackburn, T. P., 2002. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav* 71, 555-568.

Katayama, J., Yakushiji, T., Akaike, N., 1997. Characterization of the K⁺ current mediated by 5-HT_{1A} receptor in the acutely dissociated rat dorsal raphe neurons. *Brain Res* 745, 283-292.

Kelly, P. A., Davis, C. J., Goodwin, G. M., 1988. Differential patterns of local cerebral glucose utilization in response to 5-hydroxytryptamine agonists. *Neuroscience* 25, 907-915.

Kenakin, T., 1995. Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* 16, 232-238.

Kenakin, T., 2014. What is pharmacological 'affinity'? Relevance to biased agonism and antagonism. *Trends Pharmacol Sci* 35, 434-441.

Kenakin, T., 2015. New Lives for Seven Transmembrane Receptors as Drug Targets. *Trends Pharmacol Sci* 36, 705-706.

Kenakin, T., Christopoulos, A., 2013. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov* 12, 205-216.

Kepe, V., Barrio, J. R., Huang, S. C., Ercoli, L., Siddarth, P., Shoghi-Jadid, K., Cole, G. M., Satyamurthy, N., Cummings, J. L., Small, G. W., Phelps, M. E., 2006. Serotonin 1A receptors in the living brain of Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 702-707.

Kerr, C. W., Bishop, G. A., 1992. The physiological effects of serotonin are mediated by the 5HT_{1A} receptor in the cat's cerebellar cortex. *Brain Res* 591, 253-260.

Kia, H. K., Brisorgueil, M. J., Daval, G., Langlois, X., Hamon, M., Verge, D., 1996. Serotonin_{1A} receptors are expressed by a subpopulation of cholinergic neurons in the rat medial septum and diagonal band of Broca--a double immunocytochemical study. *Neuroscience* 74, 143-154.

- Kia, H. K., Brisorgueil, M. J., Hamon, M., Calas, A., Verge, D., 1996. Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in the rat brain. *J Neurosci Res* 46, 697-708.
- Kia, H. K., Miquel, M. C., Brisorgueil, M. J., Daval, G., Riad, M., El Mestikawy, S., Hamon, M., Verge, D., 1996. Immunocytochemical localization of serotonin_{1A} receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 365, 289-305.
- Kinney, H. C., Richerson, G. B., Dymecki, S. M., Darnall, R. A., Nattie, E. E., 2009. The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. *Annu Rev Pathol* 4, 517-550.
- Kishi, T., Meltzer, H.Y., Matsuda, Y., Iwata, N., 2014. Azapirone 5-HT_{1A} receptor partial agonist treatment for major depressive disorder: systematic review and meta-analysis. *Psychol Med* 44, 2255-69.
- Kobilka, B. K., Frielle, T., Collins, S., Yang-Feng, T., Kobilka, T. S., Francke, U., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., 1987. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* 329, 75-79.
- Kohler, C., Steinbusch, H., 1982. Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience* 7, 951-975.
- Kosofsky, B. E., Molliver, M. E., 1987. The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* 1, 153-168.
- Kovoor, A., Lester, H. A., 2002. Gi Irks GIRKs. *Neuron* 33, 6-8.
- Kumar, J. S., Mann, J. J., 2007. PET tracers for 5-HT_{1A} receptors and uses thereof. *Drug Discov Today* 12, 748-756.
- Kumar, J. S., Mann, J. J., 2014. PET tracers for serotonin receptors and their applications. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 14, 96-112.
- Kumar, J. S., Prabhakaran, J., Majo, V. J., Milak, M. S., Hsiung, S. C., Tamir, H., Simpson, N. R., Van Heertum, R. L., Mann, J. J., Parsey, R. V., 2007. Synthesis and *in vivo* evaluation of a novel 5-HT_{1A} receptor agonist radioligand [O-methyl- ¹¹C]2-(4-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)butyl)-4-methyl-1,2,4-triazine-3,5(2H,4H)dione in nonhuman primates. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34, 1050-1060.
- Kung, H. F., Stevenson, D. A., Zhuang, Z. P., Kung, M. P., Frederick, D., Hurt, S. D., 1996. New 5-HT_{1A} receptor antagonist: [³H]p-MPPF. *Synapse* 23, 344-346.
- Kung, M. P., Zhuang, Z. P., Frederick, D., Kung, H. F., 1994. *In vivo* binding of [123I]4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-(N-2"-pyridinyl)- p-iodobenzamido-]ethyl-piperazine, p-MPPI, to 5-HT_{1A} receptors in rat brain. *Synapse* 18, 359-366.
- Kushwaha, N., Harwood, S.C., Wilson, A.M., Berger, M., Tecott, L.H., Roth, B.L., Albert, P.R., 2006. Molecular determinants in the second intracellular loop of the 5-hydroxytryptamine-1A receptor for G-protein coupling. *Mol Pharmacol* 69, 1518-26.
- Kusserow, H., Davies, B., Hortnagl, H., Voigt, I., Stroh, T., Bert, B., Deng, D. R., Fink, H., Veh, R. W., Theuring, F., 2004. Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin 1A receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 129, 104-116.

- Lacan, G., Plenevaux, A., Rubins, D. J., Way, B. M., Defraiteur, C., Lemaire, C., Aerts, J., Luxen, A., Cherry, S. R., Melega, W. P., 2008. Cyclosporine, a P-glycoprotein modulator, increases [¹⁸F]MPPF uptake in rat brain and peripheral tissues: microPET and *ex vivo* studies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35, 2256-2266.
- Lacivita, E., Di Pilato, P., De Giorgio, P., Colabufo, N. A., Berardi, F., Perrone, R., Leopoldo, M., 2012. The therapeutic potential of 5-HT_{1A} receptors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 22, 887-902.
- Lai, M. K., Tsang, S. W., Esiri, M. M., Francis, P. T., Wong, P. T., Chen, C. P., 2011. Differential involvement of hippocampal serotonin_{1A} receptors and re-uptake sites in non-cognitive behaviors of Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* 213, 431-439.
- Lai, M. K., Tsang, S. W., Francis, P. T., Keene, J., Hope, T., Esiri, M. M., Spence, I., Chen, C. P., 2002. Postmortem serotonergic correlates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 13, 1175-1178.
- Lancelot, S., Zimmer, L., 2010. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 31, 411-417.
- Lancelot, S., Costes, N., Lemoine, L., Zimmer, L., 2010. Development and evaluation of a digital atlas for PET neuroimaging in domestic cat (*Felis catus*). *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 37:S387-S387.
- Lancelot, S., Roche, R., Slimen, A., Bouillot, C., Levigoureux, E., Langlois, J. B., Zimmer, L., Costes, N., 2014. A multi-atlas based method for automated anatomical rat brain MRI segmentation and extraction of PET activity. *PLoS One* 9, e109113.
- Lanctot, K. L., Hussey, D. F., Herrmann, N., Black, S. E., Rusjan, P. M., Wilson, A. A., Houle, S., Kozloff, N., Verhoeff, N. P., Kapur, S., 2007. A positron emission tomography study of 5-hydroxytryptamine-1A receptors in Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 15, 888-898.
- Lanfumey, L., Hamon, M., 2000. Central 5-HT_{1A} receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nucl Med Biol* 27, 429-435.
- Lanfumey, L., Hamon, M., 2004. 5-HT₁ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3, 1-10.
- Lang, L., Jagoda, E., Schmall, B., Vuong, B. K., Adams, H. R., Nelson, D. L., Carson, R. E., Eckelman, W. C., 1999. Development of fluorine-18-labeled 5-HT_{1A} antagonists. *J Med Chem* 42, 1576-1586.
- Lappin, G., Temple, S., 2006. Radiotracers in drug development. Taylor & Francis, Boca Raton.
- Laruelle, M., 2000. Imaging synaptic neurotransmission with *in vivo* binding competition techniques: a critical review. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 423-451.
- Laugwitz, K. L., Allgeier, A., Offermanns, S., Spicher, K., Van Sande, J., Dumont, J. E., Schultz, G., 1996. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 116-120.
- Lauritzen, M., Mathiesen, C., Schaefer, K., Thomsen, K. J., 2012. Neuronal inhibition and excitation, and the dichotomic control of brain hemodynamic and oxygen responses. *Neuroimage* 62, 1040-1050.
- Le Bars, D., Lemaire, C., Ginovart, N., Plenevaux, A., Aerts, J., Brihaye, C., Hassoun, W., Leviel, V., Mekhsian, P., Weissmann, D., Pujol, J. F., Luxen, A., Comar, D., 1998. High-yield radiosynthesis and

preliminary *in vivo* evaluation of p-[18F]MPPF, a fluoro analog of WAY-100635. Nucl Med Biol 25, 343-350.

