



**HAL**  
open science

# Le récepteur 5-HT6 et la dynamique de son réceptosome : rôle dans la différenciation neuronale et potentiel thérapeutique pour le traitement des troubles du spectre de l'autisme

Camille Pujol

► **To cite this version:**

Camille Pujol. Le récepteur 5-HT6 et la dynamique de son réceptosome : rôle dans la différenciation neuronale et potentiel thérapeutique pour le traitement des troubles du spectre de l'autisme. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT059 . tel-02500094

**HAL Id: tel-02500094**

**<https://theses.hal.science/tel-02500094>**

Submitted on 5 Mar 2020

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

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

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Neurosciences

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé CBS2  
Unité de recherche : Institut de Génomique Fonctionnelle

## Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et la dynamique de son réceptosome : Rôle dans la différenciation neuronale et potentiel thérapeutique pour le traitement des troubles du spectre de l'autisme

Présentée par Camille PUJOL  
Le 26 Juin 2018

Sous la direction de Philippe Marin  
et Séverine Chaumont-Dubel

Devant le jury composé de

|  |                        |
|--|------------------------|
| Laurence LANFUMEY, directrice de recherche, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Paris        | Rapporteur             |
| Zsolt LENKEI, directeur de recherche, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Paris              | Rapporteur             |
| Séverine MORISSET-LOPEZ, chargée de recherche, Centre de Biophysique Moléculaire, Orléans        | Examineur              |
| Fabrice ANGO, directeur de recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier           | Examineur              |
| Philippe MARIN, directeur de recherche, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier         | Directeur de thèse     |
| Séverine CHAUMONT-DUBEL, maître de conférences, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier | Co-directrice de thèse |



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

# Remerciements

Une thèse c'est beaucoup d'expériences scientifiques et de temps passé à la paillasse, mais c'est également une expérience humaine riche en échanges et en rencontres. Ainsi, en plus de 3 ans et demi de thèse, j'ai croisé un grand nombre de personnes qui m'ont accompagnée et épaulée, et que je tiens à remercier.

Tout d'abord, je remercie mes directeurs de thèse, Philippe Marin et Séverine Chaumont-Dubel. Philippe je vous remercie pour m'avoir accueillie dans votre équipe et permis de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions. Je vous remercie aussi pour m'avoir encadrée et avoir toujours su être présent quand il le fallait. Je vous remercie également d'autant vous soucier de vos étudiants et du bon déroulement de leur thèse, et ce malgré vos multiples responsabilités.

Je remercie également ma directrice de thèse, Séverine Chaumont-Dubel, pour m'avoir fait partager son expertise scientifique, m'avoir appris la rigueur, l'organisation et guidée vers l'autonomie. J'ai particulièrement apprécié de pouvoir me former à autant de techniques différentes, tu as toujours été là pour répondre à mes questions, Séverine, merci pour tout.

Séverine et Philippe, je vous remercie aussi énormément de m'avoir donnée la liberté d'élaborer un projet aventureux sur l'autisme, c'est une belle preuve de confiance, et je vous en suis très reconnaissante. Enfin, je vous remercie tous deux d'avoir relu avec tant d'attention mon manuscrit de thèse.

Je tiens également à remercier les Drs. Julie Le Merrer et Jérôme Becker, qui m'ont suivie durant tout mon master, puis tout au long de ma thèse lors de mes comités et m'ont finalement accueillie dans leur labo pour réaliser ces expériences de comportement auxquelles je tenais tant ! A vous deux merci pour tout !! Un grand merci également à toute la team DRUGS, qui m'a réservé un accueil chaleureux lors de mon séjour tourangeau.

Je remercie Solange Desagher, qui m'a suivie avec beaucoup de bienveillance et d'implication durant toute ma thèse au fil de mes comités. De même je remercie Fabrice Ango, d'avoir participé à mes comités, de m'avoir fait partager son expertise en neurodéveloppement et d'avoir toujours été là pour répondre à mes petites questions intempestives !

Je remercie Laurence Lalanne-Tongio pour m'avoir donné la chance de travailler avec elle à la rédaction de revues ! Ça a été une expérience riche, formatrice et fructueuse ! Merci pour tes conseils et merci pour ta confiance !

Bien entendu une expérience de thèse ne serait pas la même sans les autres thésards, je remercie donc toute la team étudiants/post docs de l'équipe et de l'IGF. Et bien sûr en particulier Samy. Samy, à bien des égards tu as été mon frère de thèse. Il me faudrait probablement d'ailleurs toute une thèse rien que pour te remercier. On a eu le même concours, commencé notre thèse en même temps, avec la même bourse et parcouru toutes les tribulations de la thèse ensemble. Depuis le début tu as été là pour moi. Pour ton aide et ton soutien constant, un grand merci ! Tu as été plus qu'un collègue, un véritable ami, sans toi la thèse ça n'aurait pas été pareil donc vraiment, du fond du cœur merci Samy !

Geoffrey, j'ai été ravie de t'avoir comme voisin de bureau ! Tu as été un peu comme mon grand frère de thèse, pour nos discussions, tes conseils, ta présence, un grand merci !! Pédro, je te remercie également énormément ! Toi aussi tu es un grand frère scientifique ! Tu m'as guidée et si j'en suis arrivée là c'est beaucoup grâce à toi, merci pour tout !

Je remercie également tous les petits thésards qui sont arrivés en force cette année ! Vous avez apporté de la fraîcheur, de l'enthousiasme et de la bonne humeur dans l'équipe, et la vieille 4<sup>ème</sup> année que je suis vous en est très reconnaissante ! A vous tous je vous souhaite le meilleur ! Vincent, merci d'avoir réussi le concours de l'ED et d'être arrivé pour prendre la relève. C'est agréable d'être à deux sur un projet qui se termine, et de savoir qu'il y a quelqu'un pour reprendre le schmilblick. Je te souhaite une très belle thèse, des manips qui marchent des découvertes de folie, plein de publis, bref le meilleur. Si tu as des questions ou juste envie de discuter, que je sois à l'autre bout de la France ou du monde, je serai toujours là, hésites pas.

Je remercie aussi tous les post-docs de l'équipe Marin pour leurs conseils bienveillants ! Mahdy, je te remercie pour ta bonne humeur, ton humour, ton dynamisme, nos petites discussion comportement. J'ai adoré ta personnalité haute en couleurs, je suis ravie d'avoir fait ta connaissance et que nous soyons depuis devenus amis ! Merci merci merci ! Patrizia, j'ai eu beaucoup de plaisir à faire ta connaissance, tu étais le petit soleil du labo, pour ta présence, ta douceur, ton sourire, mille mercis !

Emilie !! Ma camarade de comportement ! Merci pour tes conseils pour la thèse qui m'ont été bien utiles ! Dès ton arrivée tu as ajouté une touche chaleureuse au labo ! Merci pour tout et j'espère que nous resterons en contact ! En tout cas je te souhaite tout le meilleur pour la suite ! Simon, le dernier arrivé de la team postdoc ! Merci pour tes conseils, ton écoute, ta présence !

Je remercie également ma petite stagiaire. Léonie, tu as toujours été au top ! Des stagiaires comme toi il n'y en a pas deux ! J'ai été ravie de pouvoir suivre ton évolution au fil de ces trois années et pour la suite, que ce soit au Canada ou ailleurs, je te souhaite le meilleur !

Franck, je te remercie pour ta bonne humeur, tes conseils et nos diverses discussions autour d'un thé. Je remercie Sylvie, Carine et Elisabeth qui ont toujours été là pour me donner des conseils avisés quand j'en avais besoin. Edith, je te remercie également pour ta présence réconfortante, je n'oublierais pas notre petit coin thé dont je suis très fière !

Je remercie également Rémy Sounier et Muriel Asari avec qui je me suis lancée dans l'aventure SP'IN qui a été très enrichissante. Je remercie le personnel de la laverie pour leur gentillesse et leur disponibilité, et Céline pour nos petites discussions, quand je passais par là laver ma tasse de thé...

Enfin, je remercie toute ma famille et mes amis pour m'avoir soutenue et supportée. En particulier, je n'aurais pas pu réaliser cette thèse sans le soutien indéfectible de mon fiancé Steve. Pour avoir été présent et à l'écoute, pour avoir supporté mes horaires un peu extrêmes, et mes changements d'humeurs souvent dépendants de la réussite des expériences, pendant toutes ces années, je ne te remercierai jamais assez. Marion, mon amie et sœur de thèse Strasbourgeoise ! Du master jusqu'à la thèse, ta présence a été très importante pour moi, merci pour tout et bon courage pour ta soutenance qui va suivre de près la mienne ... Les filles, Po, Vi, merci pour avoir ponctué ma thèse de petites parenthèses de détente, de rires, des moments enchantés qui ont été véritablement salvateurs. Vi, merci pour ton soutien, pour l'impression, ça a beaucoup compté pour moi. Merci aussi de m'avoir permis de valoriser mon travail par une note artistique, j'ai adoré !

Pour conclure, une thèse finalement c'est un travail d'équipe ! Merci à toutes les personnes qui m'ont entourée de près ou de loin et ont contribué à rendre cette expérience inoubliable.

# Résumé

## Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et la dynamique de son réceptosome : Rôle dans la différenciation neuronale et potentiel thérapeutique pour le traitement des troubles du spectre autistique

MOTS CLEFS : RECEPTEUR 5-HT<sub>6</sub> ; GPRIN1 ; NEURODEVELOPPEMENT ; TROUBLES DU SPECTRE DE L'AUTISME

Les symptômes cognitifs retrouvés dans différentes pathologies neurodéveloppementales comme la schizophrénie ou l'autisme sont très handicapants et leur prise en charge est toujours très insuffisante. En conséquence, il y a un besoin urgent de nouvelles approches thérapeutiques. Ces déficits cognitifs pourraient résulter d'anomalies des processus neurodéveloppementaux. Ces dernières années, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> a émergé comme une cible thérapeutique prometteuse pour ces pathologies du fait de son expression précoce au cours du développement, son impact sur différents processus neurodéveloppementaux clés comme la migration neuronale et la pousse neuritique et des effets pro-cognitifs des antagonistes du récepteur dans différents paradigmes expérimentaux de cognition. Afin de caractériser les substrats moléculaires de l'impact du récepteur sur la cognition et le développement neuronal, notre équipe a identifié grâce à des stratégies de protéomique l'interactome du récepteur. Ces études fonctionnelles ont par la suite montré que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> joue un rôle crucial dans la migration et le positionnement des neurones, ainsi que dans l'initiation de la croissance des neurites, *via* son interaction avec Cdk5. Parmi ces partenaires, nous avons également identifié la protéine GPRIN1, un substrat de Cdk5 connu pour favoriser la pousse neuritique. Mon travail de thèse a permis de caractériser l'effet de l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et GPRIN1 sur l'activité constitutive du récepteur et la différenciation neuronale dans une lignée cellulaire de neuroblastome (NG108-15) utilisée comme modèle de différenciation neuronale. J'ai montré que GPRIN1 interagit avec les 22 acides aminés N-terminaux du domaine C-terminal du récepteur *via* un mécanisme dépendant de la protéine Gs et contrôlé par la phosphorylation de la Ser<sup>350</sup> du récepteur par Cdk5 et ai ainsi mis en évidence une dynamique d'interaction entre le récepteur et Cdk5 d'une part, et GPRIN1 d'autre part. J'ai par la suite montré que l'association de la GPRIN1 au récepteur stabilise le récepteur dans une conformation capable d'activer constitutivement la voie Gs et présentant une affinité réduite pour les agonistes inverses. Cette interaction augmente également la longueur et la ramification des neurites aussi bien dans les cellules NG108-15 que dans des cultures primaires de neurones issus d'embryons de souris. Les effets de GPRIN1 sur la différenciation neuronale induite par le récepteur dépendent d'une activation agoniste-indépendante de la voie Gs/AMPC/PKA. L'ensemble de mes résultats montrent que la différenciation neuronale sous le contrôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dépend d'une séquence complexe d'évènements de signalisation dépendant de son association successive à Cdk5 et GPRIN1 : l'interaction 5-HT<sub>6</sub>-Cdk5 est impliquée dans l'initiation de la pousse neuritique alors que l'interaction 5-HT<sub>6</sub>-GPRIN1 favorise la croissance et la complexification des dendrites. J'ai enfin mis en évidence dans un modèle préclinique d'autisme, la souris invalidée pour le récepteur Mu des opioïdes (*Oprm1*<sup>-/-</sup>), le potentiel thérapeutique d'un antagoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub> pour améliorer les troubles du comportement liés à l'autisme. Globalement, ma thèse souligne l'importance du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et de la dynamique de son interactome dans la différenciation et connectivité neuronale et ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour la prise en charge des troubles psychiatriques d'origine neurodéveloppementale comme l'autisme.

# Abstract

## The 5-HT<sub>6</sub> receptor and the dynamics of its receptorosome: Role in Neuronal Differentiation and Therapeutic Potential for the Treatment of Autism Spectrum Disorders

KEY WORDS: 5-HT<sub>6</sub> RECEPTOR; GPRIN1; NEURODEVELOPMENT; AUTISM SPECTRUM DISORDERS

Cognitive symptoms observed in neurodevelopmental pathologies such as schizophrenia or autism spectrum disorders are highly debilitating and poorly controlled by currently available treatments. Accordingly, there is still an urgent need for new therapeutic approaches. It has become clear in the last few years that these cognitive deficits are caused by neurodevelopmental alterations. The 5-HT<sub>6</sub> receptor has emerged as one promising targets for the treatment of these deficits in light of its early expression during brain development, its role in key neurodevelopmental processes such as neuronal migration and neurite growth and the pro-cognitive effects of antagonists in various cognitive tasks in rodents. In order to identify novel molecular substrates of the control of cognition and neural development by 5-HT<sub>6</sub> receptors, our team has recently characterized the receptor interactome thanks to complementary proteomic strategies. Further functional studies revealed that the Cdk5 pathway under the control of 5-HT<sub>6</sub> receptor plays a crucial role in the migration and positioning of cortical pyramidal neurons as well as in the initiation of neurite outgrowth. The new protein partners of the receptor identified also include G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1 (GPRIN1), a Cdk5 substrate known to promote neurite outgrowth. This thesis aims at characterizing the impact of the 5-HT<sub>6</sub> receptor/GPRIN1 interaction upon receptor activity and neuronal differentiation in a neuroblastoma cell line (NG108-15 cells) commonly used as a cellular model for studying molecular mechanisms underlying neuronal differentiation. I showed that GPRIN1 interacts with a receptor sequence comprising the 22 N-terminal residues of its C-terminal domain *via* a mechanism depending on its association with activated G $\alpha$ s protein and regulated by receptor phosphorylation at Ser350 by Cdk5, thus demonstrating that the receptor recruits either Cdk5 or GPRIN1 in a dynamic manner. I then showed that the physical interaction between GPRIN1 and the 5-HT<sub>6</sub> receptor stabilizes an active receptor conformation able to activate Gs and the production of cAMP in an agonist-independent manner and exhibiting a low apparent affinity for inverse agonists. This interaction also promotes neurite extension and branching both in NG108-15 cells and primary cultured neurons originating from different regions of the mouse brain. These effects upon neuronal differentiation are mediated by agonist-independent activation of the Gs/adenylyl cyclase/PKA pathway. Collectively, my results indicate that neuronal differentiation under the control of 5-HT<sub>6</sub> receptors requires a complex sequence of signaling mechanisms that depends on the sequential association of the receptor with Cdk5 and GPRIN1: while the 5-HT<sub>6</sub>/Cdk5 interaction is required for the initiation of neurite growth, neurite extension and branching depends on receptor association with GPRIN1. Finally, I demonstrated that sub-chronic administration to mice depleted of Mu opioid receptor (*Oprm1*<sup>-/-</sup> mice, preclinical model of autism spectrum disorders - ASDs -) improves a range of primary symptoms, including alteration of social cognition and stereotypic behaviors, suggesting that 5-HT<sub>6</sub> receptor blockade might be a relevant strategy for the treatment of some behavioral symptoms in ASDs. Collectively, this thesis highlights the role of the 5-HT<sub>6</sub> receptor interactome and of its dynamics in neuronal differentiation and the establishment of neuronal connectivity and opens new perspectives for the treatment of psychiatric disorders of neuro-developmental origin, such as ASDs.

# Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCTION.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>CHAPITRE I : LE RECEPTEUR 5-HT<sub>6</sub> DE LA SEROTONINE : UN ACTEUR CLEF DU SYSTEME SEROTONINERGIQUE.....</b>                 | <b>16</b> |
| <b>I. LA SEROTONINE .....</b>  | <b>16</b> |
| a. <i>Histoire de la découverte de la sérotonine.....</i>  | <i>16</i> |
| b. <i>Métabolisme de la sérotonine .....</i>   | <i>17</i> |
| c. <i>Distribution des neurones sérotoninergiques .....</i>  | <i>20</i> |
| d. <i>Principales fonctions centrales de la sérotonine à l'âge adulte .....</i>  | <i>22</i> |
| <b>II. LES RECEPTEURS DE LA SEROTONINE .....</b>   | <b>24</b> |
| a. <i>Histoire de leur découverte .....</i>  | <i>24</i> |
| b. <i>Classification et couplages canoniques des récepteurs de la sérotonine.....</i>  | <i>24</i> |
| c. <i>Régulation de l'activité fonctionnelle des récepteurs sérotoninergiques métabotropiques.....</i>                               | <i>26</i> |
| <b>III. LE RECEPTEUR 5-HT<sub>6</sub> DE LA SEROTONINE ET SON RECEPTOSOME.....</b>   | <b>28</b> |
| a. <i>Distribution du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.....</i>  | <i>30</i> |
| b. <i>Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et ses voies de signalisation .....</i>  | <i>33</i> |
| <b>CHAPITRE II : LE RECEPTEUR 5-HT<sub>6</sub> DE LA SEROTONINE : UN ACTEUR CLEF DU NEURODEVELOPPEMENT .....</b>                     | <b>39</b> |
| <b>I. LES GRANDES ETAPES DU DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX.....</b>  | <b>39</b> |
| a. <i>Formation des vésicules cérébrales.....</i>  | <i>39</i> |
| b. <i>Les grandes étapes de la différenciation neuronale .....</i>   | <i>40</i> |
| c. <i>Les acteurs cellulaires du développement du système nerveux.....</i>   | <i>43</i> |
| <b>II. LES FONCTIONS DE LA SEROTONINE ET DU RECEPTEUR 5-HT<sub>6</sub> DANS LE DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX .....</b>            | <b>44</b> |
| a. <i>Prolifération des progéniteurs neuronaux .....</i>   | <i>44</i> |
| b. <i>Migration neuronale.....</i>   | <i>49</i> |
| c. <i>Différenciation des neuroblastes .....</i>   | <i>54</i> |
| d. <i>Epines dendritiques et plasticité synaptique.....</i>  | <i>58</i> |
| <b>III. GPRIN1 UN PARTENAIRE PROMETTEUR DU RECEPTEUR 5-HT<sub>6</sub>.....</b>   | <b>59</b> |
| <b>IV. LE RECEPTEUR 5HT<sub>6</sub> : ROLE DANS LA PATHOGENESE DES MALADIES PSYCHIATRIQUES D'ORIGINE NEURODEVELOPPEMENTALE .....</b> | <b>63</b> |
| <b>CHAPITRE III : LE RECEPTEUR 5-HT<sub>6</sub> DE LA SEROTONINE : ROLES PHYSIOLOGIQUES ET CIBLE THERAPEUTIQUE.....</b>              | <b>66</b> |
| <b>I. LE RECEPTEUR 5-HT<sub>6</sub> DANS LE COMPORTEMENT NORMAL ET PATHOLOGIQUE .....</b>  | <b>66</b> |
| a. <i>Rôle dans les fonctions cognitives.....</i>  | <i>66</i> |
| b. <i>Rôle dans la récompense .....</i>  | <i>71</i> |
| c. <i>Rôle dans le comportement social .....</i>   | <i>73</i> |
| d. <i>Rôle dans régulation de l'humeur.....</i>  | <i>73</i> |
| e. <i>Rôle dans la prise alimentaire.....</i>  | <i>74</i> |
| <b>II. ROLE DANS LA MODULATION DE LA NEUROTRANSMISSION.....</b>  | <b>75</b> |
| a. <i>Transmission cholinergique.....</i>  | <i>75</i> |
| b. <i>Transmissions glutamatergique et GABAergique .....</i>   | <i>76</i> |