Le Poul, E., Boni, C., Hanoun, N., Laporte, A. M., Laaris, N., Chauveau, J., Hamon, M., Lanfumey, L., 2000. Differential adaptation of brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. Neuropharmacology 39, 110-122.

Lemoine, L., Becker, G., Vacher, B., Billard, T., Lancelot, S., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L., 2012. Radiosynthesis and preclinical evaluation of 18F-F13714 as a fluorinated 5-HT_{1A} receptor agonist radioligand for PET neuroimaging. J Nucl Med 53, 969-976.

Lemoine, L., Verdurand, M., Vacher, B., Blanc, E., Le Bars, D., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L., 2010. [18F]F15599, a novel 5-HT_{1A} receptor agonist, as a radioligand for PET neuroimaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging 37, 594-605.

Levitt, E. S., Hunnicutt, B. J., Knopp, S. J., Williams, J. T., Bissonnette, J. M., 2013. A selective 5-HT_{1A} receptor agonist improves respiration in a mouse model of Rett syndrome. J Appl Physiol (1985) 115, 1626-1633.

Leysen, J. E., 2004. 5-HT₂ receptors. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 3, 11-26.

Liew, C. J., Lim, Y. M., Bonwetsch, R., Shamim, S., Sato, S., Reeves-Tyer, P., Herscovitch, P., Dustin, I., Bagic, A., Giovacchini, G., Theodore, W. H., 2009. 18F-FCWAY and 18F-FDG PET in MRI-negative temporal lobe epilepsy. Epilepsia 50, 234-239.

Lin, S. H., Lee, L. T., Yang, Y. K., 2014. Serotonin and mental disorders: a concise review on molecular neuroimaging evidence. Clin Psychopharmacol Neurosci 12, 196-202.

Lin, S. L., Setya, S., Johnson-Farley, N. N., Cowen, D. S., 2002. Differential coupling of 5-HT(1) receptors to G proteins of the G(i) family. Br J Pharmacol 136, 1072-1078.

Llado-Pelfort, L., Assie, M. B., Newman-Tancredi, A., Artigas, F., Celada, P., 2010. Preferential *in vivo* action of F15599, a novel 5-HT(1A) receptor agonist, at postsynaptic 5-HT(1A) receptors. Br J Pharmacol 160, 1929-1940.

Llado-Pelfort, L., Santana, N., Ghisi, V., Artigas, F., Celada, P., 2012. 5-HT_{1A} receptor agonists enhance pyramidal cell firing in prefrontal cortex through a preferential action on GABA interneurons. Cereb Cortex 22, 1487-1497.

Logan, J., 2000. Graphical analysis of PET data applied to reversible and irreversible tracers. Nucl Med Biol 27, 661-670.

Lorke, D. E., Lu, G., Cho, E., Yew, D. T., 2006. Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₆ receptors in the prefrontal cortex of Alzheimer and normal aging patients. BMC Neurosci 7, 36.

Lucki, I., 1998. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. Biol Psychiatry 44, 151-162.

Luttgen, M., Ogren, S. O., Meister, B., 2005. 5-HT_{1A} receptor mRNA and immunoreactivity in the rat medial septum/diagonal band of Broca-relationships to GABAergic and cholinergic neurons. J Chem Neuroanat 29, 93-111.

Luttrell, L. M., Maudsley, S., Bohn, L. M., 2015. Fulfilling the Promise of "Biased" G Protein-Coupled Receptor Agonism. Mol Pharmacol 88, 579-588.

MaassenVanDenBrink, A., Vergouwe, M. N., Ophoff, R. A., Saxena, P. R., Ferrari, M. D., Frants, R. R., 1998. 5-HT_{1B} receptor polymorphism and clinical response to sumatriptan. Headache 38, 288-291.

- Madsen, K., Neumann, W. J., Holst, K., Marner, L., Haahr, M. T., Lehel, S., Knudsen, G. M., Hasselbalch, S. G., 2011. Cerebral serotonin 4 receptors and amyloid-beta in early Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 26, 457-466.
- Maeda, J., Suhara, T., Ogawa, M., Okauchi, T., Kawabe, K., Zhang, M. R., Semba, J., Suzuki, K., 2001. *In vivo* binding properties of [carbonyl-¹¹C]WAY-100635: effect of endogenous serotonin. *Synapse* 40, 122-129.
- Mai, J. K., Paxinos, G., 1997. Atlas of the human brain. CA: Academic Press, San Diego.
- Mandeville, J. B., Liu, C. H., Vanduffel, W., Marota, J. J., Jenkins, B. G., 2014. Data collection and analysis strategies for pHMRI. *Neuropharmacology* 84, 65-78.
- Mannoury la Cour, C., Boni, C., Hanoun, N., Lesch, K. P., Hamon, M., Lanfumey, L., 2001. Functional consequences of 5-HT transporter gene disruption on 5-HT(1a) receptor-mediated regulation of dorsal raphe and hippocampal cell activity. *J Neurosci* 21, 2178-2185.
- Mannoury la Cour, C., El Mestikawy, S., Hanoun, N., Hamon, M., Lanfumey, L., 2006. Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain. *Mol Pharmacol* 70, 1013-1021.
- Marazziti, D., Palego, L., Giromella, A., Mazzoni, M. R., Borsini, F., Mayer, N., Naccarato, A. G., Lucacchini, A., Cassano, G. B., 2002. Region-dependent effects of flibanserin and buspirone on adenylyl cyclase activity in the human brain. *Int J Neuropsychopharmacol* 5, 131-140.
- Marner, L., Frokjaer, V. G., Kalbitzer, J., Lehel, S., Madsen, K., Baare, W. F., Knudsen, G. M., Hasselbalch, S. G., 2012. Loss of serotonin 2A receptors exceeds loss of serotonergic projections in early Alzheimer's disease: a combined [¹¹C]DASB and [¹⁸F]altanserin-PET study. *Neurobiol Aging* 33, 479-487.
- Martin, C., Sibson, N. R., 2008. Pharmacological MRI in animal models: a useful tool for 5-HT research? *Neuropharmacology* 55, 1038-1047.
- Martinez, D., Hwang, D., Mawlawi, O., Slifstein, M., Kent, J., Simpson, N., Parsey, R. V., Hashimoto, T., Huang, Y., Shinn, A., Van Heertum, R., Abi-Dargham, A., Caltabiano, S., Malizia, A., Cowley, H., Mann, J. J., Laruelle, M., 2001. Differential occupancy of somatodendritic and postsynaptic 5HT(1A) receptors by pindolol: a dose-occupancy study with [¹¹C]WAY 100635 and positron emission tomography in humans. *Neuropsychopharmacology* 24, 209-229.
- Mary, S., Damian, M., Louet, M., Floquet, N., Fehrentz, J. A., Marie, J., Martinez, J., Baneres, J. L., 2012. Ligands and signaling proteins govern the conformational landscape explored by a G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8304-8309.
- Massey, C. A., Iceman, K. E., Johansen, S. L., Wu, Y., Harris, M. B., Richerson, G. B., 2015. Isoflurane abolishes spontaneous firing of serotonin neurons and masks their pH/CO(2) chemosensitivity. *J Neurophysiol* 113, 2879-2888.
- Mathis, C. A., Simpson, N. R., Mahmood, K., Kinahan, P. E., Mintun, M. A., 1994. [¹¹C]WAY 100635: a radioligand for imaging 5-HT_{1A} receptors with positron emission tomography. *Life Sci* 55, PL403-407.
- Mathis, C.A., Huang, Y., Simpson, N. R., 1997. Synthesis and evaluation of 5-HT_{1A} agonists as radioligands : failure of G protein-coupled receptor agonists as *in vivo* imaging agents. *J Labelled Compd Radiopharm* 40, 563-564.