|   |            |
|---|------------|
| c. Transmission monoaminergique.....  | 77         |
| <b>III. LE PARADOXE DES LIGANDS DU RECEPTEUR 5-HT<sub>6</sub>.....</b>  | <b>77</b>  |
| <b>CHAPITRE IV : SEROTONINE ET TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUE .....</b>   | <b>80</b>  |
| <b>I. GENERALITES SUR LES TROUBLES DU SPECTRE DE L'AUTISME .....</b>  | <b>80</b>  |
| a. Symptômes, signes cliniques et biomarqueurs .....  | 80         |
| b. Thérapies existantes .....   | 82         |
| c. Théories étiologiques .....  | 84         |
| d. Modélisation des TSA.....  | 89         |
| <b>II. LA SEROTONINE DANS LES TSA .....</b>   | <b>92</b>  |
| a. Quelles évidences de l'implication de la sérotonine dans les TSA ? .....   | 92         |
| b. Sérotonine et modélisation des TSA.....  | 93         |
| c. Ocytocine, sérotonine et comportement social .....   | 94         |
| <b>OBJECTIFS .....</b>  | <b>98</b>  |
| <b>MATERIEL ET METHODES .....</b>   | <b>100</b> |
| <b>I. TECHNIQUES D'ETUDE MOLECULAIRES ET CELLULAIRES .....</b>  | <b>101</b> |
| <b>II. ANALYSES COMPORTEMENTALES.....</b>   | <b>106</b> |
| <b>III. ANALYSE STATISTIQUE.....</b>  | <b>110</b> |
| <b>RESULTATS.....</b>   | <b>111</b> |
| <b>CHAPITRE I : L'INTERACTION DYNAMIQUE ENTRE LE RECEPTEUR 5-HT<sub>6</sub> ET SES PARTENAIRES PROTEIQUES FAÇONNE</b>   |            |
| <b>L'ARCHITECTURE DE L'ARBORISATION DENDRITIQUE.....</b>  | <b>112</b> |
| a. Le récepteur 5-HT <sub>6</sub> interagit avec la protéine GPRIN1 in vivo.....  | 112        |
| b. Dynamique temporelle des interactions 5-HT <sub>6</sub> -Cdk5 et 5-HT <sub>6</sub> -GPRIN1 dans les cellules NG 108-15 .....   | 113        |
| c. La phosphorylation du récepteur 5-HT <sub>6</sub> : Rôle dans la dynamique d'interaction entre GPRIN1 et Cdk5 .....  | 117        |
| d. L'association de GPRIN1 avec le récepteur 5-HT <sub>6</sub> requiert le domaine C-terminal et la protéine Gas .....  | 118        |
| e. GPRIN1 augmente l'activité constitutive Gs du récepteur 5-HT <sub>6</sub> .....  | 121        |
| f. L'activité Gs du récepteur 5-HT <sub>6</sub> et GPRIN1 : un dialogue bidirectionnel ?.....   | 124        |
| g. L'interaction de GPRIN1 avec le récepteur 5-HT <sub>6</sub> favorise l'élongation et la ramification de l'arborisation dendritique à 48h dans les cellules NG 108-15 ..... | 125        |
| h. Rôle de la dynamique d'association de Cdk5 et GPRIN1 avec le récepteur 5-HT <sub>6</sub> dans la différenciation neuronale.<br>127   |            |
| i. La pousse neuritique dépend de l'activation agoniste-indépendante de la voie Gs par le récepteur 5-HT <sub>6</sub> .....   | 129        |
| j. La complexification de l'arborisation dendritique induite par GPRIN1 est dépendante de la PKA dans les cellules NG108-15.....  | 131        |
| k. L'interaction de GPRIN1 avec le récepteur 5-HT <sub>6</sub> favorise l'extension et la ramification des dendrites dans les neurones en culture primaire.....               | 133        |
| <b>CHAPITRE II : L'INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DU RECEPTEUR 5-HT<sub>6</sub> RESTAURE LES SYMPTOMES PRIMAIRES DANS UN MODELE MURIN D'AUTISME. ....</b>                         | <b>138</b> |
| a. Le SB258585 améliore le comportement social chez les souris Oprm1 <sup>-/-</sup> .....   | 139        |
| b. Le SB258585 diminue l'inflexibilité cognitive et les stéréotypies motrices chez les souris Oprm1 <sup>-/-</sup> .....  | 143        |
| c. Le SB258585 restaure l'apprentissage moteur chez les souris Oprm1 <sup>-/-</sup> et augmente les performances motrices des souris Oprm1 <sup>+/+</sup> .....               | 147        |
| d. Le SB258585 supprime l'allodynie des souris Oprm1 <sup>-/-</sup> .....   | 148        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>   | <b>150</b> |
| <b>I. L'INTERACTION DYNAMIQUE ENTRE LE RECEPTEUR 5-HT<sub>6</sub> ET SES PARTENAIRES PROTEIQUES FAÇONNE L'ARCHITECTURE DE L'ARBORISATION DENDRITIQUE.....</b>   | <b>150</b> |
| <i>a. Interaction physique entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et GPRIN1 : un acteur clef modulant son activité .....</i>   | <i>150</i> |
| <i>b. GPRIN1 amplifie l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> vis-à-vis de la voie Gs.....</i>  | <i>151</i> |
| <i>c. La conformation du récepteur module son interaction avec ses partenaires et son activité constitutive.....</i>  | <i>152</i> |
| <i>d. L'elongation et la ramification de l'arborisation dendritique est dépendante de l'activité constitutive Gs du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et du recrutement de la PKA dans les cellules NG 108-15.....</i> | <i>155</i> |
| <i>e. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et la dynamique de son interactome contrôle la succession des étapes de la différenciation neuronale.....</i>   | <i>156</i> |
| <i>f. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le développement de l'arborisation dendritique.....</i>  | <i>161</i> |
| <i>g. D'autres partenaires prometteurs .....</i>  | <i>162</i> |
| <i>h. Hyperserotoninergie, troubles du spectre de l'autisme et récepteur 5-HT<sub>6</sub> ? .....</i>   | <i>165</i> |
| <b>II. POTENTIEL THERAPEUTIQUE DU RECEPTEUR 5-HT<sub>6</sub> DANS LE TRAITEMENT DES TSA .....</b>   | <b>169</b> |
| <i>a. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, un rôle dans la récompense ?.....</i>  | <i>169</i> |
| <i>b. Généralisation à d'autres modèles de TSA ?.....</i>   | <i>171</i> |
| <i>c. Quels mécanismes moléculaires sous-tendent les effets comportementaux du SB258585 ? .....</i>   | <i>172</i> |
| <i>d. Un pas vers la clinique : tester l'intépidine .....</i>   | <i>172</i> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>  | <b>174</b> |
| <b>ANNEXES.....</b>   | <b>193</b> |
| <b>ANNEXE 1 : TABLEAUX RECAPITULATIFS DES DONNEES STATISTIQUES .....</b>  | <b>194</b> |
| <b>ANNEXE 2 : PUBLICATIONS .....</b>  | <b>212</b> |
| <b>COGNITIVE EFFECTS OF LABELED ADDICTOLYTIC MEDICATIONS .....</b>  | <b>215</b> |
| <b>DELTA OPIOID RECEPTORS : LEARNING AND MOTIVATION. ....</b>   | <b>219</b> |

# Table des illustrations

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1- Métabolisme de la sérotonine et signalisation sérotoninergique .....   | 19  |
| Figure 2- Développement et localisation des projections sérotoninergiques.....   | 21  |
| Figure 3- Les récepteurs de la sérotonine et leurs couplages canoniques.....   | 25  |
| Figure 4- Structure du récepteur 5-HT <sub>6</sub> humain et résumé des résidus importants pour son activité fonctionnelle.....                                    | 29  |
| Figure 5- Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur du récepteur 5-HT <sub>6</sub> .....  | 32  |
| Figure 6- Voies de signalisations associées au récepteur 5-HT <sub>6</sub> .....   | 36  |
| Figure 7- Chronologie du développement du système nerveux central.....   | 40  |
| Figure 8- Parallèle entre la différenciation du neurone <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....  | 42  |
| Figure 9- Sources de sérotonine durant le développement.....   | 45  |
| Figure 10- L'invalidation du récepteur 5-HT <sub>6</sub> restaure les anomalies développementales induites par l'élévation du taux de sérotonine.....              | 47  |
| Figure 11- La voie 5-HT <sub>6</sub> /Cdk5 contrôle la migration des neurones pyramidaux.....  | 53  |
| Figure 12- L'interaction de Cdk5 avec le récepteur 5-HT <sub>6</sub> promeut l'initiation de la pousse neuritique.....   | 57  |
| Figure 13- Expression de GPRIN1 durant le développement.....   | 60  |
| Figure 14- L'inhibition pharmacologique du récepteur 5-HT <sub>6</sub> corrige les déficits cognitifs dans des modèles développementaux de schizophrénie.....      | 70  |
| Figure 15- Hypothèse mécanistique des effets pro cognitifs de l'inhibition pharmacologique du récepteur 5-HT <sub>6</sub> .....                                    | 78  |
| Figure 16- Diagnostic de troubles du spectre de l'autisme et principaux traitements.....   | 83  |
| Figure 17- Déficit d'activation du système de récompense en regard de stimuli sociaux chez les patients avec TSA.....  | 88  |
| Figure 18- l'action coordonnée de l'ocytocine et de la sérotonine dans le noyau accumbens (Nac) promeut la récompense sociale.....                                 | 97  |
| Figure 19- GPRIN1 un nouvel interacteur du récepteur 5-HT <sub>6</sub> .....   | 112 |
| Figure 20 Les interactions de GPRIN1 et Cdk5 avec le récepteur suivent une dynamique temporelle.....   | 114 |
| Figure 21- L'expression de 5-HT <sub>6</sub> , GPRIN1 et Cdk5 évolue au cours du temps.....  | 116 |
| Figure 22- La phosphorylation du récepteur sur la Ser350 module l'interaction entre le récepteur 5-HT <sub>6</sub> et GPRIN1.....                                  | 117 |
| Figure 23- L'interaction entre GPRIN1 et le récepteur 5-HT <sub>6</sub> requiert le domaine C-terminal et l'interaction avec la protéine Gs.....                   | 120 |
| Figure 24- GPRIN1 augmente l'activité constitutive du récepteur 5-HT <sub>6</sub> à la signalisation Gs / cAMP.....  | 121 |
| Figure 25- GPRIN1 n'a pas d'effet sur l'expression membranaire du récepteur 5-HT <sub>6</sub> .....  | 122 |
| Figure 26- La mutation du résidu W281 abolit les effets de GPRIN1 sur l'activité constitutive du récepteur 5-HT <sub>6</sub> .....                                 | 123 |
| Figure 27- GPRIN1 augmente l'interaction du récepteur 5-HT <sub>6</sub> avec la protéine Gs.....   | 124 |
| Figure 28- L'interaction de GPRIN1 avec le récepteur 5-HT <sub>6</sub> augmente la pousse et la densification de l'arborisation dendritique à 48h.....             | 126 |
| Figure 29- La phosphorylation du récepteur 5-HT <sub>6</sub> à la sérine 350 inhibe la pousse et la densification de l'arborisation dendritique à 48h.....         | 128 |
| Figure 30- La pousse neuritique dépend de l'activité constitutive Gs du récepteur 5-HT <sub>6</sub> à 48h.....   | 130 |
| Figure 31 - Le SB271046 inhibe les effets de GPRIN1 sur la pousse neuritique de façon dose dépendante.....   | 131 |
| Figure 32 - La complexification de l'arborisation dendritique induite par GPRIN1 à 48h est dépendant de la PKA dans les cellules NG 108-15.....                    | 132 |
| Figure 33 - l'interaction entre le récepteur 5-HT <sub>6</sub> et GRPIN1 est nécessaire pour l'élongation des neurites dans les cultures primaires neuronales..... | 134 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 34- L'interaction entre le récepteur 5-HT <sub>6</sub> et GRPIN1 est nécessaire pour l'élongation des neurites dans les cultures primaires neuronales .....         | 136 |
| Figure 35- Le SB258585 améliore le comportement social chez les souris Oprm1 <sup>-/-</sup> dans le test d'interaction sociale directe.....                                | 140 |
| Figure 36 Le SB258585 restaure la préférence sociale chez les souris Oprm1 <sup>-/-</sup> dans le test des 3 chambres « Crawley test » .....                               | 142 |
| Figure 37 - Le SB258585 améliore la flexibilité cognitive et diminue les stéréotypies motrices chez les souris <i>Oprm1</i> <sup>-/-</sup> .....                           | 144 |
| Figure 38 - Le SB258585 diminue les stéréotypies suscitées par l'anxiété chez les souris Oprm1 <sup>-/-</sup> dans le test d'enfouissement de billes.....                  | 146 |
| Figure 39- Le SB258585 restaure l'apprentissage moteur chez les souris Oprm1 <sup>-/-</sup> et augmente les performances motrices des souris Oprm1 <sup>+/+</sup> .....    | 148 |
| Figure 40 Le SB258585 supprime l'allodynie des souris Oprm1 <sup>+/+</sup> .....   | 149 |
| Figure 41- La conformation du récepteur 5-HT <sub>6</sub> module son interaction avec GPRIN1 .....   | 153 |
| Figure 42- Hypothèse explicative de l'aternance des voies de signalisations 5-HT <sub>6</sub> /Cdk5/Cdc42 et 5-HT <sub>6</sub> /GPRIN1/Gs/PKA .                            | 159 |
| Figure 43 - Théorie sur l'implication de la sérotonine et du récepteur 5-HT <sub>6</sub> dans la génèse des maladies psychiatriques d'origine neurodéveloppementales ..... | 168 |
| Figure 44- Déroulement du projet d'étude de l'implication du récepteur 5-HT <sub>6</sub> dans les TSA. ....  | 173 |

# Abréviations

## 5

**5-HIAA** : acide 5-hydroxyindolacétique  
**5HT** : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine  
**5-HT<sub>6</sub>** : récepteur de la sérotonine de type 6  
**5-HT<sub>6</sub><sup>GFP/GFP</sup>** : souris *Knock-In (KI)* exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> fusionné à la GFP à son l'extrémité C-terminale  
**5-HTP** : 5-hydroxytryptophane

## A

**AADC** : L-amino acide décarboxylase  
**ABA** : applied behavioral analysis  
**AC** : adénylate cyclase  
**ACC** : cortex cingulaire antérieur  
**Ach** : acétylcholine  
**AchEs** : inhibiteurs de l'acétylcholinestérase  
**AMG** : amygdale  
**AMPc** : adénosine monophosphate cyclique  
**AP-MS** : affinity-purification mass spectrometry  
**ApoER2** : apolipoprotein E receptor-2  
**ARNm** : ARN messager  
**ARP2/3** : Actin-Related Proteins 2/3

## B

**BAC-eGFP** : bacterial artificial chromosome fused to green fluorescent protein reporter *GFP*  
**BDNF** : brain-derived neurotrophic factor

## C

**CA1** : Cornu Ammonis area 1  
**Cdc42** : cell division cycle 42,  
**Cdk5** : cyclin-dependent kinase  
**Cdkp27<sup>kip1</sup>** : cyclin-dependent kinase inhibitor 1B p27<sup>Kip1</sup>  
**cDNA** : ADN complémentaire  
**CPu** : caudé putamen  
**cx** : cortex

## D

**d ACC** : cortex cingulaire antérieur dorsal  
**d IPFC** : cortex préfrontal dorsolatéral  
**D2** : récepteur  
**DA** : dopamine  
**Dab1** : protéine Disabled-1  
**DAG** : diacylglycérol  
**DCX** : protéine doublecortine,  
**Di** : diencéphale  
**DIV** : day in vitro  
**DIXDC1** : DIX domain containing 1  
**DR** : raphé dorsal  
**DRG** : Ganglion Rachidien Dorsal  
**Dt** : dorsal thalamus  
**DT** : thalamus dorsal

## E

**E2F4** : E2F Transcription Factor 4  
**EC** : cortex enthorinal  
**ERK1/2** : Extracellular signal-regulated kinases 1/2

## F

**FAK** : kinase d'adhésion focale  
**FMRP** : Fragile-X Mental Retardation Protein  
**fr** : fascicule rétroflexus

## G

**GABA** : acide γ-aminobutyrique  
**GFP** : green fluorescent protein  
**GIP** : GPCR Interacting Protein  
**GLU** : glutamate  
**GPRIN1** : G Protein regulated inducer of neurite outgrowth 1  
**GTPγS** : Guanosine 5'-[γ-thio]triphosphate

## H

**HA** : étiquette Hemagglutinin  
**hb** : habenula  
**HPC** : hippocampe  
**HYP** : hypothalamus

## L

**Lis 1** : protéine lissencéphalie 1

## I

**IC** : cortex insulaire

**ICV** : injection intra-cérébro-ventriculaire

**IRMf** : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle

## J

**Jab1** : c-Jun activation domain-binding protein 1

## K

**KI** : Knock-In

**LP** : leading process

**LTD** : dépression à long terme

## M

**m5HTR** : récepteurs métabotropiques de la sérotonine

**MA** : Maladie d'Alzheimer

**MAO-A/B<sup>-/-</sup>** : souris génétiquement déplétées pour les monoamine oxydases MAO A et B

**MAOA/MAOB** : monoamines oxydases A ou B

**MAP1B** : microtubule-associated protein 1B

**MB** : mésencéphale

**MDMA** : 3,4-méthylène dioxyméthamphétamine

**MEK** : mitogen-activated protein kinase

**mfb** : faisceau médian du cerveau antérieur

**MFG** : frontgyrus médial

**mGlu<sub>2,3 or 4</sub>** : metabotropic glutamate receptor 2, 3 or 4

**Mlf** : fasciculus longitudinal médian

**MMP9** : matrix métalloprotease 9

**mPFC** : cortex préfrontal médian

**mTOR** : *mammalian target of rapamycin*

**mTORC1** : Complexe mTOR 1

## N

**NA** : noradrénaline

**Nac** : noyau accumbens

**Ndel1** : Nuclear distribution protein nudE-like 1 i

**NEII2** : Estrogen-dependent Transcription of the NEL-like 2

**NF1** : Neurofibromin 1

**NG 108-15** : lignée de neuroglioblastome

**NgCAM** : axonal surface glycoproteins neuronglia cell adhesion molecules

**NGF** : Nerve growth factor

**NMDA** : acide N-méthyl-D-aspartique

## O

**OB** : bulbes olfactifs

**OFC** : cortex orbitofrontal

**Oprm1<sup>-/-</sup>** : souris génétiquement invalidées pour le récepteur Mu des opioïdes

**OXT** : Ocytocine

## P

**p35** : protéine p35

**paraCC** : cortex paracigulaire

**PC** : cortex pariétal

**pCC** : cortex cingulaire postérieur

**PCG** : gyrus précentral

**PCP** : phencyclidine, antagoniste des récepteurs NMDA

**PCPA** : p-chlorophenylalanine

**PG** : gyrus parahippocampique

**PIP2** : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

**PKA** : protéine kinase A

**PLC** : phospholipase C

**PP2A** : Protéine phosphatase 2

**PSD95** : post synaptic density protein

**PTEN** : Phosphatase and TENsin homolog,

**PVN** : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus

## Q

**qRT-PCR** : réaction en chaîne par polymérase quantitative

## R

**RCPG** : récepteurs couplés aux protéines G

**Rh** : rombencéphale

**rpCAMP** : analogue non hydrolysable de l'AMPc

**RSK2** : Ribosomal protein S6 kinase alpha-3

**RSK2** : ribosomal s6 kinase

**RTK** : récepteurs de type tyrosine kinases

## S

**SCG** : ganglion sympathique

**se** : septum

**Sema3A** : sémaphorine 3A

**SERT** : Transporteur de la sérotonine  
**SERT<sup>-/-</sup>** : souris génétiquement déplétées pour le transporteur de la sérotonine  
**SFARI** : Simons Foundation Autism Research Initiative  
**SFG** : gyrus frontal supérieur  
**shRNA** : Short hairpin RNA  
**siRNA** : Small interfering RNA  
**SNC** : Système nerveux central  
**SpC** : Moelle épinière  
**st** : striatum  
**STG** : gyrus temporal supérieur

## T

**Te** : télencéphale  
**Tel2** : Telomere length regulation protein  
**th** : thalamus  
**TOC** : Troubles Obsessionnel Compulsif  
**TP** : trailing process»  
**Tph1** : tryptophan hydroxylase 1  
**Tph1<sup>-/-</sup>** : souris génétiquement déplétées pour la tph1

**Tph2** : tryptophan hydroxylase 2  
**Trp** : tryptophane  
**TSA** : les troubles du spectre de l'autisme  
**TSC2** : *Tuberous Sclerosis Complex 2*  
**Tti1** : TELO2-interacting protein 1 homolog

## V

**VLDLR** : very low density lipoprotein receptor  
**VMATs** : Vesicular Monoamine Transporteurs  
**vPFC** : cortex pré frontal ventral  
**Vps34** : Class III PI 3-kinase  
**Vt** : ventral thalamus

## W

**WAVE-1** : WASP-family verprolin homologous protein 1  
**Wt** : souris sauvages

## Y

**Yif1B** : Yip1 interacting factor homolog B

---

# INTRODUCTION



# Chapitre I : Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> de la Sérotonine : un acteur clef du système sérotoninergique

## I. La sérotonine

La sérotonine est un des plus anciens messagers chimiques connus, son apparition daterait de plus de 700 millions d'années chez la paramécie (Turlejski 1996). Elle est présente aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. On la retrouve par exemple dans les antennes du sphinx du tabac (*Manduca sexta*, une espèce de lépidoptères) ou encore chez *Helisoma trivolis*, un gastéropode. De même, ses récepteurs sont présents tout au long de l'arbre phylogénétique du vivant, depuis l'organisme unicellulaire jusqu'à l'humain (Turlejski 1996). Cette conservation remarquable au cours de l'évolution et son ubiquité dans les différentes espèces du règne animal démontrent un rôle crucial de la sérotonine dans une large variété de processus physiologiques.

### a. Histoire de la découverte de la sérotonine

Les toutes premières évidences de l'existence de la sérotonine remontent à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. En 1868, Carl Friedrich Wilhelm Ludwig et son étudiant Alexander Schmidt travaillent sur une méthode de perfusion utilisant du sang filtré, défibriné et oxygéné. Ils découvrent alors que la perfusion d'un muscle avec ce sang induit une augmentation du tonus vasculaire. Cette observation fortuite à l'époque fut consignée sans être l'objet de plus d'investigations (Göthert 2013; Anrep, Blalock, et Samaan 1934). Il s'agissait pourtant de la première mention dans la littérature de ce qui se révélera être la sérotonine.

Ce n'est qu'en 1912 que O'Connor redécouvre les propriétés vasoconstrictrices du « sérum » (liquide sanguin dépourvu de cellules et de protéines coagulantes) qu'il attribue tout d'abord à l'adrénaline. Cependant, O'Connor remarque que le sérum et l'adrénaline induisent des effets opposés lorsqu'ils sont appliqués sur les intestins : le sérum produit toujours une action vasoconstrictrice tandis que

l'adrénaline a un effet vasodilatateur. O'Connor suggère la présence d'autres molécules actives dans le sérum dont les effets sont proches de ceux de l'adrénaline, il les dénommera « *adrenalin mimicking substances* » (Göthert 2013). A la suite de cette première découverte, différentes équipes vont se pencher sur le sérum et ses propriétés constrictrices.

En 1937, Vittorio Erspamer et ses collègues isolent une substance inconnue de la muqueuse gastrique du lapin qui induit une constriction des muscles lisses. Ils l'appellent entéramine en relation avec sa provenance (les cellules enterochromaffines du tractus gastro intestinal), et sa structure chimique (indolalkylamine) (Zucker 1944).

A la même époque à Cleveland, Irvin Page mène des recherches sur l'hypertension dans le but d'identifier des composés affectant la pression sanguine. En 1948, il isole avec l'aide de Maurice Rapport une substance vasoconstrictrice à partir du sérum. Ils la nomment sérotonine, contraction de sa provenance et de ses effets sur le tonus musculaire. En 1949, Rapport *et al.* cristallisent et caractérisent la structure de la sérotonine à partir de grandes quantités de sang : il s'agit de la découverte de la 5-hydroxytryptamine (5-HT) (Page et Carlsson 1970; Göthert 2013). Le lien avec l'entéramine n'est fait que trois ans plus tard lorsqu'Erspamer et Asero résolvent sa structure et se rendent compte qu'elle est identique à celle de la sérotonine (Göthert 2013). Le nom de sérotonine demeurera comme seule alternative à celui de 5-hydroxytryptamine.

Si son action périphérique a permis sa découverte, son rôle de neurotransmetteur ne tardera pas à être démontré d'abord chez le mollusque « *Venus mercenaria* » par John H. Welsh et Betty M. Twarog puis chez les vertébrés, notamment le chien, le rat et le lapin (Göthert 2013). C'est le début de l'essor de la recherche sur la sérotonine et ses fonctions centrales.

## b. Métabolisme de la sérotonine

La sérotonine est une amine biogène synthétisée à partir du tryptophane, acide aminé essentiel que l'on retrouve dans de nombreux aliments. Le tryptophane est tout d'abord hydroxylé par la tryptophane hydroxylase en 5-hydroxytryptophane (5-HTP). Le 5-HTP est ensuite décarboxylé par la L-amino acide décarboxylase pour donner la sérotonine ou 5-HT (figure 1).

Cette décarboxylase n'est pas spécifique du métabolisme de la sérotonine puisqu'elle assure également la décarboxylation de la L-dopa. Seule la tryptophane hydroxylase est sélective de la synthèse de la sérotonine.

Il existe deux tryptophane hydroxylase (tph1 et tph2). La Tph2 est exprimée dans les neurones du raphé alors que la tph1 assure la synthèse de la 5-HT en périphérie et dans la glande pinéale (Sugden 2003). En plus de leur localisation, ces deux enzymes diffèrent par leur séquence et par leurs propriétés enzymatiques (McKinney, Knappskog, et Haavik 2005). Nous nous concentrerons dans cette thèse sur la sérotonine centrale. Une fois synthétisée, la sérotonine est stockée dans des vésicules par l'intermédiaire de transporteurs, les VMATs (« *Vesicular Monoamine Transporter* »), qui assurent également le transport de diverses monoamines (comme la dopamine, la noradrénaline, l'adrénaline et l'histamine). La sérotonine, après avoir été libérée dans la fente synaptique, est recaptée par son transporteur SERT (« *SERotonin Transporter* ») et catabolisée par les monoamines oxydases A ou B (MAOA ou MAOB). Il en résulte la formation d'un aldéhyde qui sera ensuite oxydé par l'aldéhyde déshydrogénase en acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA), métabolite retrouvé et dosable dans le sang et les urines (figure 1).

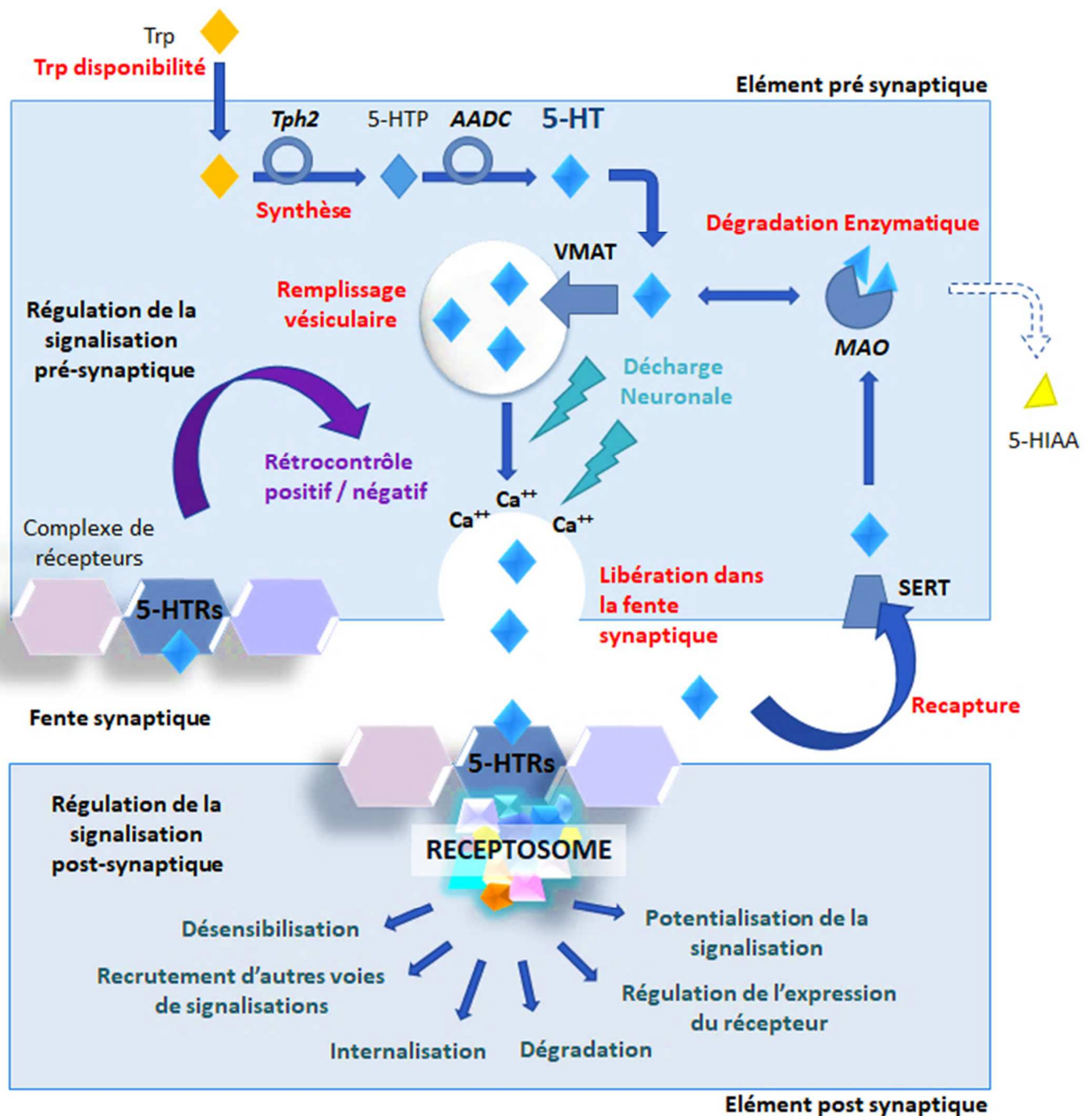


Figure 1- Métabolisme de la sérotonine et signalisation sérotoninergique

Le tryptophane (**Trp**), précurseur de la sérotonine (**5-HT**), provient de l'alimentation et parvient au système nerveux central (SNC) par la vascularisation cérébrale. Les neurones sérotoninergiques du raphé captent le Trp et le transforment en 5-hydroxytryptophane (**5-HTP**) grâce à une enzyme spécifique, la tryptophane hydroxylase 2 (**Tph2**). L'activité de la Tph2 et donc la quantité de 5-HT produite dépend directement de la **disponibilité en Trp**. Le 5-HTP est ensuite converti en 5-HT par une décarboxylase non sélective, la 5-hydroxytryptophane décarboxylase (L-amino acide décarboxylase, **AADC**). La 5-HT est ensuite stockée dans les vésicules pré synaptiques par l'intermédiaire de transporteurs vésiculaires, (**VMAT**). L'arrivée d'un potentiel d'action à la terminaison synaptique provoque la libération de la sérotonine par exocytose, dans la fente synaptique, où elle pourra : activer des récepteurs (5-HTRs) pré ou post synaptiques ; être recaptée par l'intermédiaire de son transporteur (**SERT**) ; être dégradée par la monoamine oxydase (**MAO**). Le processus de dégradation de la 5-HT donne un métabolite, l'acide 5-hydroxy-indolylacétique (**5-HIAA**) dosable dans le sang ou les urines. La liaison de la 5-HT à ses récepteurs mène à l'activation de différentes voies de signalisation qui dépendamment du type de récepteur, de sa localisation, de son complexe membranaire et de son **réceptosome** vont moduler la transmission pré et post synaptique.

### c. Distribution des neurones sérotoninergiques

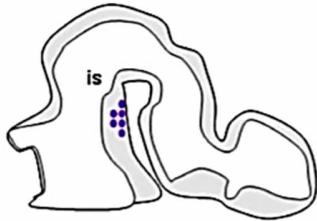
**En périphérie**, la sérotonine est sécrétée majoritairement par les cellules entérochromaffines de la paroi intestinale. Elle pourra ensuite être captée et stockée par les plaquettes sanguines (Spohn et Mawe 2017).

**Au niveau central**, elle est synthétisée par les neurones sérotoninergiques du raphé dont les noyaux, organisés en 9 groupes (B1 à B9), sont situés le long du tronc cérébral, dans le bulbe rachidien, le pont et le mésencéphale (Dahlstroem et al. 1964; Hornung 2003). Les neurones des noyaux caudaux B1 à B3 projettent vers la moelle épinière et le tronc cérébral. Les neurones du noyau B4 projettent vers le cervelet. L'innervation provenant des noyaux B1 à B4 constituent les projections sérotoninergiques descendantes. Les noyaux rostraux (B5 à B9) forment les projections dites ascendantes qui innervent la majorité des structures corticales et sous corticales dont l'hypothalamus, l'amygdale et le septum, le striatum dorsal et ventral, l'hippocampe et la quasi-totalité des différentes aires corticales (Pollak Dorocic et al. 2014; Charnay et Léger 2010) (figure 2-C).

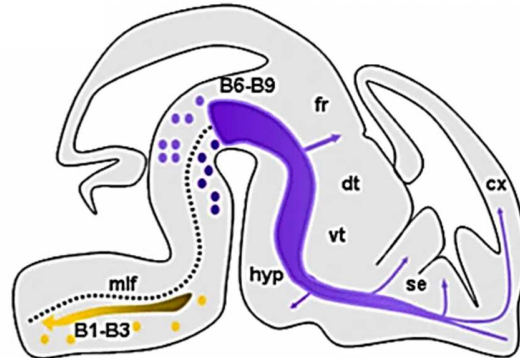
**Au cours du développement**, les enzymes de synthèse tph1 et tph2 sont exprimées très précocement, on retrouve ainsi de la sérotonine dès le jour embryonnaire E10,5 chez la souris (E10,5), E12 chez le rat et durant le troisième trimestre chez l'humain (figure 2-A,B) (Bonnin et al. 2011). Les neurones sérotoninergiques commencent leur différenciation à ce stade, ils innervent progressivement leurs structures cibles jusqu'après la naissance. Ainsi, la sérotonine d'origine embryonnaire ne contribuera aux niveaux de 5-HT du cerveau antérieur que tardivement (après E16,5 chez le rat) (Deneris et Gaspar 2017). Il est donc important de noter que la production embryonnaire ne constitue pas la seule source de sérotonine à ce stade. En effet, avant la fermeture de la barrière hémato-encéphalique (aux environs de E15,5), la sérotonine d'origine maternelle et placentaire joue un rôle important dans les processus neurodéveloppementaux (Velasquez, Goeden, et Bonnin 2013; Bonnin et al. 2011).

La sérotonine possède donc un profil d'expression très vaste, prédisant son rôle de neuromodulateur clef dans un large panel de fonctions du développement jusqu'à l'âge adulte.

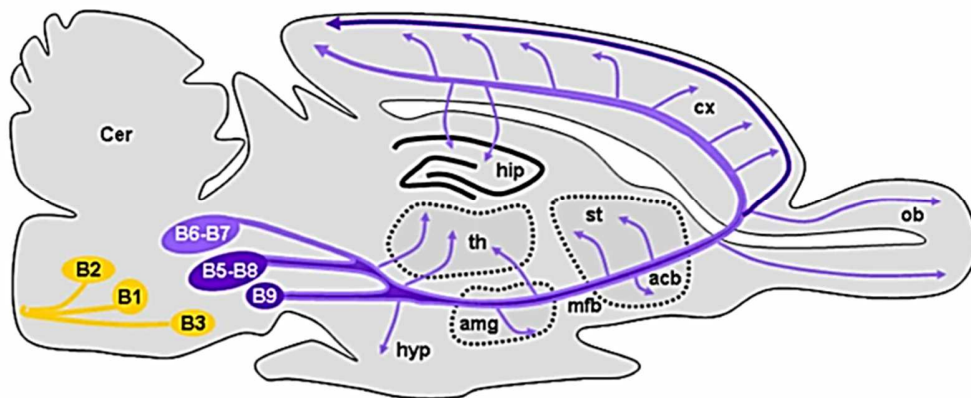
A. E11



B. E14



### C. Système sérotoninergique mature



**Figure 2- Développement et localisation des projections sérotoninergiques.**

Schémas de sections sagittales de cerveau murin à différents âges, montrant la localisation des noyaux sérotoninergiques et leurs principales projections. **A-** Les premières cellules sérotoninergiques apparaissent à E11, rostralement à l'isthme (**is**), l'innervation du cortex débute un jour après leur naissance. **B-** Leur projections atteignent la jonction cortico-striatale dès E14. Les noyaux sérotoninergiques se ségrègent progressivement en neuf groupes (B1-B9). Les **groupes postérieurs (B1-B3, points jaunes)** sont principalement constitués du raphé magnus qui projette sur la moelle épinière, et la périphérie (points jaunes et flèche). Le **raphé dorsal (B6, B7)** et le **raphé médian (B5, B8)** émettent des projections ascendantes destinées au télencéphale et au diencephale (violet). Les afférences sérotoninergiques destinées au cerveau antérieur convergent vers le faisceau médian du cerveau antérieur (**mfb**). Les flèches indiquent les régions où les axones dévient de la voie ascendante majeure : le long du fascicule rétroflexus (**fr**) vers l'habenula, puis vers l'hypothalamus (**hyp**), le striatum, le septum (**se**) et le cortex (**cx**). **C-** A l'âge adulte, de nombreuses régions reçoivent une innervation sérotoninergique dense (flèches) dont, l'hypothalamus (**hyp**), l'amygdale (**amg**), le thalamus (**th**), l'accumbens (**acc**), le striatum (**st**), le bulbe olfactif (**ob**), le cortex (**cx**) et l'hippocampe (**hip**). Dans le cortex cérébral, les couches V et VI reçoivent préférentiellement des afférences issues du raphé dorsal (violet clair) tandis que la couche I reçoit des afférences provenant principalement du raphé médian (violet foncé). **Mlf** = fasciculus longitudinal médian ; **dt** = dorsal thalamus ; **vt** = ventral thalamus. *Modifié d'après Vitalis et al, 2013, Front Cell Neurosci.*

#### d. Principales fonctions centrales de la sérotonine à l'âge adulte

A l'opposé du glutamate et du GABA, principaux neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs du système nerveux central, la sérotonine agit comme un modulateur ajustant l'excitabilité neuronale selon le type de récepteur stimulé. L'implication de la sérotonine centrale a été démontrée dans la régulation d'une multitude de fonctions allant de processus homéostatiques de base (thermorégulation ou respiration) à des fonctions plus élaborées (contrôle de l'humeur, cognition ou comportement). Notons que la sérotonine est synthétisée à 98% en périphérie où elle a différents rôles (par exemple dans l'agrégation plaquettaire et la digestion), sur lesquels nous ne nous attarderons pas. Nous aborderons dans cette partie uniquement les fonctions centrales de la sérotonine à l'âge adulte, ses fonctions durant le développement seront détaillées dans le chapitre II dédié au neurodéveloppement.

Plusieurs méthodes permettent d'étudier les fonctions générales de la sérotonine. Tout d'abord, la disponibilité en tryptophane, son précurseur, influence directement la synthèse de la sérotonine. En modulant son apport, on peut donc créer une déprivation transitoire ou au contraire augmenter le taux de sérotonine. Par ailleurs, l'administration d'inhibiteurs spécifiques des acteurs de son métabolisme ainsi que l'étude des polymorphismes des gènes du système sérotoninergiques ont suscité des avancées majeures. Enfin, des modèles murins génétiquement invalidés pour Tph1, Tph2 ou SERT ont également permis de progresser dans la compréhension des fonctions de la sérotonine (Charnay et Léger 2010; Vitalis, Ansorge, et Dayer 2013; Göthert 2013).

La fonction la plus connue de la sérotonine est celle de régulateur de l'humeur initialement découverte *via* l'effet antidépresseur des inhibiteurs de sa recapture (Wong et Licinio 2004). Ce rôle majeur de la sérotonine a été largement exploré. Tout d'abord, nombre de publications démontrent que la déplétion de sérotonine chez des sujets présentant une vulnérabilité génétique ou des antécédents de troubles de l'humeur provoque des symptômes dépressifs. A l'inverse, une supplémentation en tryptophane induit une amélioration des symptômes chez des sujets dépressifs ou bipolaires (Young 2013; Ruhé, Mason, et Schene 2007; Lindseth, Helland, et Caspers 2015; Sylvia et al. 2013; Jenkins et al. 2016). Dans ce sens, de nombreuses études démontrent une corrélation entre des polymorphismes affectant des gènes du système sérotoninergique, tel quel celui codant pour SERT, avec une vulnérabilité au stress, un comportement impulsif et des passages à l'acte suicidaire violents (Valderrama et Miranda 2017; Jiménez-Treviño et al. 2017; Valderrama et Miranda 2017; Antypa, Serretti, et Rujescu 2013;

Rahikainen et al. 2017). Au-delà de ses effets sur l'humeur, la déplétion en sérotonine a également été associée à une augmentation de l'agressivité et de l'impulsivité ainsi qu'à des changements du comportement social aussi bien chez l'Homme que chez le rongeur (Tsutsui-Kimura et al. 2017; Young 2013).

Par ailleurs, des études de stimulation du raphé (*via* l'implantation d'électrodes) ont démontré un rôle des neurones sérotoninergiques dans la récompense. En effet, les auteurs observent un comportement d'autostimulation équivalent que l'électrode soit implantée dans le raphé ou dans l'aire tegmentale ventrale (Van Der Kooy, Fibiger, et Phillips 1978).

En outre, la sérotonine apparaît comme un acteur important de la régulation des processus cognitifs. La déplétion en tryptophane induit des troubles cognitifs parmi lesquels une altération de la consolidation de la mémoire épisodique chez l'Homme et de la mémoire de travail chez le rongeur. De nombreuses autres fonctions clefs ont été démontrées notamment dans la régulation de l'appétit, du comportement alimentaire, des rythmes veille sommeil ou encore la nociception.