- Maurel, J. L., Autin, J. M., Funes, P., Newman-Tancredi, A., Colpaert, F., Vacher, B., 2007. High-efficacy 5-HT_{1A} agonists for antidepressant treatment: a renewed opportunity. *J Med Chem* 50, 5024-5033.
- McBean, D. E., Sharkey, J., Ritchie, I. M., Kelly, P. A., 1991. Cerebrovascular and functional consequences of 5-HT_{1A} receptor activation. *Brain Res* 555, 159-163.
- McCreary, A. C., Varney, M. A., Newman-Tancredi, A., 2016. The novel 5-HT_{1A} receptor agonist, NLX-112 reduces l-DOPA-induced abnormal involuntary movements in rat: A chronic administration study with microdialysis measurements. *Neuropharmacology* 105, 651-660.
- McKie, S., Del-Ben, C., Elliott, R., Williams, S., del Vai, N., Anderson, I., Deakin, J. F., 2005. Neuronal effects of acute citalopram detected by pharmacMRI. *Psychopharmacology (Berl)* 180, 680-686.
- Meadows, S. M., Chambers, N. E., Conti, M. M., Bossert, S. C., Tasber, C., Sheena, E., Varney, M., Newman-Tancredi, A., Bishop, C., 2017. Characterizing the differential roles of striatal 5-HT_{1A} auto- and hetero-receptors in the reduction of l-DOPA-induced dyskinesia. *Exp Neurol* 292, 168-178.
- Meltzer, H. Y., Li, Z., Kaneda, Y., Ichikawa, J., 2003. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 1159-1172.
- Mendez, J., Kadia, T. M., Somayazula, R. K., El-Badawi, K. I., Cowen, D. S., 1999. Differential coupling of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors to activation of ERK2 and inhibition of adenylyl cyclase in transfected CHO cells. *J Neurochem* 73, 162-168.
- Meneses, A., 2015. Serotonin, neural markers, and memory. *Front Pharmacol* 6, 143.
- Merlet, I., Ostrowsky, K., Costes, N., Ryvlin, P., Isnard, J., Faillenot, I., Lavenne, F., Dufournel, D., Le Bars, D., Mauguere, F., 2004. 5-HT_{1A} receptor binding and intracerebral activity in temporal lobe epilepsy: an [18F]MPPF-PET study. *Brain* 127, 900-913.
- Meyer, J. H., 2007. Imaging the serotonin transporter during major depressive disorder and antidepressant treatment. *J Psychiatry Neurosci* 32, 86-102.
- Middlemiss, D. N., Palmer, A. M., Edell, N., Bowen, D. M., 1986. Binding of the novel serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in normal and Alzheimer brain. *J Neurochem* 46, 993-996.
- Milak, M. S., DeLorenzo, C., Zanderigo, F., Prabhakaran, J., Kumar, J. S., Majo, V. J., Mann, J. J., Parsey, R. V., 2010. *In vivo* quantification of human serotonin 1A receptor using ¹¹C-CUMI-101, an agonist PET radiotracer. *J Nucl Med* 51, 1892-1900.
- Milak, M. S., Severance, A. J., Prabhakaran, J., Kumar, J. S., Majo, V. J., Ogden, R. T., Mann, J. J., Parsey, R. V., 2011. *In vivo* serotonin-sensitive binding of [¹¹C]CUMI-101: a serotonin 1A receptor agonist positron emission tomography radiotracer. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 243-249.
- Millan, M. J., Marin, P., Bockaert, J., 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., Newman-Tancredi, A., Duqueyroux, D., Cussac, D., 2001. Agonist properties of pindolol at h5-HT_{1A} receptors coupled to mitogen-activated protein kinase. *Eur J Pharmacol* 424, 13-17.
- Millet, P., Moulin, M., Bartoli, A., Del Guerra, A., Ginovart, N., Lemoucheux, L., Buono, S., Fagret, D., Charnay, Y., Ibanez, V., 2008. *In vivo* quantification of 5-HT_{1A}-[18F]MPPF interactions in rats using the YAP-(S)PET scanner and a beta-microprobe. *Neuroimage* 41, 823-834.

- Miquel, M.C., Doucet, E., Boni, C., El Mestikawy, S., Matthiessen, L., Daval, G., Verge, D., Hamon, M, 1991. Central serotonin_{1A} receptors : respective distributions of encoding mRNA, receptor protein and binding sites by *in situ* hybridization histochemistry, radioimmunochemistry and autoradiographic mapping in the rat brain. *Neurochem Int* 19, 453-465.
- Miquel, M. C., Doucet, E., Riad, M., Adrien, J., Verge, D., Hamon, M., 1992. Effect of the selective lesion of serotonergic neurons on the regional distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 14, 357-362.
- Mizukami, K., Ishikawa, M., Akatsu, H., Abrahamson, E. E., Ikonovic, M. D., Asada, T., 2011. An immunohistochemical study of the serotonin 1A receptor in the hippocampus of subjects with Alzheimer's disease. *Neuropathology* 31, 503-509.
- Mochizuki, H., Amano, T., Seki, T., Matsubayashi, H., Mitsuhata, C., Morita, K., Kitayama, S., Dohi, T., Mishima, H. K., Sakai, N., 2005. Role of C-terminal region in the functional regulation of rat serotonin transporter (SERT). *Neurochem Int* 46, 93-105.
- Molliver, M. E., 1987. Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. *J Clin Psychopharmacol* 7, 3S-23S.
- Mongeau, R., Welner, S. A., Quirion, R., Suranyi-Cadotte, B. E., 1992. Further evidence for differential affinity states of the serotonin_{1A} receptor in rat hippocampus. *Brain Res* 590, 229-238.
- Monnet, F. P., Debonnel, G., Bergeron, R., Gronier, B., de Montigny, C., 1994. The effects of sigma ligands and of neuropeptide Y on N-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation of CA3 dorsal hippocampus neurones are differentially affected by pertussin toxin. *Br J Pharmacol* 112, 709-715.
- Moulin-Sallanon, M., Charnay, Y., Ginovart, N., Perret, P., Lanfumey, L., Hamon, M., Hen, R., Fagret, D., Ibanez, V., Millet, P., 2009. Acute and chronic effects of citalopram on 5-HT_{1A} receptor-labeling by [¹⁸F]MPPF and -coupling to receptors-G proteins. *Synapse* 63, 106-116.
- Mu, Y., Gage, F. H., 2011. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 6, 85.
- Mueggler, T., Razoux, F., Russig, H., Buehler, A., Franklin, T. B., Baltes, C., Mansuy, I. M., Rudin, M., 2011. Mapping of CBV changes in 5-HT(1A) terminal fields by functional MRI in the mouse brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 21, 344-353.
- Mukaida, K., Shichino, T., Koyanagi, S., Himukashi, S., Fukuda, K., 2007. Activity of the serotonergic system during isoflurane anesthesia. *Anesth Analg* 104, 836-839.
- Murphy, D. L., Lerner, A., Rudnick, G., Lesch, K. P., 2004. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Mol Interv* 4, 109-123.
- Narendran, R., Hwang, D. R., Slifstein, M., Talbot, P. S., Erritzoe, D., Huang, Y., Cooper, T. B., Martinez, D., Kegeles, L. S., Abi-Dargham, A., Laruelle, M., 2004. *In vivo* vulnerability to competition by endogenous dopamine: comparison of the D₂ receptor agonist radiotracer (-)-N-[¹¹C]propyl-norapomorphine ([¹¹C]NPA) with the D₂ receptor antagonist radiotracer [¹¹C]-raclopride. *Synapse* 52, 188-208.
- Nelson, D. L., 2004. 5-HT₅ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3, 53-58.
- Neumeister, A., Bain, E., Nugent, A. C., Carson, R. E., Bonne, O., Luckenbaugh, D. A., Eckelman, W., Herscovitch, P., Charney, D. S., Drevets, W. C., 2004. Reduced serotonin type 1A receptor binding in panic disorder. *J Neurosci* 24, 589-591.