Ces études mettent en évidence un rôle majeur de la sérotonine dans la régulation des fonctions centrales. De façon cohérente avec son large panel de fonctions neurophysiologiques, de nombreux polymorphismes touchant au système sérotoninergique ont été associés à diverses pathologies telles que les troubles de l'humeur, l'anxiété, la schizophrénie ou encore les troubles du spectre de l'autisme. Ainsi, le système sérotoninergique est ciblé par de nombreux traitements comme les antipsychotiques (quiétapine, clozapine), ou les antidépresseurs (sertaline, fluoxétine) (« Psychopharmacologie Essentielle 4 Ème Édition » s. d.).

L'étude des fonctions globales de la sérotonine présente cependant certaines limites. D'une part, certains des effets observés proviennent probablement de l'interaction de la sérotonine avec d'autres systèmes de neurotransmission tels que les systèmes dopaminergiques ou glutamatergiques (Fischer et Ullsperger 2017). D'autre part, même si ces travaux permettent d'établir les fonctions globales de la sérotonine, l'étude de ses récepteurs est indispensable pour comprendre ses fonctions plus spécifiques et développer des stratégies thérapeutiques ciblées.



## II. Les récepteurs de la sérotonine

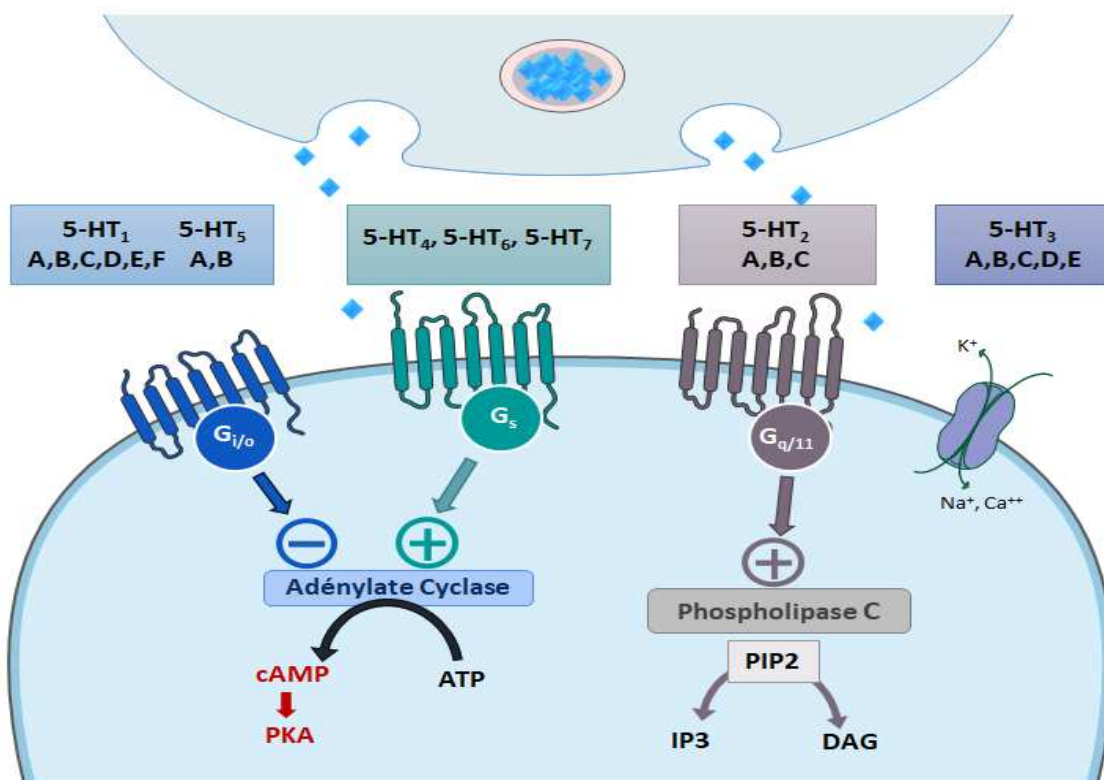
### a. Histoire de leur découverte

Dès les années 50, Gaddum et Picarelli supposent l'existence de différents types de récepteurs (Gaddum et Picarelli 1957). Ils constatent que la réponse contractile à la sérotonine de l'intestin du cochon d'Inde peut être totalement inhibée par l'ajout de dibenzylamine alors que cette réponse ne l'est que partiellement par la morphine. Ils y voient l'évidence de l'existence de deux types de récepteur de la sérotonine (5-HTRs) : ceux de type M qui ont une affinité pour la morphine et ceux de type D qui ont une affinité pour la dibenzylamine. Dans les années 1970, les études de liaison par ligands radiomarqués ( $[^3\text{H}]5\text{HT}$  et  $[^3\text{H}]\text{LSD}$ ) permettent, d'abord à Fillion et ses collègues puis à Peroutka et Snyder, de décrire dans le cerveau deux 5-HTRs distincts possédant différents sites de liaison, de faible et forte affinité qu'ils dénomment 5-HT<sub>1</sub>R et 5-HT<sub>2</sub>R. Si le 5-HT<sub>1</sub>R correspond au récepteur D de Gaddum, le 5-HT<sub>2</sub>R ne semble pas être identique au récepteur de type M (Peroutka et Snyder 1979). En 1986, Bradley et ses collaborateurs proposent une classification unifiée, en trois groupes : 5-HT<sub>1</sub>-like R (classe D), 5-HT<sub>2</sub>R et 5-HT<sub>3</sub>R, ce dernier correspondant aux récepteurs M précédemment décrits (Bradley et al., 1986). Par la suite, l'essor de la biologie moléculaire dans les années 1980 permit de cloner plus de 15 types de récepteurs de la sérotonine, donnant naissance à l'une des familles de récepteurs de neurotransmetteurs les plus complexes (Hannon et Hoyer 2008). Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est l'un des derniers à avoir été cloné en 1993, simultanément par Monsma et Ruat (Monsma et al. 1993; Ruat et al. 1993).

### b. Classification et couplages canoniques des récepteurs de la sérotonine.

Une nomenclature définissant 7 classes de récepteurs de la sérotonine (5-HT<sub>1</sub> à 5-HT<sub>7</sub>) selon leur ordre de découverte, leur pharmacologie, leur homologie de séquence et de structure sera finalement adoptée par le « Serotonin Club Receptor Nomenclature Committee » (Göthert 2013). On peut les diviser en 4 grands groupes en fonction de leur signalisation. À l'exception du récepteur 5-HT<sub>3</sub>, tous les récepteurs de la sérotonine sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (figure 3). Les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> (5-HT<sub>3A</sub> et 5-HT<sub>3B</sub>) sont des récepteurs canaux cationiques. Les récepteurs 5-HT<sub>1</sub> (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>) et 5-HT<sub>5</sub> sont couplés aux protéines G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>, ils inhibent notamment l'adénylate

cyclase (AC) et la formation d'AMPc. Les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> et 5-HT<sub>2C</sub>) sont couplés à la protéine G<sub>q</sub>, ils stimulent la phospholipase C $\beta$  augmentant l'hydrolyse de l'inositolphosphate (PIP<sub>2</sub>) menant à l'élévation du calcium intracellulaire. Enfin, les récepteurs 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> et 5-HT<sub>7</sub> sont canoniquement couplés à la protéine G<sub>s</sub>. Ils induisent la stimulation de l'adénylate cyclase menant à l'augmentation du niveau d'AMPc intracellulaire (Hannon et Hoyer 2008; Gerhardt et van Heerikhuizen 1997). Notons que les récepteurs 5-HT<sub>4</sub> et 5-HT<sub>7</sub> peuvent également être couplés aux protéines G<sub>12/13</sub>.



**Figure 3- Les récepteurs de la sérotonine et leurs couplages canoniques.**

Les récepteurs de la sérotonine sont classés en sept familles (5-HT<sub>1</sub> à 5-HT<sub>7</sub>) selon leurs propriétés pharmacologiques, les systèmes de transduction et leur degré d'homologie de séquence. On distingue 4 grandes sous familles associées à des couplages canoniques différents. Les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> sont des récepteurs-canaux à perméabilité cationique. Les autres récepteurs de la sérotonine sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et sont regroupés sous l'appellation récepteurs métabotropiques de la sérotonine (m5-HTRs). Les récepteurs 5-HT<sub>1</sub> sont couplés à la protéine G<sub>i/o</sub>, ils inhibent l'adénylate cyclase et de fait la production d'AMPc. Les récepteurs 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> et 5-HT<sub>7</sub> sont couplés à la protéine G<sub>s</sub> et stimulent l'adénylate cyclase, menant à une élévation de la production d'AMPc. L'élévation de la concentration en AMPc va activer de nombreuses enzymes dont la principale est la Protéine Kinase A (PKA). Les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> sont couplés à la protéine G<sub>q/11</sub>, qui stimule la phospholipase C, responsable de la production d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et de diacylglycérol (DAG) à partir de l'inositol phosphate (PIP<sub>2</sub>). A noter que pour les récepteurs 5-HT<sub>7</sub>, le couplage à la protéine Gi n'a pu être démontré que *in vitro*, son couplage *in vivo* reste encore incertain.

## c. Régulation de l'activité fonctionnelle des récepteurs sérotoninergiques métabotropiques

Il est devenu évident depuis plusieurs années que ces couplages canoniques ne peuvent expliquer à eux seuls la totalité des effets physiologiques des récepteurs métabotropiques de la sérotonine (m5HTR).

L'émergence des techniques de protéomique a permis d'identifier des réseaux de protéines associés aux récepteurs et formant des complexes moléculaires spécifiques appelés « réceptosomes » (figure 1). Ces partenaires protéiques, appelés GIPs (GPCR Interacting Proteins), interagissent le plus souvent au niveau de motifs spécifiques situés dans les boucles intracellulaires ou sur l'extrémité C-Terminale du récepteur (Bockaert, Fagni, et al. 2004). Il peut s'agir aussi bien de protéines solubles (kinases, petites protéines G, protéines du cytosquelette...) que transmembranaires comme des canaux ioniques ou même d'autres RCPGs (homodimérisation, hétérodimérisation).

L'activation d'un m5HTR peut mener au recrutement de différentes GIPs et mettre en jeu de nombreuses voies de signalisations indépendantes des protéines G comme la voie ERK1/2 qui peut être activée par les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, et 5-HT<sub>7</sub> (Marin et al. 2012). L'activité fonctionnelle des m5-HTR fait l'objet d'une régulation fine et peut être modulée par de multiples facteurs tels que les protéines du « réceptosome » lui-même. (Bockaert, Dumuis, et al. 2004; Bockaert, Fagni, et al. 2004; Marin et al. 2012; Maurice et al. 2011).

### ○ Localisation subcellulaire

En premier lieu, **les partenaires protéiques** peuvent influencer la localisation subcellulaire des récepteurs. Les plus connus sont les protéines à domaines PDZ. Il s'agit de protéines présentant un motif spécifique de 80 à 90 acides aminés qui leur permet d'interagir au niveau de séquences consensus conservées « PDZ *binding* motifs » situées à l'extrémité C-terminale des récepteurs. Parmi elles, figure la protéine PSD-95 qui est, par exemple, requise pour l'expression dendritique du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. Outre les protéines à domaine PDZ, d'autres GIPs peuvent moduler l'expression des m5HTR (Marin et al. 2012). On peut citer le cas du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> dont le partenaire Yif1B est requis pour son adressage dans la partie distale des dendrites (Carrel et al. 2009).

### ○ Endocytose et recyclage

Par ailleurs, les GIPs gouvernent également l'endocytose et le recyclage des m5HTR, des processus d'une importance majeure pour la régulation de leur activité. Les  $\beta$ -arrestines sont l'exemple le plus connu, elles sont responsables de l'internalisation de nombreux RCPGs suite à leur activation, jouant ainsi un rôle clef dans le processus de désensibilisation. On peut citer l'exemple de la forme humaine du récepteur 5-HT<sub>2A</sub> dont l'internalisation est dépendante de son interaction avec la  $\beta$ -arrestine 2 (Marin et al. 2012). A l'opposé, certaines GIPs peuvent prévenir le phénomène d'endocytose suite à la stimulation du récepteur et ainsi augmenter la transduction du signal comme c'est le cas de PSD-95 avec le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> précédemment décrit.

- **Signalisation et Modifications post-traductionnelles**

Les GIPs peuvent également moduler directement la signalisation en amplifiant ou inhibant un couplage, souvent par le biais de modifications post-traductionnelles. Celles-ci peuvent affecter le couplage des m5HTRs, ajoutant un niveau de complexité supplémentaire à leur signalisation. Les exemples les mieux connus concernent les phosphorylations. Elles ont souvent lieu au niveau des boucles intracellulaires ou de l'extrémité C-terminale des RCPGs. Ces modifications peuvent moduler l'activité du récepteur, sa désensibilisation et son internalisation ou mener au recrutement d'autres partenaires. La kinase RSK2, par exemple, phosphoryle le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> sur la sérine 314, un processus à l'origine d'une inhibition tonique de la voie de signalisation G<sub>q</sub> (Marin et al. 2012; G. M. Thomas et al. 2005). On peut également citer l'exemple du complexe mGlu<sub>2</sub>/5-HT<sub>2A</sub> (González-Maeso et al. 2008), pour lequel une potentialisation de la phosphorylation de la Sérine 843 du récepteur mGlu<sub>2</sub> est observée uniquement lorsque le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est présent, provoquant une augmentation de l'activité Gi/o du récepteur mGlu<sub>2</sub> en réponse à sa stimulation (Murat et al. 2018). D'autres modifications comme la palmitoylation ou la myristoylation peuvent affecter la localisation du récepteur dans les radeaux lipidiques connus pour jouer un rôle crucial dans la signalisation de nombreux RCPGs (Marin et al. 2012; Ge et al. 2009).

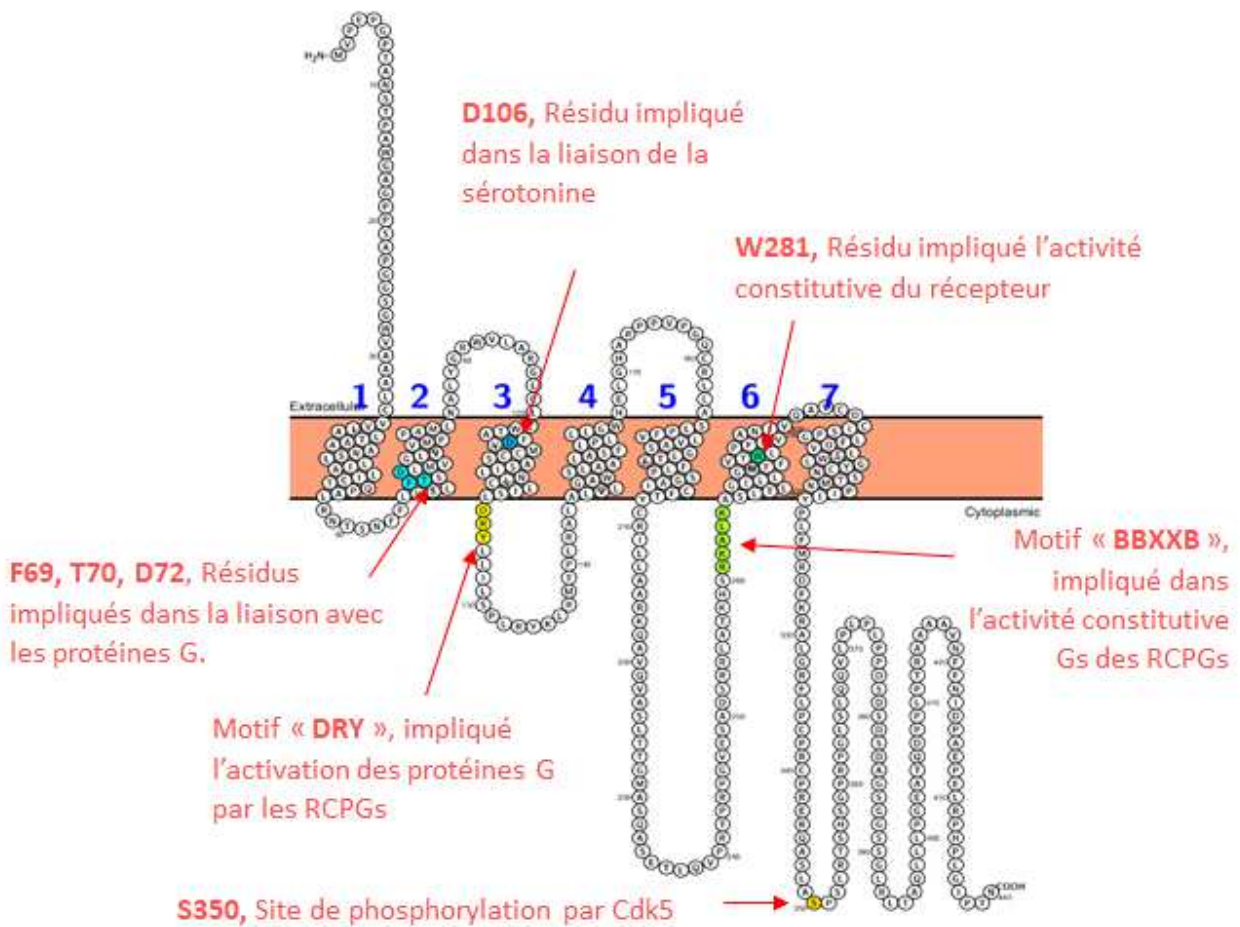
La compréhension de la complexité de la signalisation des m5-HTR a eu un impact direct sur le développement des ligands. En effet, en fonction de l'interactome du récepteur à un instant donné, la conséquence de l'activation d'un récepteur par un ligand peut mener au déclenchement de voies de signalisations différentes. Ce phénomène pourrait expliquer l'hétérogénéité des réponses cliniques à

certaines drogues. Par exemple on peut citer les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dont les effets sur la cognition varient en fonction des études et de la population (Fullerton et al. 2018; Upton et al. 2008). Ce constat a mené au développement de ligands biaisés, dont le but est d'activer spécifiquement une voie de signalisation. La modulation fine de la signalisation des RCPGs *via* l'utilisation de ligands biaisés ou le ciblage de GIPs spécifiques permettra dans l'avenir d'obtenir des effets thérapeutiques plus spécifiques et de minimiser les effets secondaires. Ce domaine d'étude est en plein essor, et de nombreux ligands biaisés des m5-HTR sont en développement notamment dans notre équipe. Du fait de l'émergence de ce domaine, aucun ligand biaisé des m5-HTR n'est encore passé en phase clinique à ce jour. Pour illustrer le potentiel thérapeutique de cette stratégie, on peut citer l'exemple d'un ligand biaisé des récepteurs Mu des opioïdes, le TRV130, sélectif de la voie Gi, qui est actuellement évalué en clinique. Celui-ci démontre une meilleure capacité analgésique, associée à une réduction de la détresse respiratoire et des nausées (Soergel et al. 2014).

Pour conclure, les mécanismes de régulation de la signalisation des récepteurs sérotoninergiques sont extraordinairement complexes. Leur étude reste indispensable afin de mieux comprendre leurs rôles et développer des traitements pharmacologiques plus spécifiques et aux effets secondaires mieux maîtrisés. Lors de ma thèse, je me suis intéressée au récepteur 5-HT<sub>6</sub> et à un élément particulier de son réceptosome.

### III. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> de la sérotonine et son réceptosome

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> de la sérotonine a été découvert en 1993, simultanément par Frederick Monsma et Martial Ruat à partir d'une banque de cDNA provenant du striatum de rat. Ces études ont mis en évidence une protéine de 437 acides aminés (figure 4), dont le gène possède deux introns. Les deux variants d'épissage qui en résultent donnent deux transcrits, un de 3,2 kb et un de 4,1 kb exempt de différences pharmacologiques notoires (Monsma et al. 1993; Ruat et al. 1993).



**Figure 4- Structure du récepteur 5-HT<sub>6</sub> humain et résumé des résidus importants pour son activité fonctionnelle.**

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> de la sérotonine, appartient à la classe A des récepteurs couplés aux protéines G. Plusieurs résidus importants pour la conservation de l'intégrité structurale et/ou fonctionnelle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont été identifiés. Certains sont des résidus très conservés de la classe A des RCPGs, comme de « DRY » (D126, R127, Y128), motif important pour la modulation de l'activation de la protéine G par le récepteur. Les résidus F69, T70 et D72 du domaine transmembranaire 2, sont impliqués dans la liaison du récepteur à la protéine G, leur mutation (F69L, T70I, D72A) rend le récepteur incapable d'activer les protéines G, ce mutant est dit « Gsdead ». Le résidu D106 a été identifié comme important pour la liaison de la sérotonine au récepteur, sa mutation (D106A) rend le récepteur inactivable par un agoniste. Le motif BBXXB (où B représente un acide aminé basique et X un résidu non basique, ici RK-AL-K), joue un rôle important dans l'activité constitutive de nombreux RCPGs une mutation à même ce motif ou à proximité augmente ou diminue l'activité constitutive selon les cas. Le résidu W281, est l'équivalent du W272 chez le récepteur 5HT<sub>4</sub>, chez lequel sa mutation en alanine supprime l'activité constitutive. La sérine 350 située à l'extrémité C-terminale du récepteur a été identifiée par notre équipe comme étant un site de phosphorylation par la kinase Cdk5. Son implication a été démontrée dans les processus neurodéveloppementaux contrôlés par le récepteur. *Visualisation du récepteur issue de Protter. Omasits et al. 2013, Bioinformatics.*

## a. Distribution du récepteur 5-HT<sub>6</sub>

### ○ Distribution générale à l'âge adulte

La cartographie de l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> a commencé grâce à des techniques de Northern Blot et d'hybridation *in situ* chez le rat (figure 5). Ces études montrent une expression des ARN messagers (ARNm) très forte dans les bulbes olfactifs, le striatum ventral (en particulier dans le Noyau Accumbens, Nac) ainsi que dans l'hippocampe, l'hypothalamus, les tubercules olfactifs et le cortex cérébral. Au niveau périphérique, l'expression des transcrits du récepteur 5-HT<sub>6</sub> est très faible, on le retrouve néanmoins modérément dans l'estomac (Monsma et al. 1993; Ruat et al. 1993; Kinsey et al. 2001). En 1996, Ward et Dorsa précisent l'expression du récepteur dans le striatum par double marquage des transcrits du récepteur et : des neurones épineux de taille moyenne exprimant les récepteurs D1 (voie striato-nigrale, marquage de la dynorphine) ou des neurones exprimant le récepteur D2 (voie striato-pallidale, marquage de la substance P). Cette étude permet de conclure que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est exprimé dans les deux types neuronaux (Ward et Dorsa 1996). La qRT-PCR vient affiner les résultats d'hybridation *in situ*, mettant en évidence la présence du récepteur dans la substance noire, la moelle épinière et plus modérément dans l'aire tegmentale ventrale, le raphé antérieur et le cervelet (Gérard et al. 1996). Ces auteurs sont allés plus loin en démontrant que la lésion des neurones sérotoninergiques par micro infusion de 5,7-dihydroxytryptamine dans le raphé ne modifie pas l'expression des transcrits du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, prouvant qu'il ne s'agit pas d'un autorécepteur (Gérard et al. 1996). Cette même équipe a par la suite généré un anticorps ciblant l'extrémité C-terminale du récepteur afin de détecter la protéine par immunomarquage. Ils ont ainsi pu préciser sa localisation au sein de l'hippocampe, dans le stratum oriens et le stratum radiatum de l'aire CA1 ainsi que la couche moléculaire du gyrus denté (Gérard et al. 1997). Dans le striatum dorsal, Hamon et al. ont montré une immunoréactivité confinée dans le neuropile, sans aucun marquage au niveau des somas (Hamon et al. 1999). La microscopie électronique a permis de confirmer dans l'hippocampe une expression plutôt post-synaptique, dans les dendrites avec un marquage dense dans les épines dendritiques, et peu ou pas de signal dans l'axone et le soma (Gérard et al. 1997; Hamon et al. 1999). Cette équipe a par ailleurs décrit pour la première fois son expression dans le cil primaire, ce qui sera confirmé ensuite par plusieurs études (Brailov et al. 2000; Brodsky et al. 2017). Ces études d'immunomarquage confirment globalement les publications précédentes sur la localisation des transcrits. Quelques divergences sont cependant observées. En effet,

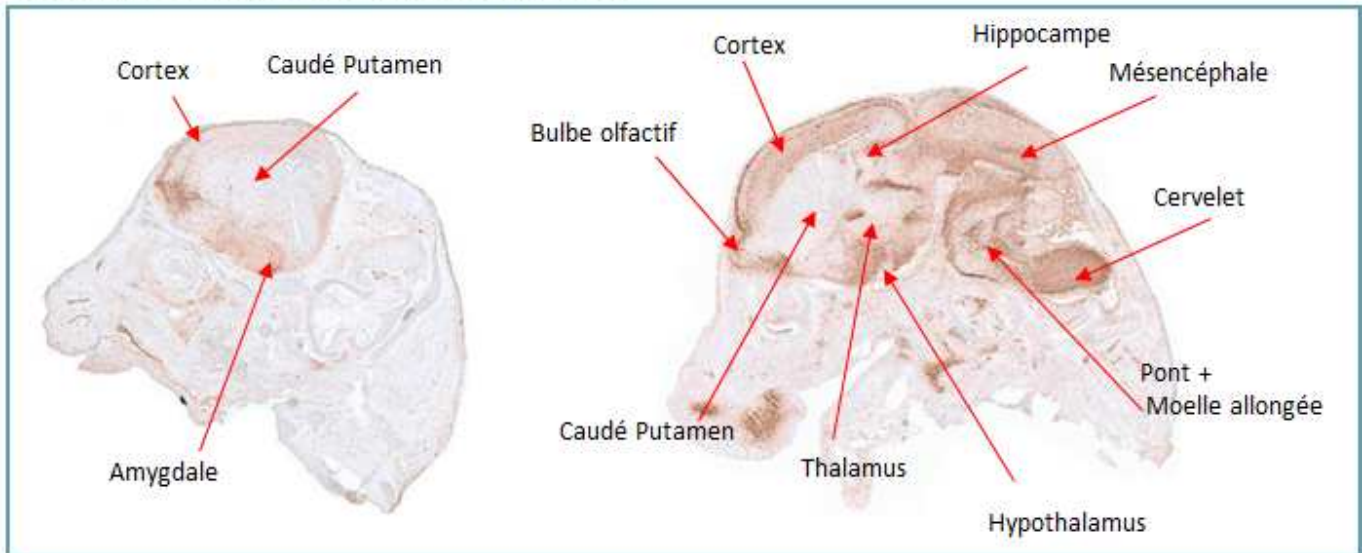
Gerard et al ne trouvent pas de marquage dans l'hypothalamus, l'habenula ni le raphé antérieur, contrairement à ce qui a pu être démontré par les études d'ARNm. De plus, ces auteurs ont observé un fort marquage dans le cervelet où l'ARNm est absent, ce qui questionne quant à la spécificité de l'anticorps utilisé.

L'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> chez la souris est sujette à controverse. Une étude de 2003 démontre par qRT-PCR une expression très faible dans le cerveau de souris, sans enrichissement dans le striatum, remettant ainsi en cause la pertinence de l'étude du récepteur dans cette espèce (Warren D. Hirst et al. 2003). Cependant, les qRT-PCR obtenues dans cette publication pourraient ne pas refléter totalement la réalité chez la souris du fait que les auteurs utilisent pour leur PCR les mêmes amorces pour le rat et la souris. Or, si ces amorces reconnaissent une forme du récepteur commune aux deux espèces, il existe un variant chez la souris qui n'est pas reconnu par l'une des deux amorces (« Gene: Htr6 - Mus musculus - Ensembl"). Ce biais pourrait expliquer l'absence de détection de l'ARNm du récepteur dans cette étude. L'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> chez la souris a récemment été confirmée par le projet GENSAT qui génère des souris BAC-eGFP dans le but de créer un atlas de l'expression génique dans le système nerveux central. L'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur du gène du récepteur 5-HT<sub>6</sub> a été étudiée par hybridation *in situ* ce qui a permis de confirmer que son expression chez la souris suit un schéma très similaire à celui observé chez le rat avec une expression très forte dans le striatum, l'hippocampe et le cortex. En outre, des expériences de qRT-PCR menées par notre équipe (données non publiées), et celle de collaborateurs (Becker, Kieffer, et Le Merrer 2017) confirment la présence de transcrits du récepteur dans le striatum de souris adultes et dans les cultures primaires de striatum de souris. Par ailleurs, notre équipe a récemment généré une souris *Knock-In (KI)* 5-HT<sub>6</sub><sup>GFP/GFP</sup> exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> fusionné à la GFP à son extrémité C-terminale. Les données préliminaires obtenues confirment l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le striatum et l'hippocampe, au niveau du cil primaire en particulier ainsi que dans les somas des neurones corticaux. L'ensemble de ces données permettent de valider la souris en tant que modèle pour l'étude des fonctions du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

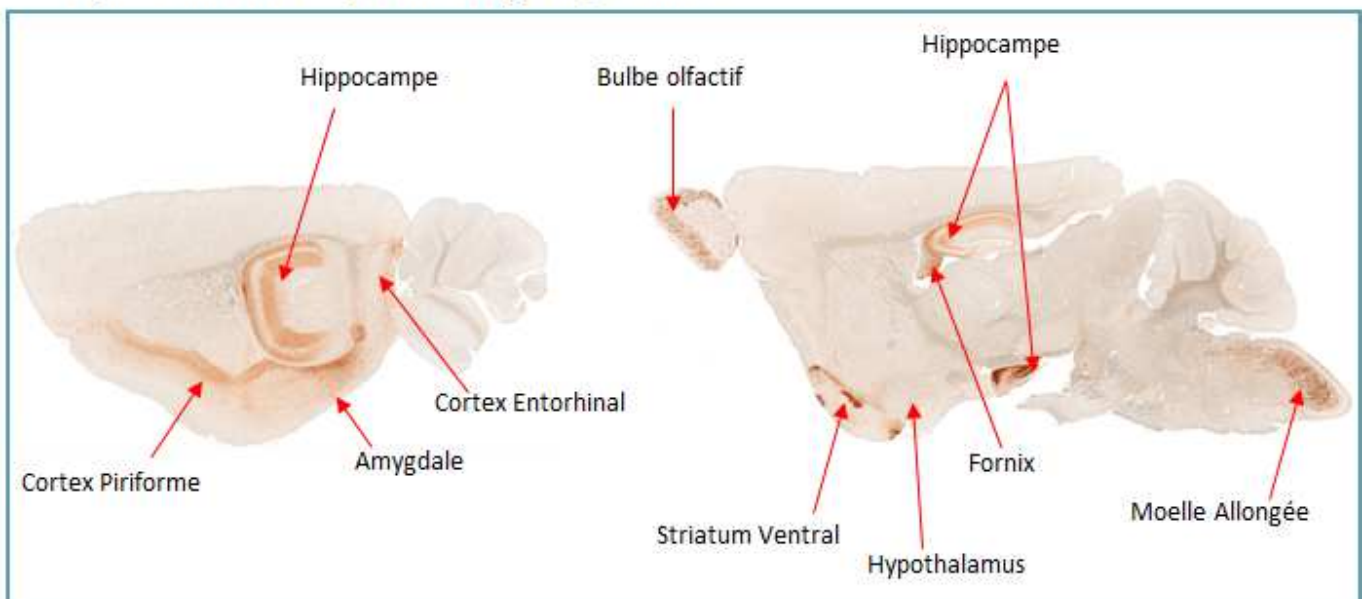
Enfin, des études de ligands radio-marqués ont permis de mettre en évidence une distribution du récepteur 5-HT<sub>6</sub> chez l'Homme très similaire à celle observée chez le rat (Boess et al. 1998; W. D. Hirst et al. 2000; East et al. 2002; Marazziti et al. 2012, 2013).



### A. Expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> à E15,5



### B. Expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> à l'âge adulte



**Figure 5- Expression de la GFP sous le contrôle du promoteur du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.**

Coupes sagittales de cerveaux de souris BAC Htr6-EGFP durant le développement embryonnaire (E15,5) (A), et à l'âge adulte (B). L'expression des transcrits de la GFP sous le contrôle du promoteur du récepteur 5-HT<sub>6</sub> est mise en évidence par hybridation in situ. On observe que le récepteur est très fortement exprimé, durant le développement, dans la quasi-totalité de l'encéphale, à l'exception du caudé-putamen. A l'âge adulte, son expression se restreint à des zones spécifiques, telles que le striatum ventral, les bulbes olfactifs, l'hippocampe, l'amygdale et faiblement dans certaines régions corticales. <http://www.gensat.org/>

- **Expression du récepteur durant le développement embryonnaire :**

L'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> au cours du développement a essentiellement été étudiée chez le rat, par Grimaldi et ses collaborateurs, par amplification des transcrits (qRT-PCR) provenant de différentes régions cérébrales et à différents âges (de E10 jusqu'à P36), chez le rat. L'ARNm du récepteur est détectable dès E12, son expression décroît légèrement entre E14 et E15 puis remonte à E17.5 pour se stabiliser jusqu'à l'âge adulte (Grimaldi et al. 1998). Il est intéressant de noter que le récepteur semble être exprimé avant même l'innervation du cortex par les projections sérotoninergiques, laissant supposer l'existence d'une activité indépendante de la sérotonine d'origine embryonnaire.

L'atlas de GENSAT donne également des informations sur l'évolution de l'expression du récepteur au cours du développement chez la souris BAC Htr6-eGFP. À E15, son expression est forte dans pratiquement toutes les régions cérébrales, à l'exception du striatum dorsal (caudé putamen), pour se stabiliser à l'âge adulte (figure 5).

L'évolution de la localisation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> permet de supposer un rôle clef dans le neurodéveloppement. Outre sa localisation anatomique, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> constitue aussi une entité pharmacologique aux voies de signalisation particulières qu'il convient de décrypter afin de mieux intégrer son importance dans le neurodéveloppement.

## **b. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et ses voies de signalisation**

### ***i. Couplage canonique à la protéine Gs***

Lors de sa découverte en 1993, Monsma et Ruat ont pu démontrer que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est canoniquement couplé à la protéine Gs. En effet, sa stimulation par la sérotonine ou des agonistes spécifiques active la production d'AMPC, aussi bien dans des lignées cellulaires où le récepteur est surexprimé (COS-7 ou NG 108-15) que dans des systèmes natifs comme les neurones de striatum (Ruat et al. 1993; Monsma et al. 1993; Sebben et al. 1994; Kohen et al. 2001; Boess et al. 1997; Purohit et al. 2005; Codony et al. 2010). Cet effet peut être bloqué par les antipsychotiques atypiques et certains antidépresseurs incluant la clozapine, l'amoxipine, et l'amitriptyline qui se comportent comme des antagonistes (Codony et al. 2010; Monsma et al. 1993).

### ***ii. Découverte de nouvelles voies de signalisation engagées par le récepteur 5-HT<sub>6</sub>***

### ➤ Nouveaux partenaires identifiés par double hybride

**Couplage à la kinase de la famille de Src Fyn.** L'équipe de Yun Hyung-Mun fut l'une des premières à identifier des partenaires du récepteur autres que la protéine Gs, grâce à la technique de double hybride. Le criblage d'une banque de cDNA humain, utilisant l'extrémité C-terminale du récepteur comme appât, a d'abord identifié Fyn, une tyrosine kinase membre de la famille Src, fortement exprimée dans les neurones et la glie. Les auteurs ont démontré que la stimulation du récepteur par la sérotonine provoque l'autophosphorylation de Fyn sur la tyrosine 420, et active un modulateur intracellulaire majeur, Erk1/2 (Extracellular regulated kinase 1/2), *via* la cascade d'activation classique Ras-Raf1-MEK (Yun et al. 2007). Réciproquement, l'interaction de Fyn avec le récepteur influence l'activité de ce dernier en favorisant son expression à la membrane. (Yun et al. 2007)

**Couplage à la protéine Jab-1.** La même approche a permis à cette équipe de démontrer l'interaction du récepteur avec Jab1 (« *Jun Activation domain-binding protein1* »), kinase dont les fonctions sont peu connues (Yun et al. 2010). Les auteurs ont démontré que l'extinction de l'expression de Jab1 par un siRNA réduit l'activation du récepteur par la sérotonine sans induire de changement de son affinité apparente. Cet effet semble s'expliquer par la diminution du niveau d'expression membranaire du récepteur. La stimulation du récepteur par la sérotonine induit également la translocation de Jab1 dans le noyau, ce qui accroît l'interaction avec son substrat cJun. Cette interaction favorise la phosphorylation de cJun, induisant son activation. Par ailleurs, une augmentation conjointe de l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et de Jab1 est observée suite à un choc ischémique induit par une occlusion de l'artère cérébrale moyenne. Une observation similaire a été réalisée dans des cellules en culture mises en situation d'hypoxie. De plus, la surexpression du récepteur dans des cellules mises en hypoxie diminue la mort cellulaire, suggérant un rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur la survie cellulaire dans un contexte de stress cellulaire.

**Couplage à la protéine MAP1B.** Finalement, l'approche de double hybride permet à la même équipe de démontrer l'interaction du récepteur avec la protéine MAP1B (« *Microtubule-Associated Protein 1B* »), une protéine particulièrement exprimée dans le système nerveux central durant le développement (S.-H. Kim et al. 2014). La protéine MAP1B est connue pour son implication dans le contrôle de la stabilité et la dynamique des microtubules. Elle joue un rôle important dans une large variété de fonctions telles

que le trafic intracellulaire, la pousse neuritique et la dégénérescence. L'interaction du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec le domaine LC1 issu du clivage protéolytique de la MAP1B augmente la production d'AMPC induite par la sérotonine sans changement de l'affinité apparente du récepteur pour la sérotonine. Cette interaction induit également une augmentation de la phosphorylation d'Erk1/2 induite par la sérotonine, et une augmentation de l'expression membranaire du récepteur. De façon intéressante, l'interaction du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec le domaine LC1 de MAP1B inhibe l'endocytose du récepteur suite à sa stimulation par la sérotonine, réduisant sa désensibilisation et jouant ainsi un rôle majeur dans la régulation de son activité fonctionnelle (S.-H. Kim et al. 2014).

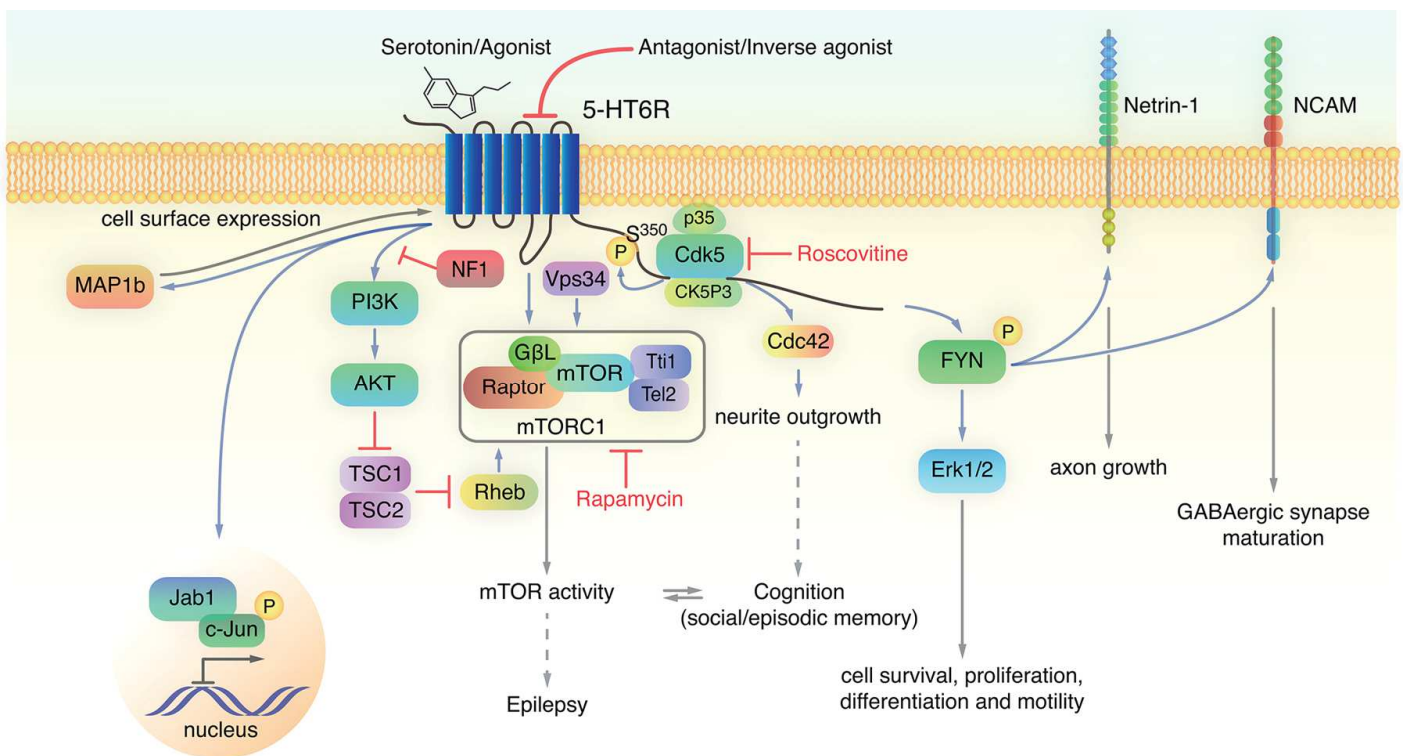
### ➤ Cribles protéomiques et découverte de nouvelles voies de signalisation

Afin de mettre en évidence de nouveaux partenaires associés au récepteur 5-HT<sub>6</sub>, notre équipe a mené deux cribles interactomiques complémentaires : 1) l'identification des partenaires du récepteur entier portant une étiquette HA exprimé dans des cellules HEK-293 et isolé par co-immunoprécipitation avec un anticorps anti-HA et, 2) l'identification des partenaires recrutés par le domaine C-terminal du récepteur à partir d'un lysat de cerveaux de souris. Ces études ont permis d'identifier plusieurs dizaines de nouveaux partenaires potentiels du récepteur. De façon remarquable, l'interactome du récepteur 5-HT<sub>6</sub> est fortement enrichi en protéines connues pour leur implication dans la signalisation, le développement cérébral, les processus cognitifs et la plasticité synaptique.