- Newman-Tancredi, A., 2010. The importance of 5-HT_{1A} receptor agonism in antipsychotic drug action: rationale and perspectives. *Curr Opin Investig Drugs* 11, 802-812.
- Newman-Tancredi, A., 2011. Biased agonism at serotonin 5-HT_{1A} receptors: preferential postsynaptic activity for improved therapy of CNS disorders. *Neuropsychiatry* 1, 149-164.
- Newman-Tancredi, A., Cussac, D., Marini, L., Millan, M. J., 2002. Antibody capture assay reveals bell-shaped concentration-response isotherms for h5-HT(1A) receptor-mediated Galpha(i3) activation: conformational selection by high-efficacy agonists, and relationship to trafficking of receptor signaling. *Mol Pharmacol* 62, 590-601.
- Newman-Tancredi, A., Kleven, M. S., 2011. Comparative pharmacology of antipsychotics possessing combined dopamine D2 and serotonin 5-HT_{1A} receptor properties. *Psychopharmacology (Berl)* 216, 451-473.
- Newman-Tancredi, A., Martel, J. C., Assie, M. B., Buritova, J., Laouressergues, E., Cosi, C., Heusler, P., Bruins Slot, L., Colpaert, F. C., Vacher, B., Cussac, D., 2009. Signal transduction and functional selectivity of F15599, a preferential post-synaptic 5-HT_{1A} receptor agonist. *Br J Pharmacol* 156, 338-353.
- Newman-Tancredi, A., Martel, J. C., Cosi, C., Heusler, P., Lestienne, F., Varney, M. A., Cussac, D., 2017. Distinctive *in vitro* signal transduction profile of NLX-112, a potent and efficacious serotonin 5-HT_{1A} receptor agonist. *J Pharm Pharmacol* 69, 1178-1190.
- Nichols, D. E., Nichols, C. D., 2008. Serotonin receptors. *Chem Rev* 108, 1614-1641.
- Nomura, Y., 2001. Neurophysiology of Rett syndrome. *Brain Dev* 23 Suppl 1, S50-57.
- Offermanns, S., Wieland, T., Homann, D., Sandmann, J., Bombien, E., Spicher, K., Schultz, G., Jakobs, K. H., 1994. Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to Gi-type G proteins and Gq/11. *Mol Pharmacol* 45, 890-898.
- Oleskevich, S., 1995. G alpha o1 decapeptide modulates the hippocampal 5-HT_{1A} potassium current. *J Neurophysiol* 74, 2189-2193.
- Oleskevich, S., Descarries, L., Watkins, K. C., Seguela, P., Daszuta, A., 1991. Ultrastructural features of the serotonin innervation in adult rat hippocampus: an immunocytochemical description in single and serial thin sections. *Neuroscience* 42, 777-791.
- Olivier, B., Soudijn, W., van Wijngaarden, I., 1999. The 5-HT_{1A} receptor and its ligands: structure and function. *Prog Drug Res* 52, 103-165.
- Osman, S., Lundkvist, C., Pike, V. W., Halldin, C., McCarron, J. A., Swahn, C. G., Ginovart, N., Luthra, S. K., Bench, C. J., Grasby, P. M., Wikstrom, H., Barf, T., Cliffe, I. A., Fletcher, A., Farde, L., 1996. Characterization of the radioactive metabolites of the 5-HT_{1A} receptor radioligand, [O-methyl-¹¹C]WAY-100635, in monkey and human plasma by CLHP: comparison of the behaviour of an identified radioactive metabolite with parent radioligand in monkey using PET. *Nucl Med Biol* 23, 627-634.
- Palchadhuri, M., Flugge, G., 2005. 5-HT_{1A} receptor expression in pyramidal neurons of cortical and limbic brain regions. *Cell Tissue Res* 321, 159-172.
- Palner, M., Underwood, M. D., Kumar, D. J., Arango, V., Knudsen, G. M., John Mann, J., Parsey, R. V., 2011. *Ex vivo* evaluation of the serotonin 1A receptor partial agonist [(3)H]CUMI-101 in awake rats. *Synapse* 65, 715-723.

- Parks, C. L., Robinson, P. S., Sibille, E., Shenk, T., Toth, M., 1998. Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10734-10739.
- Parsey, R. V., Arango, V., Olvet, D. M., Oquendo, M. A., Van Heertum, R. L., John Mann, J., 2005. Regional heterogeneity of 5-HT_{1A} receptors in human cerebellum as assessed by positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 785-793.
- Parsey, R. V., Ogden, R. T., Miller, J. M., Tin, A., Hesselgrave, N., Goldstein, E., Mikhno, A., Milak, M., Zanderigo, F., Sullivan, G. M., Oquendo, M. A., Mann, J. J., 2010. Higher serotonin 1A binding in a second major depression cohort: modeling and reference region considerations. *Biol Psychiatry* 68, 170-178.
- Passchier, J., Gee, A., Willemsen, A., Vaalburg, W., van Waarde, A., 2002. Measuring drug-related receptor occupancy with positron emission tomography. *Methods* 27, 278-286.
- Paterson, D. S., Trachtenberg, F. L., Thompson, E. G., Belliveau, R. A., Beggs, A. H., Darnall, R., Chadwick, A. E., Krous, H. F., Kinney, H. C., 2006. Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome. *JAMA* 296, 2124-2132.
- Paterson, L. M., Kornum, B. R., Nutt, D. J., Pike, V. W., Knudsen, G. M., 2013. 5-HT radioligands for human brain imaging with PET and SPECT. *Med Res Rev* 33, 54-111.
- Paterson, L. M., Tyacke, R. J., Nutt, D. J., Knudsen, G. M., 2010. Measuring endogenous 5-HT release by emission tomography: promises and pitfalls. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 1682-1706.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
- Phelps, M. E., Huang, S. C., Hoffman, E. J., Selin, C., Sokoloff, L., Kuhl, D. E., 1979. Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Ann Neurol* 6, 371-388.
- Pike, V. W., 2009. PET radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 30, 431-440.
- Pike, V. W., McCarron, J. A., Lammertsma, A. A., Osman, S., Hume, S. P., Sargent, P. A., Bench, C. J., Cliffe, I. A., Fletcher, A., Grasby, P. M., 1996. Exquisite delineation of 5-HT_{1A} receptors in human brain with PET and [carbonyl-11 C]WAY-100635. *Eur J Pharmacol* 301, R5-7.
- Pinborg, L. H., Feng, L., Haahr, M. E., Gillings, N., Dyssegaard, A., Madsen, J., Svarer, C., Yndgaard, S., Kjaer, T. W., Parsey, R. V., Hansen, H. D., Ettrup, A., Paulson, O. B., Knudsen, G. M., 2012. No change in [(1)(1)C]CUMI-101 binding to 5-HT(1A) receptors after intravenous citalopram in human. *Synapse* 66, 880-884.
- Pineda, V. V., Athos, J. I., Wang, H., Cerver, J., Ippolito, D., Boulay, G., Birnbaumer, L., Storm, D. R., 2004. Removal of G(α1) constraints on adenylyl cyclase in the hippocampus enhances LTP and impairs memory formation. *Neuron* 41, 153-163.
- Pineyro, G., Blier, P., 1999. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev* 51, 533-591.
- Plenevaux, A., Weissmann, D., Aerts, J., Lemaire, C., Brihaye, C., Degueldre, C., Le Bars, D., Comar, D., Pujol, J., Luxen, A., 2000. Tissue distribution, autoradiography, and metabolism of 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2' -[N-2"-pyridinyl]-p-[(18)F]fluorobenzamido]ethyl]piperazine (p-[(18)F]MPPF), a new serotonin 5-HT(1A) antagonist for positron emission tomography: An *In vivo* study in rats. *J Neurochem* 75, 803-811.