Parmi ceux-ci, on peut noter la présence de plusieurs protéines de la voie de signalisation mTOR, et en particulier le complexe mTORC1, telles que la protéine kinase mTOR elle-même, raptor, Rheb, Vps34, Tti1 et Tel2 ainsi que la Neurofibromin 1 (NF1) (Meffre et al. 2012). Le complexe mTORC1 est un régulateur cellulaire majeur impliqué dans une très grande variété de fonctions telles que la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire, la réponse immunitaire, la réponse au stress et la cognition (Lee 2015; Bockaert et Marin 2015). Confirmant son importance majeure, la suppression de l'expression de mTOR par des approches génétiques est létale (Gangloff et al. 2004). Ce complexe a également été étudié pour son rôle dans un grand nombre de pathologies, en particulier le cancer mais également des troubles du développement, (retard mental ou les troubles du spectre de l'autisme, TSA). La modulation *in vivo* de l'activité de mTORC1 par la rapamycine présente cependant une multitude d'effets secondaires. Dans ce contexte, il est particulièrement intéressant de se pencher sur son interaction spécifique avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub>. En effet, la modulation pharmacologique du récepteur impacte de

façon indirecte l'activité de mTOR constituant ainsi une piste thérapeutique majeure permettant de minimiser les effets secondaires.

Outre les protéines du complexe mTORC1, ces cribles interactomiques ont révélé l'interaction du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec un réseau de protéines contrôlant la dynamique du cytosquelette d'actine et connus pour leur implication dans les processus neurodéveloppementaux. On peut citer les protéines Cdk5 (Cyclin-dependent kinase 5), WAVE-1 (WASP-family verprolin homologous protein 1) et GPRIN1 (G protein regulated inducer of neurite outgrowth 1) (Duhr et al. 2014). Dans leur ensemble, ces études d'interactomique ont démontré la capacité du récepteur à recruter de nouvelles voies de signalisation dont les voies mTOR et Cdk5, et ont révélé son implication dans le contrôle de la formation des circuits neuronaux, de la connectivité neuronale et des processus cognitifs (figure 6). Ces différents aspects seront développés dans les deux prochaines parties de cette thèse.



**Figure 6- Voies de signalisations associées au récepteur 5-HT<sub>6</sub>**

Cette illustration représente les voies de signalisation associées au récepteur 5-HT<sub>6</sub>, découvertes à partir de criblages doubles hybrides et de stratégies protéomiques AP-MS. Notons que ces voies de signalisation sont particulièrement impliquées dans les processus neurodéveloppementaux et cognitifs. D'après *Dayer et al, 2015 ACS Chem Neurosci*.

### **iii. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et son activité constitutive : rôle de NF1**

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> a la particularité de présenter une activité constitutive importante vis-à-vis de la voie Gs-adénylate cyclase dans différentes lignées cellulaires ainsi que dans les cultures primaires de neurones de striatum (Sebben et al. 1994).

Le motif BBXXB (où B représente un acide aminé basique et X un résidu non basique) qui se trouve sur la partie C-terminale de la 3<sup>ème</sup> boucle cytoplasmique a été très étudié pour son rôle dans l'activité constitutive de nombreux RCPGs. Si une mutation à proximité de ce motif augmente l'activité constitutive, Kohen et al. (2001) ont montré que des mutations ponctuelles dans cette région (K264I, K267A et A268R), du récepteur de souris, diminuent l'activité constitutive du récepteur dans les cellules JEG-3 ou COS-7. Ce résultat n'a pas été reproduit par Romero *et al.* qui ont observé une augmentation de l'activité constitutive par la mutation S267K du récepteur humain exprimé dans les cellules HEK-293F (Romero et al. 2007). Des différences au niveau de l'interactome du récepteur dans les différentes lignées cellulaires utilisées dans ces études pourraient expliquer ces divergences. Malgré leurs apparentes contradictions, ces travaux suggèrent que l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> est modulable et très sensible à sa conformation. L'ensemble de ces données permettent de supposer un rôle important de l'activité constitutive du récepteur fortement régulée par son environnement cellulaire (Purohit et al. 2005).

Dans ce sens, une étude récente du Dr Séverine Morisset-Lopez (CBM, Orléans) réalisée en collaboration avec notre équipe a mis en évidence le rôle crucial de la neurofibromine (NF1) dans la modulation de l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub>. La déplétion génétique de NF1 par interférence de l'ARN (siRNA) abolit l'activité constitutive Gs du récepteur dans les cellules HeLa, et la diminue fortement dans les striataux et les cellules de neuroblastome NG 108-15. L'extinction de l'expression de NF1 n'a toutefois aucun effet sur le profil d'activation du récepteur par un agoniste. L'inhibition de l'interaction entre NF1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> grâce à un peptide interférant qui cible la partie N-terminale du domaine C-terminal du récepteur (peptide TAT320-342) produit la même inhibition de l'activité constitutive que l'invalidation génétique de la protéine. L'activité constitutive du récepteur semble donc directement dépendante de son interaction physique avec NF1. De plus, le niveau basal d'AMPC dans le cortex préfrontal des souris hétérozygotes *Nf1*<sup>+/-</sup> est fortement réduit par rapport aux souris sauvages (Wt). Un agoniste inverse du récepteur réduit (dans une moindre mesure), le niveau d'AMPC cérébral

chez la souris sauvage alors qu'il n'a pas d'effet sur le niveau réduit d'AMPC mesuré dans le cortex des souris  $Nf1^{+/-}$ . Ces derniers résultats suggèrent que l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et NF1 exprimés de façon endogène, en contrôlant l'activité constitutive du récepteur, joue un rôle clef dans la régulation de la concentration intracérébrale d'AMPC. Cette étude décrit également un des premiers exemples de la modulation de l'activité constitutive d'un RCPG par une de ses GIPs.

Il reste encore beaucoup à découvrir concernant les mécanismes de régulation de l'activité constitutive des RCPGs. L'étude des partenaires du récepteur semble être une stratégie prometteuse pour mettre en lumière de nouveaux mécanismes notamment dans les processus neurodéveloppementaux.

# Chapitre II : Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> de la sérotonine : un acteur clef du neurodéveloppement

La sérotonine est connue depuis longtemps pour son rôle crucial de régulateur des processus neurodéveloppementaux. Elle module notamment la migration, la cytoarchitecture et la connectivité neuronale (Homberg, Kolk, et Schubert 2013; Rojas et al. 2014). Le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, du fait de son expression précoce et de son interactome riche en partenaires contrôlant la dynamique du cytosquelette d'actine, pourrait contribuer à certains effets neurodéveloppementaux de la sérotonine. Dans ce chapitre, après avoir décrit les grandes étapes de la mise en place du système nerveux, nous étudierons leur modulation par la sérotonine et le récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

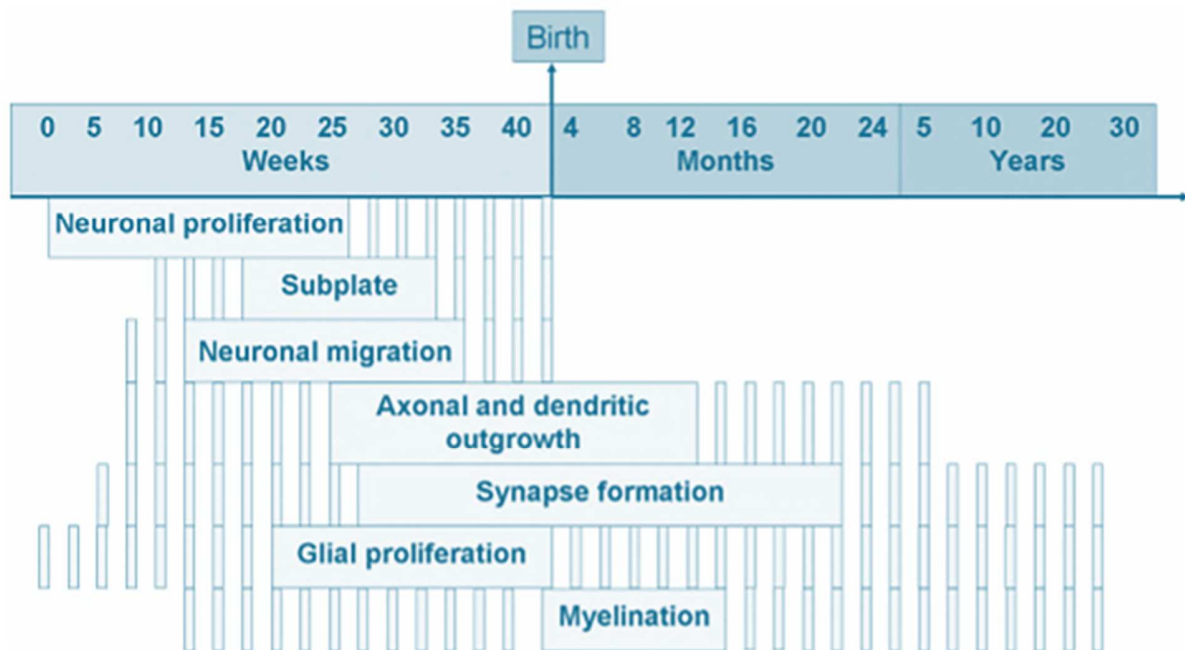
## I. Les grandes étapes du développement du système nerveux

L'objectif de cette partie est d'aborder les différentes étapes du développement du système nerveux (figure 8) d'un point de vue macroscopique afin de revenir de façon détaillée sur les implications plus spécifiques de la sérotonine et du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans chacune de ces étapes.

### a. Formation des vésicules cérébrales

Le développement du système nerveux commence très précocement au cours de l'embryogénèse autour du jour embryonnaire 7 (E7) chez la souris et durant la troisième semaine de gestation chez l'Homme. A ce stade, l'embryon se divise en trois feuillets : l'endoderme, le mésoderme et l'**ectoderme**. Ce dernier donnera les systèmes nerveux central et périphérique. Sous l'influence de facteurs d'induction, certaines cellules de l'ectoderme vont s'individualiser pour former des **cellules souches neuro-épithéliales** constituant la première ébauche du tissu nerveux. Ce tissu va prendre la forme d'une plaque neurale puis s'invaginer pour former une gouttière. Enfin, un tube neural (ébauche du système nerveux central) et des crêtes neurales (ébauches du système nerveux périphérique), vont apparaître.





**Figure 7-Chronologie du développement du système nerveux central.**

Les lignes discontinues signifient que le processus est actif tandis que les lignes pleines signifient que le processus est à son apogée. *D'après Vitalis et al, 2013 Front Cell Neurosci.*

Peu à peu, le **tube neural** va acquérir une polarité antéro-postérieure qui va le mener à se subdiviser en prosencéphale, mésencéphale et rhombencéphale. Au cours de la 5<sup>ème</sup> semaine chez l'Homme, deux de ces trois **vésicules primaires** se fractionnent. Le prosencéphale donne naissance au télencéphale et au diencéphale (ébauches des hémisphères corticaux, du striatum dorsal et de l'hippocampe, du thalamus, de l'hypothalamus et des parties neuronales de l'épithalamus). Le rhombencéphale se subdivise en myélencéphale et en métencéphale qui formeront le pont, le bulbe rachidien et le cervelet. La vésicule mésencéphalique ne se divise pas, elle constituera la partie haute du tronc cérébral.

## b. Les grandes étapes de la différenciation neuronale

**La paroi du tube neural** est formée de trois couches : ventriculaire, intermédiaire et marginale. Les cellules souches neuro-épithéliales se divisent dans la zone ventriculaire. Lors d'une mitose dite « critique », elles produisent une ultime cellule fille et un neuroblaste, cellule post-mitotique qui se différencie en neurone. La différenciation neuronale suit des étapes complexes, dynamiques et séquentielles bien déterminées (figure 7).

- **La migration neuronale**

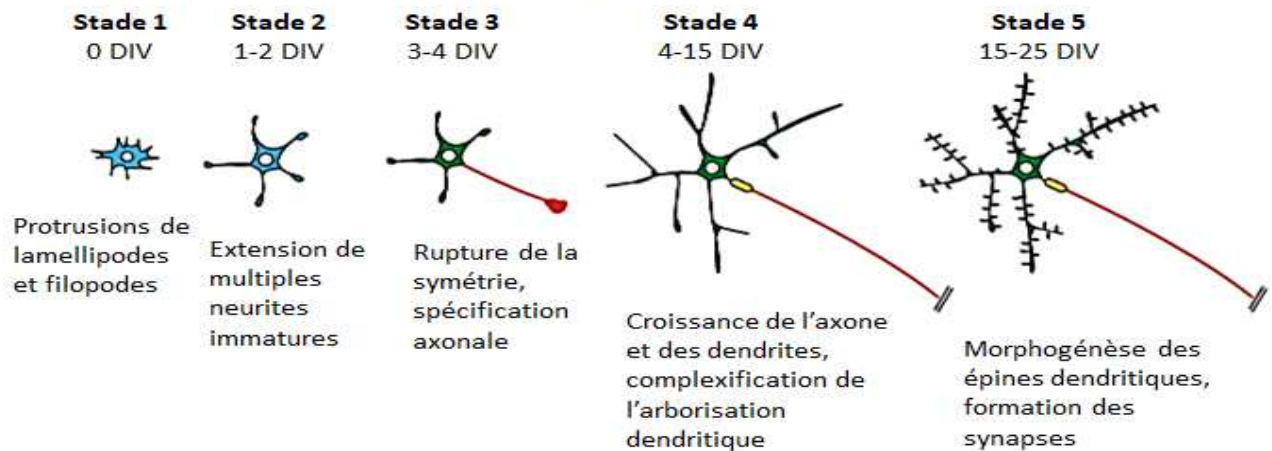
Les neuroblastes migrent tout d'abord plus en périphérie du tube neural, dans une couche d'accueil prédéterminée. Le schéma de migration est spécifique de la région concernée et du type neuronal. Dans les régions du cerveau qui présentent une stratification cellulaire (cortex, hippocampe, cervelet), la lamination correcte repose sur la migration coordonnée et précise de différents sous types de neurones pyramidaux excitateurs et d'interneurones GABAergiques dans des couches spécifiques en partant des couches profondes vers les couches superficielles (Hatten 1993; Rakic 1978; Kornack et Rakic 1995). Dans ce type de structures, la majorité des neuroblastes va adopter une migration radiale, perpendiculaire à la surface ventriculaire et guidée par la glie radiaire. Les neurones constituant les structures non laminaires (striatum, thalamus, bulbes olfactifs...) et la plupart des interneurones GABAergiques adoptent une migration de type tangentielle et parallèle à la surface ventriculaire (McManus et al. 2004; Monk, Webb, et Nelson 2001; O'Rourke et al. 1992).

- **La différenciation des neuroblastes**

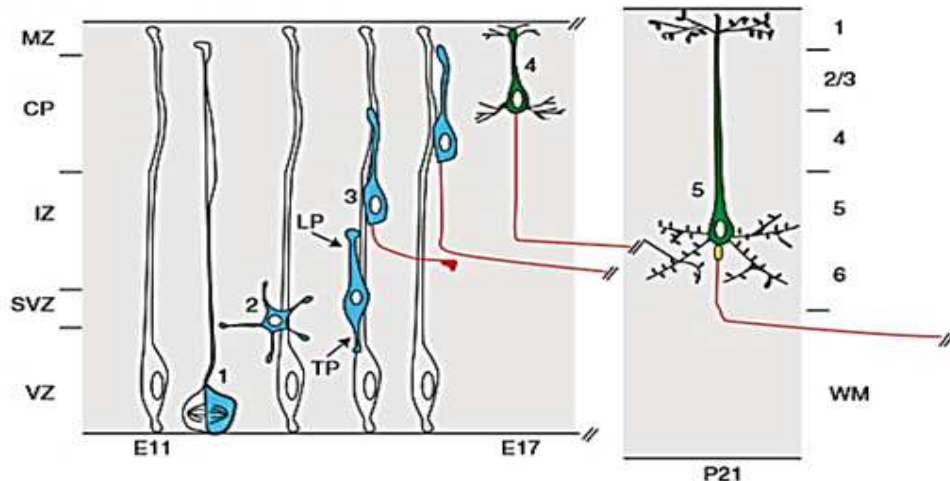
Une fois que le neuroblaste a atteint son emplacement définitif, la différenciation des prolongements va débuter. D'abord indifférenciés, ces **prolongements ou neurites** vont rapidement se ségréger en deux types : l'axone, prolongement plus long qui présente à son extrémité un cône de croissance, et les dendrites, prolongements plus courts et ramifiés. Ces stades de différenciation ont été largement décrits dans les cultures primaires de neurones corticaux et hippocampiques (figure 7) (Dotti, Sullivan, et Banker 1988; Fletcher et Banker 1989; Polleux et Snider 2010).

L'**axone** va croître jusqu'à atteindre sa cible et former une synapse. Le **cône de croissance**, extension située à l'extrémité distale de l'axone, est une structure labile, extrêmement dynamique et riche en actine. Il est le moteur du déplacement de l'axone. Son rôle est de « sonder » les signaux moléculaires présents dans l'environnement extracellulaire et d'y répondre en orientant la croissance de l'axone. Le type de molécule de guidance, leur gradient de concentration et le contenu du cône de croissance en récepteurs et réseaux protéiques associés influencent directement la vitesse et la direction

## A. Différenciation des neurones corticaux *in vitro*



## B. Différenciation des neurones corticaux *in vivo*



**Figure 8- Parallèle entre la différenciation du neurone *in vitro* et *in vivo***

**(A)** Description des stades de différenciation des neurones corticaux en culture. Au stade 1, les premières heures suivant l'ensemencement, les neurones post mitotiques émettent de façon dynamique de multiples protrusions, de type lamellipodes ou filopodes. Au stade 2, entre 24h et 48h de culture (1-2DIV, *Days In Vitro*), ces protrusions donnent naissance à une multitude de neurites immatures. Au stade 3, entre 2 et 4 DIV, la polarisation neuronale débute, un neurite se différencie des autres et devient l'axone tandis que les autres prolongements acquièrent une identité dendritique. Durant le stade 4, partir de 4 DIV, l'ensemble des prolongements pousse rapidement, tandis que l'arborisation dendritique commence à se complexifier. Au stade 5, après plus de 15 jours en culture, les neurones terminent leur différenciation, des épines dendritiques apparaissent et des synapses commencent à se former. **(B)** *In vivo*, la polarisation neuronale se produit concomitamment avec la migration radiale. Les cellules post-mitotiques (1) vont passer par un stade multipolaire transitoire (2) avant d'acquies une morphologie bipolaire. Un neurite se développant plus rapidement va former le «*leading process*» (LP) suivi par le «*trailing process*» (TP) qui donneront naissance à la dendrite apicale et à l'axone, respectivement. Une fois leur position finale atteinte, les neurones poursuivent leur différenciation. La complexification de l'arborisation dendritique, la projection de prolongements vers d'autres structures et l'établissement de contacts synaptique continueront jusqu'en post natal. *Modifié depuis Polleux et Snider, 2010, Cold Spring Harb Perspect Biol.*

de croissance du prolongement. Une fois la cible atteinte, le cône de croissance disparaît, l'extrémité de l'axone s'aplatit pour venir former une **synapse**.

En parallèle, l'**arborisation dendritique** va se densifier, se complexifier pour finalement adopter un profil cytoarchitectural typique, propre à chaque type neuronal. À la surface des dendrites vont apparaître des épines, microdomaines spécialisés dans la réception des contacts synaptiques excitateurs. Un très grand nombre de synapses vont ainsi se former durant la gestation et tout au long de la vie. Les connexions synaptiques entre les neurones au début du développement sont cependant le plus souvent des tremplins transitoires vers les connexions plus stables qui caractérisent les circuits plus matures. En effet, l'élimination des axones, dendrites et synapses surnuméraires, ainsi que l'apoptose neuronale font partie d'un processus d'**élagage** extrêmement important pour la fonctionnalité des réseaux neuronaux. Cet élagage comprend plusieurs phases : il débute lors des étapes tardives de la gestation, augmente transitoirement après la naissance, puis une deuxième vague survient lors de l'adolescence (Cowan et al. 1984).

### c. Les acteurs cellulaires du développement du système nerveux

De nombreux acteurs participent à ces différentes étapes du neurodéveloppement, qu'il s'agisse de signaux extracellulaires, intracellulaires, ou de gènes spécifiques dont l'expression suit une séquence spatio-temporelle bien définie. Les signaux extracellulaires sont souvent exprimés sous forme de gradient. Parmi ces signaux, on retrouve des **molécules d'adhésion** (laminine, NgCAM), des **molécules de guidance** (Reelin, Netrin-1, Sema3A), des **facteurs neurotrophiques** (BDNF, NGF) et des neurotransmetteurs, (monoamines, Glutamate, acétylcholine) ou encore des **cytokines**. Ces molécules agissent le plus souvent *via* des récepteurs, souvent de type tyrosine kinases (RTKs) ou RCPGs. Ceux-ci vont exercer leurs effets en mettant en jeu différents mécanismes de signalisation intracellulaires comme des **protéines kinases**, (PKA, PKC, Cdk5, AKT, JNK...), des **phosphatases** (PTEN, PP2A) ; des facteurs de transcription (SRF, CREB) ou encore des **petites GTPases** (Cdc42, RhoA, Ras, Rac1).

L'**AMPC** figure parmi les seconds messagers dont l'importance a été clairement démontrée. L'élévation de la concentration intracellulaire d'AMPC a notamment été associée à une augmentation de la pousse neuritique et à la régénérescence axonale (Stiles, Kapiloff, et Goldberg 2014).

L'ensemble de ces événements cellulaires converge vers la modulation du cytosquelette d'actine et des microtubules. Les jeux de phosphorylation/déphosphorylation et l'expression induite de facteurs régulateurs (par exemple p35, activateur de Cdk5) permettent de gérer la croissance et la rétraction du cytosquelette d'actine et ainsi d'orienter avec précision la différenciation des neuroblastes. L'orchestration stricte et minutieuse de ces événements est indispensable au développement harmonieux du système nerveux. La sérotonine est un élément de régulation majeur à chacune de ces étapes (Vitalis et Parnavelas 2003; Schubert 2014).

## II. Les fonctions de la sérotonine et du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le développement du système nerveux

Nous allons dans cette partie détailler l'implication de la sérotonine dans les différents stades du neurodéveloppement, puis dans un second temps mettre en exergue le rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

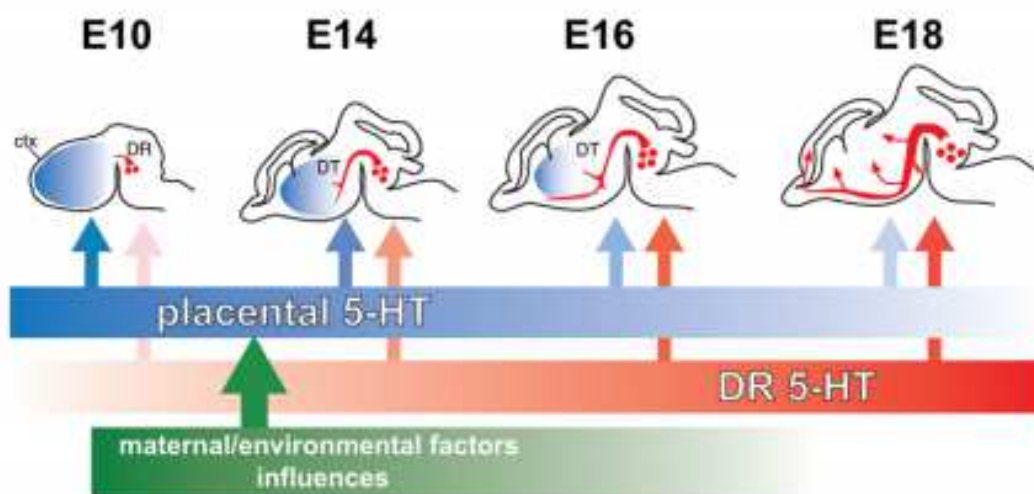
### a. Prolifération des progéniteurs neuronaux

#### iv. *Neurogénèse embryonnaire*

La première étape majeure de la constitution du système nerveux centrale est la prolifération des progéniteurs neuronaux. Elle débute autour du stade E7 chez la souris et autour de la 10<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme pour ne se terminer qu'après la naissance.

##### ○ **Rôle de la sérotonine dans la neurogenèse**

Au cours des toutes premières étapes de la division des cellules souches neuro-épithéliales, c'est la sérotonine d'origine extra embryonnaire qui joue un rôle majeur. La sérotonine embryonnaire prend le relais autour du jour E15 chez la souris, le temps pour les prolongements sérotoninergiques d'atteindre leurs cibles corticales et sous corticales (figure 9).



**Figure 9- Sources de sérotonine durant le développement.**

Les sources de sérotonines contribuant au développement du cerveau évoluent au cours du temps. Initialement, la sérotonine de source exogène (placentaire et maternelle) passe la barrière hémato encéphalique, perméable, et contribue au neurodéveloppement. Autour de E10, les premiers neurones sérotoninergiques apparaissent au niveau du raphé dorsal, ils innervent progressivement le cortex durant le dernier tiers du développement embryonnaire. Ce changement au cours du développement permet au cerveau de l'embryon de devenir progressivement dépendant de sa propre production de 5-HT. On peut noter qu'avant la fermeture de la barrière hémato encéphalique, les facteurs environnementaux influençant la production ou la dégradation de la sérotonine maternelle auront un impact direct sur l'embryon. DR, raphé dorsal ; DT, thalamus dorsal; ctx, cortex. Modèle proposé par Bonnin *et al.* 2011

De nombreux travaux ont démontré l'importance de la sérotonine en tant que signal régulateur de la prolifération des progéniteurs neuronaux. En premier lieu, il a été constaté que la déplétion pharmacologique ou génétique des niveaux de sérotonine embryonnaire induit une réduction de la taille du cerveau, supposant une diminution de l'activité mitotique (Vitalis, Ansorge, et Dayer 2013). Dans ce sens, Vitalis *et al* (2007) ont montré qu'une injection quotidienne de para-Chlorophenylalanine (PCPA), un inhibiteur de la tryptophane hydroxylase, (entre les jours E12 et E17) chez les souris gestantes altère la prolifération des cibles de l'innervation sérotoninergique en particulier dans l'hippocampe et le cortex (Vitalis et al. 2007). Corroborant ces études *in vivo*, un traitement à la paroxétine (inhibiteur de la recapture de la sérotonine) augmente la prolifération des cellules souches des crêtes neurales en culture (Vichier-Guerre et al. 2017).

Côté *et al.* ont démontré l'importance de **la sérotonine maternelle** en utilisant des souris génétiquement déplétées pour la tph1 (tph1<sup>-/-</sup>), l'enzyme de synthèse de la sérotonine périphérique. Les embryons hétérozygotes (tph1<sup>+/-</sup>) dont la mère est homozygote (tph1<sup>-/-</sup>) présentent des anomalies développementales sévères et une réduction de 30% de l'incorporation du BrdU dans la zone ventriculaire (indicateur de l'activité mitotique) comparés aux embryons tph1<sup>-/-</sup> dont la mère est hétérozygote. Ces données indiquent un rôle majeur de la sérotonine d'origine maternelle dans les étapes précoces du développement (Côté et al. 2007).

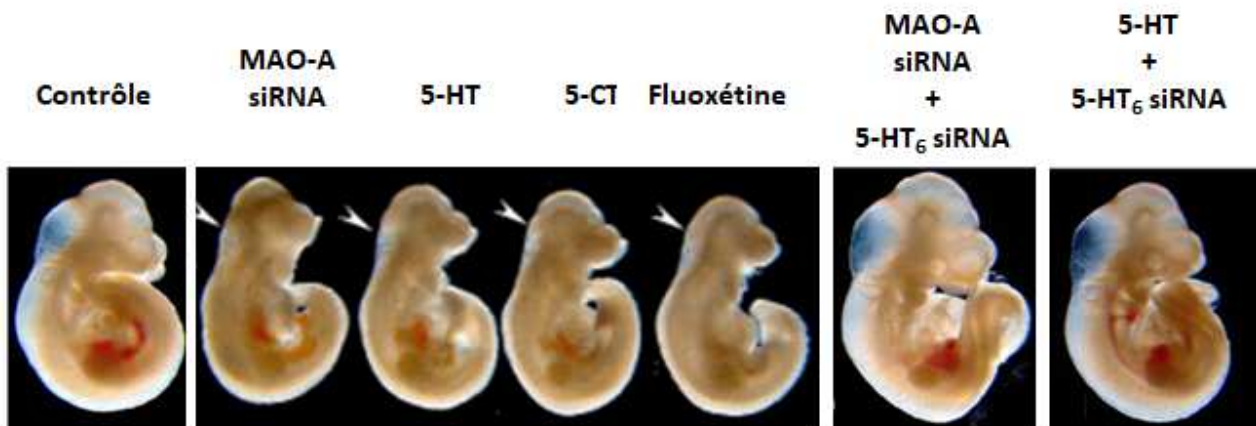
Une **augmentation** trop importante des niveaux de 5-HT semble à l'inverse délétère. En effet, la micro injection directe de sérotonine dans la cavité amniotique entre les jours E7.5 et E10.5 induit des altérations importantes du développement cérébral (Noto et al. 2016). De même, les souris génétiquement déplétées pour les monoamine oxydases MAO A et B (MAO-A/B<sup>-/-</sup>) enzymes impliquées dans le catabolisme de la sérotonine, présentent une forte élévation du taux de sérotonine, et une **diminution de la prolifération** des cellules souches neuro-épithéliales (Cheng et al. 2010). Soulignant l'importance d'une modulation fine de la concentration de sérotonine, son addition dans le milieu de culture stimule la prolifération des neurosphères télencéphaliques provenant d'embryons sauvages, mais ne montre aucun effet sur les cultures d'embryons (MAO-A/B<sup>-/-</sup>) dont le niveau de sérotonine est déjà élevé.

Au-delà de ses effets directs sur la prolifération, la sérotonine semble également jouer un rôle important dans la régulation de la mort cellulaire. En effet, l'inhibition pharmacologique ou la déplétion génétique de la MAO-A entre E7,5 et E10,5 provoque des anomalies structurales associées à une **diminution de l'activité apoptotique** (C. C. Wang et al. 2014; Noto et al. 2016; C. C. Wang et al. 2011). Cette observation est cohérente avec les effets protecteurs de la sérotonine contre la mort cellulaire, largement documentés (Ryu et al. 2016).

Collectivement, ces études suggèrent que la sérotonine joue un rôle majeur dans la régulation de la prolifération des progéniteurs neuronaux, par ses effets pro-mitotiques et anti-apoptotiques. La régulation fine de sa concentration semble être cruciale pour une prolifération harmonieuse des cellules souches neurales.

○ **Rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la neurogénèse**

Une étude de 2014 s'est consacrée au rôle **du récepteur 5-HT<sub>6</sub>** dans les anomalies développementales induites par l'excès de sérotonine. Les auteurs ont démontré que l'inhibition pharmacologique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ou l'inhibition de son expression par un siRNA normalise les altérations développementales chez les souris MAO-A<sup>(-/-)</sup> et chez les animaux traités à la fluoxétine ou à la sérotonine au jour E10,5 (figure 10). Plus précisément, les auteurs ont observé que l'inhibition du récepteur restaure l'activation des caspases 3 et 9 et ramène l'activité apoptotique à un niveau normal



**Figure 10- L'invalidation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> restaure les anomalies développementales induites par l'élévation du taux de sérotonine.**

Les embryons ont été retirés des mères gestantes à E7,5, les effets des traitements ont été observés après 72h de développement en culture. L'élévation du niveau de sérotonine exogène a été induite de différentes façon : par l'électroporation d'un siRNA ciblant la monoamine oxydase A (MAO-A), ou par le traitement des embryons directement avec la 5-HT ou un analogue de la 5-HT (5-carboxamidotryptamine, 5-CT) ou un inhibiteur de la recapture de la 5-HT (fluoxétine). On observe que l'augmentation de la concentration exogène en sérotonine, quelle que soit la méthode utilisée induit des altérations développementales. L'inhibition de l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> par l'électroporation d'un siRNA restaure un phénotype normal. La sur stimulation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> par la sérotonine durant les phases précoces du développement de l'encéphale semble donc responsable d'une partie des anomalies développementales observées chez les souris MAO-A<sup>(-/-)</sup> ou celles traitées à la fluoxétine. *D'après Wang et al, 2013, J. Chem Biol.*

(C. C. Wang et al. 2014). Il semblerait donc que l'excès de sérotonine chez les souris MAO-A<sup>(-/-)</sup> active le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, déclenchant ainsi des cascades de signalisation qui inhibent la mort cellulaire. On peut par ailleurs noter que l'interaction du récepteur avec Jab1 a été associée en culture à des effets protecteurs contre la mort cellulaire dans des conditions de stress (Yun et al. 2010). Etant donné le rôle



bien documenté de Jab1 dans la protection contre l'apoptose, (H. Wang et al. 2011; L. Wang, Zheng, et Pei 2016; Shackelford et Claret 2010), il est possible que les effets protecteurs de la sérotonine contre la mort cellulaire durant le développement impliquent le recrutement de Jab1 suite à l'activation du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

#### **v. Neurogenèse adulte**

Au cours des dernières décennies, l'existence d'une prolifération des progéniteurs neuronaux à l'âge adulte a été mise en évidence dans de nombreuses espèces y compris chez l'Homme. De nombreuses évidences montrent son implication dans la cognition, en particulier la mémorisation, et son association avec certaines maladies, comme la dépression. Plusieurs facteurs peuvent influencer la neurogenèse adulte comme le stress, facteur délétère qui induit une élévation du taux de glucocorticoïdes.

##### **○ Rôle de la sérotonine dans la neurogenèse adulte**

Différentes études démontrent l'implication de la sérotonine dans la neurogenèse adulte. À l'image de ses effets embryonnaires, l'inhibition de la recapture de la sérotonine augmente la prolifération des précurseurs neuronaux dans l'hippocampe à l'âge adulte (Gould 1999; Jacobs, van Praag, et Gage 2000; Pechnick et al. 2011). Il est intéressant de noter que la diminution de la neurogenèse induite par le stress précipite les épisodes de dépression. Ainsi, les inhibiteurs de la recapture prescrits en première intention pour le traitement de la dépression exerceraient leurs effets sur l'humeur en partie par une augmentation de la neurogénèse (Paizanis, Hamon, et Lanfumey 2007).

##### **○ Rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la neurogenèse adulte**

Le rôle du **récepteur 5-HT<sub>6</sub>** n'a pas encore été étudié dans le contexte spécifique de la neurogenèse adulte. Cependant, le rôle du cil primaire a été mis en lumière depuis quelques années dans l'intégration des signaux menant à la prolifération des précurseurs neuronaux chez l'adulte (Whitfield et Chakravarthy 2009). Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est fortement exprimé dans le cil et plusieurs études ont démontré son importance dans la régulation de la morphologie et la fonction du cil primaire (Hu, Wang, et Zhang 2017; Brodsky et al. 2017; Guadiana et al. 2013; Lesiak et al. 2018). Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> exprimé dans le cil pourrait donc être un acteur important de la neurogenèse à l'âge adulte. Des études sont requises pour élucider ce point.

## b. Migration neuronale

Les neuroblastes issus des progéniteurs neuronaux dans la zone ventriculaire commencent leur différenciation en migrant dans une couche spécifique. Cette étape est particulièrement importante car une erreur de positionnement peut avoir des répercussions graves sur la connectivité cérébrale. Ce type d'anomalie a été impliqué dans différentes pathologies comme l'épilepsie.

### ○ Rôle de la sérotonine dans la migration

La sérotonine apparaît comme un acteur clef de la migration de nombreux types neuronaux. Son implication dans la migration des neuroblastes a tout d'abord été mise en évidence par des approches pharmacologiques sur tranches de cerveau. Plusieurs études ont démontré que l'application de **concentration élevées de sérotonine** (à partir de 100  $\mu$ M) réduit la vitesse de migration des interneurons GABAergique et des neurones pyramidaux. Ce ralentissement induit des anomalies de positionnement de certains neurones au sein des couches corticales (Riccio et al. 2009, 2011; Vitalis et Parnavelas 2003). De même, chez les souris  $SERT^{-/-}$  qui présentent un taux élevé de sérotonine extracellulaire, on observe une distribution anormale des neurones pyramidaux dans les régions superficielles de la plaque corticale (Frazer, Otomo, et Dayer 2015; Riccio et al. 2009, 2009; Vitalis, Ansorge, et Dayer 2013; Dayer et al. 2015).

**La reeline** est un des acteurs qui pourrait expliquer les anomalies de la migration induites par l'excès de sérotonine. La reeline est une glycoprotéine sécrétée par les cellules de Cajal-Retzius localisées dans la zone marginale. Elle est exprimée sous forme de gradient dans le cortex en développement. Elle est connue pour jouer un rôle majeur dans le contrôle du positionnement des neuroblastes en migration, l'établissement de la lamination correcte du cortex mais également dans la différenciation neuronale et la plasticité à l'âge adulte (Supèr et al. 2000; Soriano et Del Río 2005; Lakatosova et Ostatnikova 2012). En particulier, la reeline est très importante pour la formation des micro-colonnes, unités de base de la circuiterie corticale. La réduction des niveaux de reeline au stade post-natal induit des malformations graves de la circuiterie corticale et notamment des micro-colonnes (Mountcastle 2003; Sarnat et Flores-Sarnat 2002). De nombreuses publications indiquent que **la sécrétion de reeline est contrôlée par la sérotonine** notamment durant les phases tardives de l'embryogenèse. En effet, les cellules de Cajal-Retzius sont innervées par des fibres sérotoninergiques (Janusonis, Gluncic, et Rakic 2004). Ainsi, **une**

**hyperserotoninergie durant l'embryogenèse induit une diminution du taux de reeline** qui pourrait expliquer les altérations de l'organisation corticale observées (Janusonis, Gluncic, et Rakic 2004).

Un **défaut de sérotonine** altère également la migration. En effet, un traitement au PCPA entre E12 et E17 engendre des erreurs de positionnement de certains neurones corticaux (Vitalis et Parnavelas 2003; Vitalis et al. 2007). De plus, les souris  $5\text{-HTT}^{-/-}$  présentent une réduction de la densité de neurones GABAergiques dans l'amygdale et le cortex préfrontal, laissant supposer un défaut de migration de ceux-ci (Waider et al. 2013).

En faveur d'un **effet dose de la sérotonine**, Hornung *et al.* ont démontré sur des explants corticaux, que l'addition de faibles concentrations de sérotonine (5  $\mu\text{M}$ ) accélère la migration des neurones au lieu de la ralentir, comme cela a été décrit pour des fortes concentrations (Durig et Hornung 2000; Hornung 2003).

Ces données suggèrent que la concentration en sérotonine extracellulaire est un facteur critique de ses effets sur la migration neuronale. On peut également relever que les protocoles utilisés ont conduit à une diminution ou une augmentation linéaire de la concentration extracellulaire de sérotonine. Or les mécanismes contrôlant la direction et la vitesse de migration des neuroblastes mettent souvent en jeu des gradients, continus ou par paliers, de concentrations de signaux moléculaires. On ne peut pas exclure qu'au-delà de la modification de la concentration de sérotonine en valeur absolue, ce sont des altérations des **gradients de concentrations** qui perturbent la migration des neuroblastes. En effet, la sérotonine pourrait être présente sous forme de gradient aux stades embryonnaires permettant, selon sa concentration, d'accélérer ou de stopper la migration, avec des effets différentiels selon le type neuronal concerné et le(s) récepteur(s) exprimé(s).

- **Rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la migration**

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> pourrait participer à cette régulation précise de la migration. En effet, Riccio *et al.* ont démontré en 2009 et 2011 par cytométrie de flux puis qRT-PCR que les interneurones GABAergiques et les neurones pyramidaux expriment le récepteur 5-HT<sub>6</sub> pendant la migration. Ils ont ensuite montré que l'application d'EMD 386088, un agoniste spécifique du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, réduit la vitesse de migration des neurones corticaux, un effet reproduit par l'élévation du taux de sérotonine. De

plus, l'application de SB258585 (antagoniste sélectif du récepteur 5-HT<sub>6</sub>) réverse en grande partie les effets de l'excès de sérotonine sur la migration neuronale. Il semblerait donc que la majeure partie des effets délétères de l'excès de sérotonine soit due à une activation non physiologique du récepteur 5-HT<sub>6</sub>. Plus particulièrement, c'est le couplage du récepteur à la voie Gs qui semble être responsable, le traitement avec un analogue non hydrolysable de l'AMPc (le rpCAMP) ou un inhibiteur de la PKA reversant les effets de la sérotonine de la même façon que le SB258585.