- Plewes, D. B., Kucharczyk, W., 2012. Physics of MRI: a primer. *J Magn Reson Imaging* 35, 1038-1054.
- Politis, M., Niccolini, F., 2015. Serotonin in Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 277, 136-145.
- Politis, M., Wu, K., Loane, C., Brooks, D. J., Kiferle, L., Turkheimer, F. E., Bain, P., Molloy, S., Piccini, P., 2014. Serotonergic mechanisms responsible for levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease patients. *J Clin Invest* 124, 1340-1349.
- Polter, A. M., Li, X., 2010. 5-HT_{1A} receptor-regulated signal transduction pathways in brain. *Cell Signal* 22, 1406-1412.
- Pompeiano, M., Palacios, J. M., Mengod, G., 1992. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 12, 440-453.
- Praschak-Rieder, N., Hussey, D., Wilson, A. A., Carella, A., Lee, M., Dunn, E., Willeit, M., Bagby, R. M., Houle, S., Meyer, J. H., 2004. Tryptophan depletion and serotonin loss in selective serotonin reuptake inhibitor-treated depression: an [(18)F] MPPF positron emission tomography study. *Biol Psychiatry* 56, 587-591.
- Preece, M. A., Taylor, M. J., Raley, J., Blamire, A., Sharp, T., Sibson, N. R., 2009. Evidence that increased 5-HT release evokes region-specific effects on blood-oxygenation level-dependent functional magnetic resonance imaging responses in the rat brain. *Neuroscience* 159, 751-759.
- Pucadyil, T. J., Chattopadhyay, A., 2007. The human serotonin_{1A} receptor exhibits G-protein-dependent cell surface dynamics. *Glycoconj J* 24, 25-31.
- Qian, Y., Melikian, H. E., Rye, D. B., Levey, A. I., Blakely, R. D., 1995. Identification and characterization of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins using site-specific antibodies. *J Neurosci* 15, 1261-1274.
- Quiedeville, A., Boulouard, M., Da Silva Costa-Aze, V., Dauphin, F., Bouet, V., Freret, T., 2014. 5-HT₆ receptor antagonists as treatment for age-related cognitive decline. *Rev Neurosci* 25, 417-427.
- Rabiner, E. A., Gunn, R. N., Wilkins, M. R., Sedman, E., Grasby, P. M., 2002. Evaluation of EMD 128 130 occupancy of the 5-HT_{1A} and the D₂ receptor: a human PET study with [11C]WAY-100635 and [11C]raclopride. *J Psychopharmacol* 16, 195-199.
- Radja, F., Laporte, A. M., Daval, G., Verge, D., Gozlan, H., Hamon, M., 1991. Autoradiography of serotonin receptor subtypes in the central nervous system. *Neurochem Int* 18, 1-15.
- Ramirez, M. J., Lai, M. K., Tordera, R. M., Francis, P. T., 2014. Serotonergic therapies for cognitive symptoms in Alzheimer's disease: rationale and current status. *Drugs* 74, 729-736.
- Rapport, M. M., 1949. Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J Biol Chem* 180, 961-969.
- Rapport, M. M., Green, A. A., Page, I. H., 1948. Crystalline Serotonin. *Science* 108, 329-330.
- Raskin, J., Cummings, J., Hardy, J., Schuh, K., Dean, R. A., 2015. Neurobiology of Alzheimer's Disease: Integrated Molecular, Physiological, Anatomical, Biomarker, and Cognitive Dimensions. *Curr Alzheimer Res* 12, 712-722.
- Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., Devree, B. T., Rosenbaum, D. M., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R. K., Gellman, S. H.,

- Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W. I., Kobilka, B. K., 2011. Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* 469, 175-180.
- Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., Kobilka, B. K., 2011. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549-555.
- Raymond, J. R., Mukhin, Y. V., Gelasco, A., Turner, J., Collinsworth, G., Gettys, T. W., Grewal, J. S., Garnovskaya, M. N., 2001. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 92, 179-212.
- Razoux, F., Baltes, C., Mueggler, T., Seuwen, A., Russig, H., Mansuy, I., Rudin, M., 2013. Functional MRI to assess alterations of functional networks in response to pharmacological or genetic manipulations of the serotonergic system in mice. *Neuroimage* 74, 326-336.
- Ren, J., Ding, X., Greer, J. J., 2015. 5-HT1A receptor agonist Befiradol reduces fentanyl-induced respiratory depression, analgesia, and sedation in rats. *Anesthesiology* 122, 424-434.
- Riad, M., Garcia, S., Watkins, K. C., Jodoin, N., Doucet, E., Langlois, X., el Mestikawy, S., Hamon, M., Descarries, L., 2000. Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal axonal localization of 5-HT1B serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417, 181-194.
- Richardson-Jones, J. W., Craige, C. P., Guiard, B. P., Stephen, A., Metzger, K. L., Kung, H. F., Gardier, A. M., Dranovsky, A., David, D. J., Beck, S. G., Hen, R., Leonardo, E. D., 2010. 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* 65, 40-52.
- Richerson, G. B., 2004. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 5, 449-461.
- Rodriguez, J. J., Noristani, H. N., Verkhatsky, A., 2012. The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 99, 15-41.
- Rohlfing, T., Kroenke, C. D., Sullivan, E. V., Dubach, M. F., Bowden, D. M., Grant, K. A., Pfefferbaum, A., 2012. The INIA19 Template and NeuroMaps Atlas for Primate Brain Image Parcellation and Spatial Normalization. *Front Neuroinform* 6, 27.
- Roux, J. C., Villard, L., 2010. Biogenic amines in Rett syndrome: the usual suspects. *Behav Genet* 40, 59-75.
- Sah, V. P., Seasholtz, T. M., Sagi, S. A., Brown, J. H., 2000. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 459-489.
- Sakaue, M., Somboonthum, P., Nishihara, B., Koyama, Y., Hashimoto, H., Baba, A., Matsuda, T., 2000. Postsynaptic 5-hydroxytryptamine(1A) receptor activation increases *in vivo* dopamine release in rat prefrontal cortex. *Br J Pharmacol* 129, 1028-1034.
- Sakowski, S. A., Geddes, T. J., Thomas, D. M., Levi, E., Hatfield, J. S., Kuhn, D. M., 2006. Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res* 1085, 11-18.
- Salmon, E., 2007. A review of the literature on neuroimaging of serotonergic function in Alzheimer's disease and related disorders. *J Neural Transm (Vienna)* 114, 1179-1185.

- Samuels, I. S., Saitta, S. C., Landreth, G. E., 2009. MAP'ing CNS development and cognition: an ERKsome process. *Neuron* 61, 160-167.
- Sander, C. Y., Hooker, J. M., Catana, C., Normandin, M. D., Alpert, N. M., Knudsen, G. M., Vanduffel, W., Rosen, B. R., Mandeville, J. B., 2013. Neurovascular coupling to D2/D3 dopamine receptor occupancy using simultaneous PET/functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 11169-11174.
- Sander, C. Y., Hooker, J. M., Catana, C., Rosen, B. R., Mandeville, J. B., 2016. Imaging Agonist-Induced D2/D3 Receptor Desensitization and Internalization *In vivo* with PET/fMRI. *Neuropsychopharmacology* 41, 1427-1436.
- Santana, N., Bortolozzi, A., Serrats, J., Mengod, G., Artigas, F., 2004. Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14, 1100-1109.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805-809.
- Sarnyai, Z., Sibille, E. L., Pavlides, C., Fenster, R. J., McEwen, B. S., Toth, M., 2000. Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14731-14736.
- Sato, S., Mizukami, K., Asada, T., 2007. A preliminary open-label study of 5-HT1A partial agonist tandospirone for behavioural and psychological symptoms associated with dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* 10, 281-283.
- Saulin, A., Savli, M., Lanzenberger, R., 2012. Serotonin and molecular neuroimaging in humans using PET. *Amino Acids* 42, 2039-2057.
- Savitz, J., Lucki, I., Drevets, W. C., 2009. 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol* 88, 17-31.
- Savli, M., Bauer, A., Mitterhauser, M., Ding, Y. S., Hahn, A., Kroll, T., Neumeister, A., Haeusler, D., Ungersboeck, J., Henry, S., Isfahani, S. A., Rattay, F., Wadsak, W., Kasper, S., Lanzenberger, R., 2012. Normative database of the serotonergic system in healthy subjects using multi-tracer PET. *Neuroimage* 63, 447-459.
- Scanley, B. E., Kennan, R. P., Gore, J. C., 2001. Changes in rat cerebral blood volume due to modulation of the 5-HT(1A) receptor measured with susceptibility enhanced contrast MRI. *Brain Res* 913, 149-155.
- Schechter, L. E., Smith, D. L., Rosenzweig-Lipson, S., Sukoff, S. J., Dawson, L. A., Marquis, K., Jones, D., Piesla, M., Andree, T., Nawoschik, S., Harder, J. A., Womack, M. D., Buccafusco, J., Terry, A. V., Hoebel, B., Rada, P., Kelly, M., Abou-Gharbia, M., Barrett, J. E., Childers, W., 2005. Lecozotan (SRA-333): a selective serotonin 1A receptor antagonist that enhances the stimulated release of glutamate and acetylcholine in the hippocampus and possesses cognitive-enhancing properties. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 1274-1289.
- Schmitz, D., Empson, R. M., Heinemann, U., 1995. Serotonin reduces inhibition via 5-HT1A receptors in area CA1 of rat hippocampal slices *in vitro*. *J Neurosci* 15, 7217-7225.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671-675.

- Schreiber, R., Newman-Tancredi, A., 2014. Improving cognition in schizophrenia with antipsychotics that elicit neurogenesis through 5-HT(1A) receptor activation. *Neurobiol Learn Mem* 110, 72-80.
- Schwarz, A. J., Gozzi, A., Reese, T., Bifone, A., 2007. *In vivo* mapping of functional connectivity in neurotransmitter systems using pharmacological MRI. *Neuroimage* 34, 1627-1636.
- Seeman, P., 2002. Atypical antipsychotics: mechanism of action. *Can J Psychiatry* 47, 27-38.
- Seeman, P., Kapur, S., 2003. Anesthetics inhibit high-affinity states of dopamine D2 and other G-linked receptors. *Synapse* 50, 35-40.
- Selvaraj, S., Arnone, D., Cappai, A., Howes, O., 2014. Alterations in the serotonin system in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of postmortem and molecular imaging studies. *Neurosci Biobehav Rev* 45, 233-245.
- Selvaraj, S., Turkheimer, F., Rosso, L., Faulkner, P., Mouchlianitis, E., Roiser, J. P., McGuire, P., Cowen, P. J., Howes, O., 2012. Measuring endogenous changes in serotonergic neurotransmission in humans: a [¹¹C]CUMI-101 PET challenge study. *Mol Psychiatry* 17, 1254-1260.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., Hyman, B. T., 2011. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, a006189.
- Sharp, T., Boothman, L., Raley, J., Queree, P., 2007. Important messages in the 'post': recent discoveries in 5-HT neurone feedback control. *Trends Pharmacol Sci* 28, 629-636.
- Shimizu, S., Ohno, Y., 2013. Improving the Treatment of Parkinson's Disease: A Novel Approach by Modulating 5-HT(1A) Receptors. *Aging Dis* 4, 1-13.
- Shimizu, S., Tataru, A., Imaki, J., Ohno, Y., 2010. Role of cortical and striatal 5-HT1A receptors in alleviating antipsychotic-induced extrapyramidal disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34, 877-881.
- Shiue, C. Y., Shiue, G. G., Mozley, P. D., Kung, M. P., Zhuang, Z. P., Kim, H. J., Kung, H. F., 1997. P-[¹⁸F]-MPPF: a potential radioligand for PET studies of 5-HT1A receptors in humans. *Synapse* 25, 147-154.
- Shrestha, S., Hirvonen, J., Hines, C. S., Henter, I. D., Svenningsson, P., Pike, V. W., Innis, R. B., 2012. Serotonin-1A receptors in major depression quantified using PET: controversies, confounds, and recommendations. *Neuroimage* 59, 3243-3251.
- Shrestha, S. S., Liow, J. S., Jenko, K., Ikawa, M., Zoghbi, S. S., Innis, R. B., 2016. The 5-HT1A Receptor PET Radioligand ¹¹C-CUMI-101 Has Significant Binding to alpha1-Adrenoceptors in Human Cerebellum, Limiting Its Use as a Reference Region. *J Nucl Med* 57, 1945-1948.
- Shrestha, S. S., Liow, J. S., Lu, S., Jenko, K., Gladding, R. L., Svenningsson, P., Morse, C. L., Zoghbi, S. S., Pike, V. W., Innis, R. B., 2014. (¹¹C)-CUMI-101, a PET radioligand, behaves as a serotonin 1A receptor antagonist and also binds to alpha(1) adrenoceptors in brain. *J Nucl Med* 55, 141-146.
- Silber, B. Y., Schmitt, J. A., 2010. Effects of tryptophan loading on human cognition, mood, and sleep. *Neurosci Biobehav Rev* 34, 387-407.
- Skinbjerg, M., Sibley, D. R., Javitch, J. A., Abi-Dargham, A., 2012. Imaging the high-affinity state of the dopamine D2 receptor *in vivo*: fact or fiction? *Biochem Pharmacol* 83, 193-198.
- Slater, P., Doyle, C. A., Deakin, J. F., 1998. Abnormal persistence of cerebellar serotonin-1A receptors in schizophrenia suggests failure to regress in neonates. *J Neural Transm (Vienna)* 105, 305-315.

- Sotelo, C., Cholley, B., El Mestikawy, S., Gozlan, H., Hamon, M., 1990. Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT_{1A} Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei. *Eur J Neurosci* 2, 1144-1154.
- Spies, M., Knudsen, G. M., Lanzenberger, R., Kasper, S., 2015. The serotonin transporter in psychiatric disorders: insights from PET imaging. *Lancet Psychiatry* 2, 743-755.
- Sprouse, J., Reynolds, L., Li, X., Braselton, J., Schmidt, A., 2004. 8-OH-DPAT as a 5-HT₇ agonist: phase shifts of the circadian biological clock through increases in cAMP production. *Neuropharmacology* 46, 52-62.
- Sprouse, J. S., Aghajanian, G. K., 1987. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse* 1, 3-9.
- Sprouse, J. S., Aghajanian, G. K., 1988. Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists: a comparative study with dorsal raphe neurons. *Neuropharmacology* 27, 707-715.
- Stahl, S. M., Sommer, B., Allers, K. A., 2011. Multifunctional pharmacology of flibanserin: possible mechanism of therapeutic action in hypoactive sexual desire disorder. *J Sex Med* 8, 15-27.
- Stark, J. A., Davies, K. E., Williams, S. R., Luckman, S. M., 2006. Functional magnetic resonance imaging and c-Fos mapping in rats following an anorectic dose of m-chlorophenylpiperazine. *Neuroimage* 31, 1228-1237.
- Stephenson, R. P., 1956. A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol Chemother* 11, 379-393.
- Steward, C. A., Marsden, C. A., Prior, M. J., Morris, P. G., Shah, Y. B., 2005. Methodological considerations in rat brain BOLD contrast pharmacological MRI. *Psychopharmacology (Berl)* 180, 687-704.
- Stewart, A., Huang, J., Fisher, R., 2012. RGS Proteins in heart: Brakes on the Vagus. *Front Physiol* 3, 95.
- Suehiro, M., Underwood, M., Arango, V., Wang, T. S., Kassir, S., Bakalian, M., Yatabe, T., Pratap, M., Van Heertum, R. L., Mann, J. J., 1998. *In vivo* biodistribution of a radiotracer for imaging serotonin-1A receptor sites with PET:[¹¹C]LY274601. *Life Sci* 63, 1533-1542.
- Sullivan, N. R., Crane, J. W., Damjanoska, K. J., Carrasco, G. A., D'Souza, D. N., Garcia, F., Van de Kar, L. D., 2005. Tansospirone activates neuroendocrine and ERK (MAP kinase) signaling pathways specifically through 5-HT_{1A} receptor mechanisms *in vivo*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371, 18-26.
- Sutton, A. C., O'Connor, K. A., Pilitsis, J. G., Shin, D. S., 2015. Stimulation of the subthalamic nucleus engages the cerebellum for motor function in parkinsonian rats. *Brain Struct Funct* 220, 3595-3609.
- Swaminath, G., Xiang, Y., Lee, T. W., Steenhuis, J., Parnot, C., Kobilka, B. K., 2004. Sequential binding of agonists to the beta₂ adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states. *J Biol Chem* 279, 686-691.
- Sweatt, J. D., 2004. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14, 311-317.

- Tada, K., Kasamo, K., Suzuki, T., Matsuzaki, Y., Kojima, T., 2004. Endogenous 5-HT inhibits firing activity of hippocampal CA1 pyramidal neurons during conditioned fear stress-induced freezing behavior through stimulating 5-HT_{1A} receptors. *Hippocampus* 14, 143-147.
- Tahmasian, M., Pasquini, L., Scherr, M., Meng, C., Forster, S., Mulej Bratec, S., Shi, K., Yakushev, I., Schwaiger, M., Grimmer, T., Diehl-Schmid, J., Riedl, V., Sorg, C., Drzezga, A., 2015. The lower hippocampus global connectivity, the higher its local metabolism in Alzheimer disease. *Neurology* 84, 1956-1963.
- Tampellini, D., 2015. Synaptic activity and Alzheimer's disease: a critical update. *Front Neurosci* 9, 423.
- Tavares, A., Becker, G., Barret, O., Morley, T., Alagille, D., Vacher, B., Newman-Tancredi, A., Tamagnan, G., Zimmer, L., 2013. Initial evaluation of [¹⁸F]F13714, a novel 5-HT_{1A} receptor agonist in non-human primates. Annual Congress of EANM.
- Thathiah, A., De Strooper, B., 2011. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12, 73-87.
- Thorell, J. O., Hedberg, M. H., Johansson, A. M., Hacksell, U., Stone-Elander, S., Eriksson, L., Ingvar, M., 1995. (R)-[N-¹¹C-methyl]-11-hydroxy-10-methylaporphine as a ligand for 5-HT_{1A} receptors: synthesis and evaluation of its biodistribution in monkey with PET. *J Label Compd Radiopharm* 44, S179.
- Tipre, D. N., Zoghbi, S. S., Liow, J. S., Green, M. V., Seidel, J., Ichise, M., Innis, R. B., Pike, V. W., 2006. PET imaging of brain 5-HT_{1A} receptors in rat *in vivo* with 18F-FCWAY and improvement by successful inhibition of radioligand defluorination with miconazole. *J Nucl Med* 47, 345-353.
- Toda, M., Abi-Dargham, A., 2007. Dopamine hypothesis of schizophrenia: making sense of it all. *Curr Psychiatry Rep* 9, 329-336.
- Tomiyama, M., Kimura, T., Maeda, T., Kannari, K., Matsunaga, M., Baba, M., 2005. A serotonin 5-HT_{1A} receptor agonist prevents behavioral sensitization to L-DOPA in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 52, 185-194.
- Tork, I., 1990. Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci* 600, 9-34; discussion 34-35.
- Truchot, L., Costes, N., Zimmer, L., Laurent, B., Le Bars, D., Thomas-Anterion, C., Mercier, B., Hermier, M., Vighetto, A., Krolak-Salmon, P., 2008. A distinct [¹⁸F]MPPF PET profile in amnesic mild cognitive impairment compared to mild Alzheimer's disease. *Neuroimage* 40, 1251-1256.
- Truchot, L., Costes, S. N., Zimmer, L., Laurent, B., Le Bars, D., Thomas-Anterion, C., Croisile, B., Mercier, B., Hermier, M., Vighetto, A., Krolak-Salmon, P., 2007. Up-regulation of hippocampal serotonin metabolism in mild cognitive impairment. *Neurology* 69, 1012-1017.
- Twarog, B. M., Page, I. H., 1953. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* 175, 157-161.
- Tyacke, R. J., Nutt, D. J., 2015. Optimising PET approaches to measuring 5-HT release in human brain. *Synapse* 69, 505-511.
- Udo de Haes, J. I., Bosker, F. J., Van Waarde, A., Pruijm, J., Willemsen, A. T., Vaalburg, W., Den Boer, J. A., 2002. 5-HT(1A) receptor imaging in the human brain: effect of tryptophan depletion and infusion on [(18)F]MPPF binding. *Synapse* 46, 108-115.

- Udo de Haes, J. I., Cremers, T. I., Bosker, F. J., Postema, F., Tiemersma-Wegman, T. D., den Boer, J. A., 2005. Effect of increased serotonin levels on [18F]MPPF binding in rat brain: fenfluramine vs the combination of citalopram and ketanserin. *Neuropsychopharmacology* 30, 1624-1631.
- Udo de Haes, J. I., Harada, N., Elsinga, P. H., Maguire, R. P., Tsukada, H., 2006. Effect of fenfluramine-induced increases in serotonin release on [18F]MPPF binding: a continuous infusion PET study in conscious monkeys. *Synapse* 59, 18-26.
- Valdizan, E. M., Castro, E., Pazos, A., 2010. Agonist-dependent modulation of G-protein coupling and transduction of 5-HT1A receptors in rat dorsal raphe nucleus. *Int J Neuropsychopharmacol* 13, 835-843.
- Vandecapelle, M., Dumont, F., De Vos, F., Strijckmans, K., Leysen, D., Audenaert, K., Dierckx, R., Slegers, G., 2004. Synthesis and preliminary *in vivo* evaluation of 4-[18F]fluoro-N-{2-[4-(6-trifluoromethylpyridin-2-yl)piperazin-1-yl]ethyl}benzamide, a potential PET radioligand for the 5-HT1A receptor. *J Label Compd Radiopharm* 47, 531-542.
- van der Ploeg, I., Cintra, A., Altiok, N., Askelof, P., Fuxe, K., Fredholm, B. B., 1991. Limited distribution of pertussis toxin in rat brain after injection into the lateral cerebral ventricles. *Neuroscience* 44, 205-214.
- van Goethem, N. P., Schreiber, R., Newman-Tancredi, A., Varney, M., Prickaerts, J., 2015. Divergent effects of the 'biased' 5-HT1 A receptor agonists F15599 and F13714 in a novel object pattern separation task. *Br J Pharmacol* 172, 2532-2543.
- Varga, V., Szekely, A. D., Csillag, A., Sharp, T., Hajos, M., 2001. Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. *Neuroscience* 106, 783-792.
- Verdurand, M., Berod, A., Le Bars, D., Zimmer, L., 2011. Effects of amyloid-beta peptides on the serotonergic 5-HT1A receptors in the rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 32, 103-114.
- Verdurand, M., Chauveau, F., Daoust, A., Morel, A. L., Bonnefoi, F., Liger, F., Berod, A., Zimmer, L., 2016. Differential effects of amyloid-beta 1-40 and 1-42 fibrils on 5-HT1A serotonin receptors in rat brain. *Neurobiol Aging* 40, 11-21.
- Verdurand, M., Zimmer, L., 2017. Hippocampal 5-HT1A receptor expression changes in prodromal stages of Alzheimer's disease: Beneficial or deleterious? *Neuropharmacology* 123, 446-454.
- Verge, D., Daval, G., Patey, A., Gozlan, H., el Mestikawy, S., Hamon, M., 1985. Presynaptic 5-HT autoreceptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT1A subtype. *Eur J Pharmacol* 113, 463-464.
- Vidal, B., Sebti, J., Verdurand, M., Fieux, S., Billard, T., Streichenberger, N., Troakes, C., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L., 2016. Agonist and antagonist bind differently to 5-HT1A receptors during Alzheimer's disease: A post-mortem study with PET radiopharmaceuticals. *Neuropharmacology* 109, 88-95.
- Visser, A. K., van Waarde, A., Willemsen, A. T., Bosker, F. J., Luiten, P. G., den Boer, J. A., Kema, I. P., Dierckx, R. A., 2011. Measuring serotonin synthesis: from conventional methods to PET tracers and their (pre)clinical implications. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38, 576-591.
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G.J., Baler, R., Telang, F., 2009. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology* 56 S1,3-8.

- Walther, D. J., Bader, M., 2003. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* 66, 1673-1680.
- Waterhouse, B. D., Mihailoff, G. A., Baack, J. C., Woodward, D. J., 1986. Topographical distribution of dorsal and median raphe neurons projecting to motor, sensorimotor, and visual cortical areas in the rat. *J Comp Neurol* 249, 460-476, 478-481.
- Watson, J., Collin, L., Ho, M., Riley, G., Scott, C., Selkirk, J. V., Price, G. W., 2000. 5-HT_{1A} receptor agonist-antagonist binding affinity difference as a measure of intrinsic activity in recombinant and native tissue systems. *Br J Pharmacol* 130, 1108-1114.
- Wedzony, K., Mackowiak, M., Czyrak, A., Fijal, K., Michalska, B., 1997. Single doses of MK-801, a non-competitive antagonist of NMDA receptors, increase the number of 5-HT_{1A} serotonin receptors in the rat brain. *Brain Res* 756, 84-91.
- Wehrl, H. F., Hossain, M., Lankes, K., Liu, C. C., Bezrukov, I., Martirosian, P., Schick, F., Reischl, G., Pichler, B. J., 2013. Simultaneous PET-MRI reveals brain function in activated and resting state on metabolic, hemodynamic and multiple temporal scales. *Nat Med* 19, 1184-1189.
- Weinstein, D., Magnuson, D., Lee, J., 1996. Altered G-protein coupling of a frontal cortical low affinity [3H]8-hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin serotonergic binding site in Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 73, 325-329.
- Wey, H. Y., Catana, C., Hooker, J. M., Dougherty, D. D., Knudsen, G. M., Wang, D. J., Chonde, D. B., Rosen, B. R., Gollub, R. L., Kong, J., 2014. Simultaneous fMRI-PET of the opioidergic pain system in human brain. *Neuroimage* 102 Pt 2, 275-282.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Clarke, C., Azmitia, E. C., 1993. Localization of 5-HT_{1A} receptors to astroglial cells in adult rats: implications for neuronal-glia interactions and psychoactive drug mechanism of action. *Synapse* 14, 201-205.
- Wiklund, L., Leger, L., Persson, M., 1981. Monoamine cell distribution in the cat brain stem. A fluorescence histochemical study with quantification of indolaminergic and locus coeruleus cell groups. *J Comp Neurol* 203, 613-647.
- Wurch, T., Colpaert, F. C., Pauwels, P. J., 2003. Mutation in a protein kinase C phosphorylation site of the 5-HT_{1A} receptor preferentially attenuates Ca²⁺ responses to partial as opposed to higher-efficacy 5-HT_{1A} agonists. *Neuropharmacology* 44, 873-881.
- Xu, Z., Reynolds, G. P., Yuan, Y., Shi, Y., Pu, M., Zhang, Z., 2016. TPH-2 Polymorphisms Interact with Early Life Stress to Influence Response to Treatment with Antidepressant Drugs. *Int J Neuropsychopharmacol* 19.
- Yan, F., Mosier, P. D., Westkaemper, R. B., Roth, B. L., 2008. Galpha-subunits differentially alter the conformation and agonist affinity of kappa-opioid receptors. *Biochemistry* 47, 1567-1578.
- Yao, X., Parnot, C., Deupi, X., Ratnala, V. R., Swaminath, G., Farrens, D., Kobilka, B., 2006. Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta₂-adrenoceptor. *Nat Chem Biol* 2, 417-422.
- Yokoyama, C., Mawatari, A., Kawasaki, A., Takeda, C., Onoe, K., Doi, H., Newman-Tancredi, A., Zimmer, L., Onoe, H., 2016. Marmoset Serotonin 5-HT_{1A} Receptor Mapping with a Biased Agonist PET Probe 18F-F13714: Comparison with an Antagonist Tracer 18F-MPPF in Awake and Anesthetized States. *Int J Neuropsychopharmacol* 19.

Zhang, K., Zhu, Y., Zhu, Y., Wu, S., Liu, H., Zhang, W., Xu, C., Zhang, H., Hayashi, T., Tian, M., 2016. Molecular, Functional, and Structural Imaging of Major Depressive Disorder. *Neurosci Bull* 32, 273-285.

Zhang, X., Beaulieu, J. M., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., 2006. Functional polymorphisms of the brain serotonin synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase-2. *Cell Mol Life Sci* 63, 6-11.

Zhou, L., Bohn, L. M., 2014. Functional selectivity of GPCR signaling in animals. *Curr Opin Cell Biol* 27, 102-108.

Zimmer, L., Fournet, G., Benoit, J., Guillaumet, G., Le Bars, D., 2003. Carbon-11 labelling of 8[[3-[4-(2-[(11)C]methoxyphenyl)piperazin-1-yl]-2-hydroxypropyl]oxy]thiochroman, a presynaptic 5-HT(1A) receptor agonist, and its *in vivo* evaluation in anaesthetised rat and in awake cat. *Nucl Med Biol* 30, 541-546.

Zimmer, L., Le Bars, D., 2013. Current status of positron emission tomography radiotracers for serotonin receptors in humans. *J Labelled Comp Radiopharm* 56, 105-113.

Zimmer, L., Luxen, A., 2012. PET radiotracers for molecular imaging in the brain: past, present and future. *Neuroimage* 61, 363-370.

Zimmer, L., Luxen, A., Giacomelli, F., Pujol, J. F., 2002. Short- and long-term effects of p-ethynylphenylalanine on brain serotonin levels. *Neurochem Res* 27, 269-275.

Zimmer, L., Mauger, G., Le Bars, D., Bonmarchand, G., Luxen, A., Pujol, J. F., 2002. Effect of endogenous serotonin on the binding of the 5-HT1A PET ligand 18F-MPPF in the rat hippocampus: kinetic beta measurements combined with microdialysis. *J Neurochem* 80, 278-286.