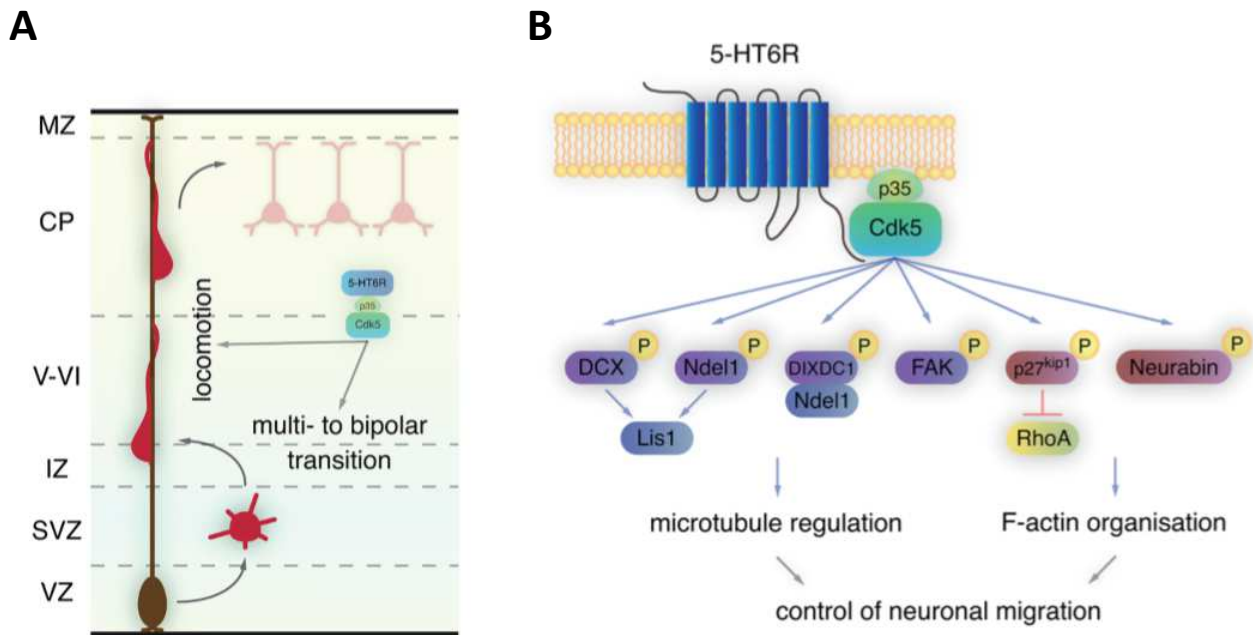
Il est intéressant de souligner que l'application du SB258585 ne réverse que **partiellement** les effets de la sérotonine. Cela pourrait bien sûr s'expliquer par l'implication possible d'autres récepteurs. Les auteurs n'ont cependant trouvé que le récepteur 5-HT<sub>3</sub> coexprimé avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les neurones en migration, et sa modulation pharmacologique n'a montré aucun effet. Au-delà de cette première hypothèse, la restauration partielle du phénotype par le SB258585 pourrait s'expliquer par l'importance de l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub>. En effet, le SB258585 n'est pas seulement un antagoniste spécifique mais aussi un **agoniste inverse** du récepteur (Duhr et al. 2014). Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est connu pour présenter une forte activité constitutive vis-à-vis de plusieurs de ses voies de signalisation. Il est possible que l'application du SB258585 réverse les effets délétères de l'excès de sérotonine induits par la suractivation de la voie Gs (de par son action antagoniste), mais **inhibe également d'autres voies de signalisation constitutivement activées** par le récepteur et importantes pour la migration. Si cette hypothèse est correcte, l'application d'un antagoniste neutre devrait restaurer entièrement les effets de l'excès de sérotonine.

Corroborant cette hypothèse, les travaux de Jacobshagen *et al.* (2014) indiquent que l'interaction constitutive du récepteur avec la kinase Cdk5 et l'activation agoniste-indépendante de la voie Cdk5 par le récepteur jouent un rôle crucial dans la migration correcte des neurones corticaux. Les auteurs ont montré que l'électroporation *in utero* d'un shRNA inhibant l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> à E14,5 induit des anomalies de positionnement des neurones. La protéine Cdk5 et son activateur p35, régulateurs clef de la migration neuronale, tous deux identifiés dans l'interactome du récepteur, sont potentiellement impliqués dans ces effets. De fait, la surexpression de Cdk5 et de p35 restaure les altérations de migration induites par l'extinction de l'expression du récepteur 5HT<sub>6</sub>. De plus, l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> est capable d'induire la phosphorylation de substrats de Cdk5 impliqués dans le contrôle de la

migration (la kinase d'adhésion focale et la doublecortine) selon un mécanisme indépendant de la présence d'agoniste, démontrant une activation constitutive de la voie Cdk5 (figure 11). Ces effets sont également indépendants de la voie Gs car l'expression d'un récepteur 5-HT<sub>6</sub> muté sur le site de liaison de la protéine Gs (Gsdead) restaure un profil de migration normal chez les animaux où l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> endogène a été invalidé par électroporation *in utero* d'un shRNA (Jacobshagen et al. 2014).

Enfin, il est intéressant de noter que l'interactome du récepteur 5-HT<sub>6</sub> contient deux protéines connues pour leur interaction fonctionnelle avec la reeline : Cdk5 et Fyn (Duhr et al. 2014). En effet, la reeline en se liant aux récepteurs ApoER2 (apolipoprotein E receptor 2) et VLDLR (very low density lipoprotein receptor) induit l'activation de la kinase Fyn qui va phosphoryler la protéine Dab1. Cette étape est essentielle au bon déroulement de la migration neuronale. En effet, Dab1, une fois phosphorylée par Fyn, recrute une large gamme de protéines et active de multiples cascades de signalisation, qui conduisent à un remodelage du cytosquelette et un contrôle précis du positionnement neuronal. Cdk5 intervient également dans la modulation de la signalisation de la reeline en phosphorylant Dab1 sur un autre site, engendrant sa dégradation progressive (Katsuyama et Terashima 2009; Beffert et al. 2004; Ohshima et al. 2007; Ohshima et Mikoshiba 2002; Moon et al. 2015). Le lien entre la reeline et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> reste à établir, mais il pourrait constituer le maillon en aval de Cdk5 sous tendant l'implication du récepteur dans la migration neuronale.

L'ensemble de ces études suggère un rôle majeur du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les anomalies du positionnement neuronal causées par un excès de sérotonine.



**Figure 11- La voie 5-HT<sub>6</sub>/Cdk5 contrôle la migration des neurones pyramidaux**

(A) Le complexe 5-HT<sub>6</sub>/Cdk5 contrôle deux étapes distinctes du processus de migration des neurones pyramidaux : le passage d'un état multipolaire à bipolaire et la phase de migration guidée par les cellules gliales (migration radiaire). (B) Le complexe 5HT<sub>6</sub>/Cdk5 phosphoryle la kinase d'adhésion focale (FAK) et la doublecortine, protéine associée aux microtubules (DCX). Plusieurs autres cibles en aval de Cdk5 contrôlent la dynamique du cytosquelette et la migration neuronale, parmi lesquelles, la protéine de liaison lissencéphalie 1 (Lis 1) Ndel1, le « DIX domain containing 1 » (DIXDC1), la protéine inhibitrice Cdkp27kip1 et la neurabine. D'après *Dayer et al, 2015, J. Chem Biol*

### c. Différenciation des neuroblastes

Une fois sa destination atteinte, le neuroblaste va poursuivre sa différenciation en émettant des prolongements, ou neurites, qui donneront naissance aux dendrites et à l'axone. Le profil de l'arborisation dendritique et son domaine de projection, de même que l'extension de l'axone jusqu'à ses cibles sont déterminants pour l'assemblage précis des réseaux neuronaux. La pousse neuritique requiert une régulation précise de la dynamique du cytosquelette et du trafic membranaire et met en jeu un grand nombre d'acteurs.

- **Rôle de la sérotonine dans la différenciation neuronale**

Lauder et Krebs furent les premiers à suggérer que la sérotonine pourrait être un signal clef de la différenciation neuronale, sur la base des anomalies développementales induites par le traitement de rattes gestantes au PCPA (Lauder, Wallace, et Krebs 1981; Lauder et Krebs 1978).

Suite à ces études pionnières, de nombreuses équipes ont montré l'influence de la sérotonine sur la pousse neuritique et la complexification de l'arborisation dendritique dans différentes espèces (Vitalis, Ansorge, et Dayer 2013). Ses effets ont d'abord été étudiés sur les neurones du gastéropode *Helisoma trivolis* en culture. Dans ce modèle, la sérotonine appliquée sur le cône de croissance induit un effondrement du cône et donc un effet inhibiteur sur la pousse neuritique (Goldberg, Mills, et Kater 1991). Cet effet de l'excès de sérotonine est également observé sur des cultures primaires de neurones du raphé (Liu et Lauder 1991), de neurones corticaux (Sikich, Hickok, et Todd 1990) et de neurones de mésencéphale (Menegola et al. 2004).

Cependant, d'autres auteurs ont montré une augmentation de la pousse et de la complexification de l'arborisation dendritique des neurones thalamiques en culture suite à l'application de sérotonine (entre 0,1 et 30  $\mu$ M) (Lieske, Bennett-Clarke, et Rhoades 1999; Lotto et al. 1999; Persico, Di Pino, et Levitt 2006). De même, dans certaines lignées cellulaires, telles que les PC12 (Severin et Kondratyev 1988) ou les Neuro2A (Fricker et al. 2005), la sérotonine stimule la pousse neuritique démontrant encore une fois des effets trophiques et morphogéniques (Trakhtenberg et Goldberg 2012). Cette hétérogénéité des

effets observés pourrait être due à l'expression variable des différents récepteurs en fonction de l'espèce, du type neuronal étudié et du stade de la différenciation auquel la sérotonine est appliquée.

*In vivo*, la déplétion en sérotonine a des conséquences drastiques. Vitalis *et al.* ont montré que l'injection quotidienne de PCPA entre les stades E12 et E17 altère la longueur des dendrites et la complexité de l'arborisation des neurones pyramidaux des couches corticales III et V (Vitalis *et al.* 2007). Durig et Hornung ont également démontré que la déplétion en sérotonine induit des altérations permanentes de l'arborisation dendritique des neurones à calrétinine corticaux (Durig et Hornung 2000). De même, Riccio *et al.* ont montré que la déplétion en sérotonine altère la formation des circuits corticaux et l'arborisation dendritique des neurones corticaux (Riccio *et al.* 2011, 2009). Dans ce sens, les animaux dont la mère est nourrie avec un régime faible en tryptophane durant la période embryonnaire présentent une diminution de l'arborisation dendritique et du nombre d'épines des neurones pyramidaux du cortex et au niveau de l'aire CA1 de l'hippocampe (González-Burgos *et al.* 1996; Feria-Velasco, del Angel, et Gonzalez-Burgos 2002; Alves *et al.* 2002).

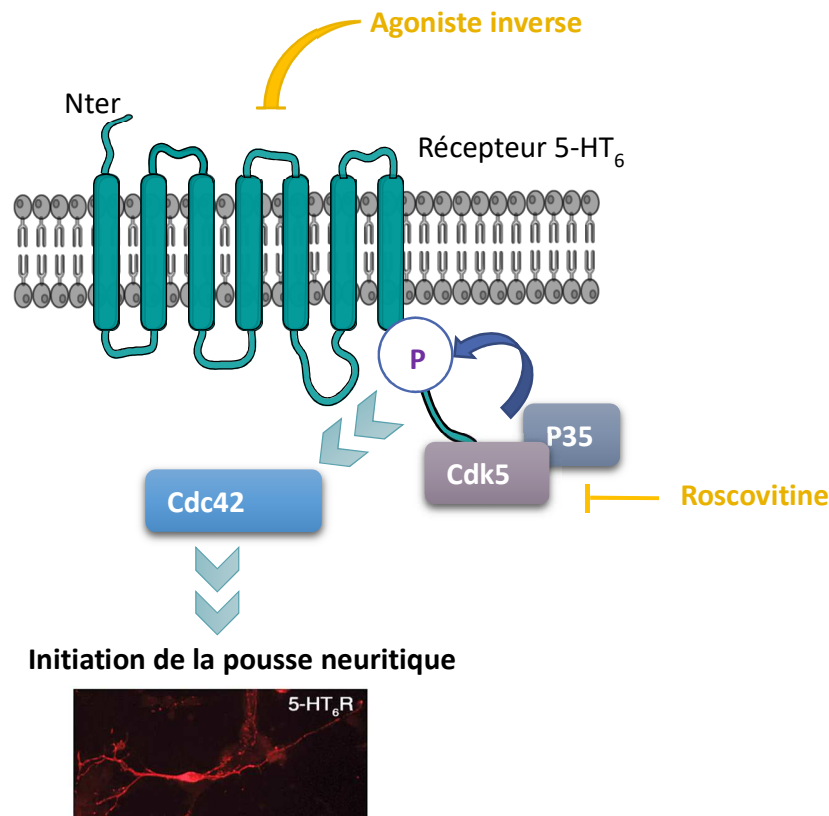
- **Rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la différenciation neuronale**

Le rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la pousse neuritique a tout d'abord été démontré par notre équipe dans une lignée cellulaire de neuroblastomes, les cellules NG 108-15 (Duhr *et al.* 2014). Ces cellules sont couramment utilisées pour étudier la différenciation neuronale. En effet, elles peuvent engager un processus de différenciation semblable à celui observé dans les neuroblastes, suite à l'application dans le milieu de culture d'un cocktail de dexaméthasone et dibutyryl cAMP (dbcAMP).

La surexpression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans ces cellules induit l'initiation d'un processus de différenciation neuronale. Dès 24h après la transfection du récepteur, les cellules commencent à émettre des neurites de façon très similaire à ce qui est observé au stade 2 de la différenciation des neurones en culture évoquée plus haut. Ces changements morphologiques s'accompagnent d'autres caractéristiques de la différenciation comme l'expression à la membrane des cellules de canaux calciques voltage-dépendants, à l'image des cellules traitées par la dexaméthasone et le dbcAMP. L'expression d'un récepteur « 5-HT<sub>6</sub> Gsdead » induit la différenciation des cellules N G108-15 aussi efficacement que le récepteur sauvage. De plus, l'application d'un agoniste du récepteur ou de rapamycine (inhibiteur de mTOR) n'ont aucun impact sur la pousse neuritique induite par l'expression du récepteur. Ce phénomène



semble donc agoniste-indépendant et ne nécessite pas l'engagement des voies Gs et mTOR. En revanche, le traitement par un agoniste inverse ou par la roscovitine (inhibiteur de Cdk5) prévient totalement la différenciation des cellules NG 108-15 à 24h, suggérant que l'activation constitutive de Cdk5 par le récepteur est responsable des effets observés. Notre équipe a ensuite pu mettre en évidence que l'interaction du récepteur avec Cdk5 induit sa phosphorylation au niveau de la sérine 350 localisé dans le domaine C-terminal. La mutation de ce résidu en alanine (5-HT<sub>6</sub>S<sup>350</sup>A), prévenant la phosphorylation du récepteur par Cdk5, a pour effet d'inhiber l'initiation de la pousse neuritique à 24h. Le même effet est observé suite à la surexpression d'un dominant négatif de Cdk5 (dépourvu d'activité kinase), supportant un rôle crucial de la phosphorylation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur la sérine<sup>350</sup>. De plus, notre équipe a démontré que cette phosphorylation déclenche l'activation de Cdc42, modulateur clef



### Figure 12- L'interaction de Cdk5 avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> promeut l'initiation de la pousse neuritique

L'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> induit l'initiation de la pousse neuritique 24h après la transfection chez les NG 108-15 d'une part, et, d'autre part augmente la longueur des neurites à 1DIV (Days In Vitro) dans les cultures primaires de neurones. Ce processus est constitutif, agoniste indépendant, et inhibé par un agoniste inverse du récepteur, le SB258585. De plus, il nécessite une phosphorylation du récepteur à la sérine 350 par Cdk5 qui permet le recrutement de Cdc42. Redessiné à partir de Duhr et al, Nat Chem Biol 2014.

du cytosquelette d'actine et médiateur de l'initiation de la pousse neuritique induite par le récepteur 5-HT<sub>6</sub>. De même, l'application d'un agoniste inverse du récepteur ou la surexpression du mutant 5-HT<sub>6</sub><sup>S350A</sup> altère significativement la pousse neuritique sur des modèles *ex vivo* tels que les neurones en culture et les explants neuronaux. Enfin, l'inactivation de l'expression du récepteur dans les neurones d'hippocampe et de striatum, en culture primaire, par interférence de l'ARN réduit significativement la longueur des neurites, mesurée 1 jour après l'ensemencement (DIV1) (figure 12).

L'ensemble de ces études a donc mis en évidence un rôle important du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans l'initiation de la différenciation neuronale. L'implication du récepteur dans les étapes suivantes de la

différenciation neuronale, telles que l'extension des neurites, la spécification axonale ou la complexification de l'arborisation dendritique reste à déterminer.

#### d. Epines dendritiques et plasticité synaptique

Les épines dendritiques accueillent la majorité des synapses excitatrices. Si leur naissance débute durant la période embryonnaire, leur remodelage continue tout au long de la vie. En effet, les épines sont des structures dynamiques qui se créent ou régressent en fonction des stimuli qu'elles reçoivent. Elles sous-tendent les processus d'apprentissage et de mémorisation en modulant l'efficacité de la neurotransmission et de la connectivité neuronale. À ce titre, les épines dendritiques sont des acteurs majeurs de la plasticité synaptique. On les retrouve altérées dans de nombreuses pathologies du système nerveux central comme par exemple la schizophrénie, la dépression ou les troubles du spectre de l'autisme (TSA) (Glausier et Lewis 2013; Phillips et Pozzo-Miller 2015; Qiao et al. 2016).

- **Rôle de la sérotonine dans la morphogénèse des épines dendritiques**

L'implication de la sérotonine dans la morphogénèse des épines dendritiques dépend, au moins en partie, du récepteur 5-HT<sub>7</sub>. Speranza *et al.* ont montré que l'application d'un agoniste spécifique du récepteur 5-HT<sub>7</sub> sur des cultures primaires de neurones corticaux et striataux augmente le nombre d'épines alors que son inhibition pharmacologique ou génétique le diminue. Ces auteurs ont démontré que ces effets impliquaient les protéines Cdk5 et Cdc42 (Speranza et al. 2017). De plus, dans une étude plus récente, la même équipe a démontré que la stimulation du récepteur 5-HT<sub>7</sub> induit une activation de la MMP9, une métalloprotéase déclenchant le remodelage des épines dendritiques, l'élagage synaptique et une altération de la potentialisation à long terme (Bijata et al. 2017). On peut noter que la MMP9 est un acteur crucial de la plasticité synaptique (Stawarski, Stefaniuk, et Wlodarczyk 2014). Ainsi, il se peut que la stimulation du récepteur 5-HT<sub>7</sub> par la sérotonine soit impliquée dans la flexibilité cognitive et l'oubli.

En parallèle, différentes études ont été consacrées aux effets des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine sur les épines dendritiques. Chez les rats adultes traités à la fluoxétine (un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine) durant la première semaine postnatale, une densification de l'arborisation dendritique est retrouvée mais un appauvrissement de la densité des épines dans le cortex

préfrontal, l'amygdale basolatérale et l'aire CA1 de l'hippocampe est observé (Ko et al. 2014; Zheng et al. 2011). Cependant, l'application aigue de fluoxétine sur des neurones en culture n'induit pas ou peu de modifications de la densité des épines dendritiques, suggérant un rôle de la chronicité du traitement dans les effets observé *in vivo* (Waller, Chen, et Sánchez 2016).

Par ailleurs, une augmentation du nombre d'épines et de contacts synaptiques a été mise en évidence suite à la stimulation par la vortioxétine dans les neurones en culture. Le même résultat est observé *in vivo* dans l'aire CA1 de l'hippocampe chez des rats traités durant une semaine (F. Chen et al. 2016; Waller, Chen, et Sánchez 2016). La vortioxétine est une molécule récemment développée pour le traitement des troubles dépressifs. Elle module la transmission sérotoninergique en exerçant une action très large sur différents récepteurs (antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>7</sub>, et 5-HT<sub>1D</sub>; agoniste partiel des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub>; agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>) et le transporteur SERT (inhibition du transport). Ses effets promoteurs de la morphogénèse des épines dendritiques sont d'autant plus intéressants à la lumière des études précédemment citées sur le récepteur 5-HT<sub>7</sub>. En effet, puisque la vortioxétine ne stimule pas ce dernier, son action implique nécessairement un autre récepteur de la sérotonine.

Ces données indiquent que la sérotonine régule la morphogénèse des épines dendritiques et la plasticité neuronale. Des études restent à réaliser afin de d'identifier les récepteurs impliqués les effets de la fluoxétine et de la vortioxétine sur la morphogénèse des épines dendritiques.

- **Rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la morphogénèse des épines dendritiques**

Dans ce contexte, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> doit être pris en considération du fait de la présence parmi ses partenaires identifiés par protéomique, plusieurs protéines connues pour leur implication dans la morphogénèse des épines, comme WAVE1, ARP2/3, mTOR et, à l'image du récepteur 5-HT<sub>7</sub>, Cdk5.

### III. GPRIN1 un partenaire prometteur du récepteur 5-HT<sub>6</sub>

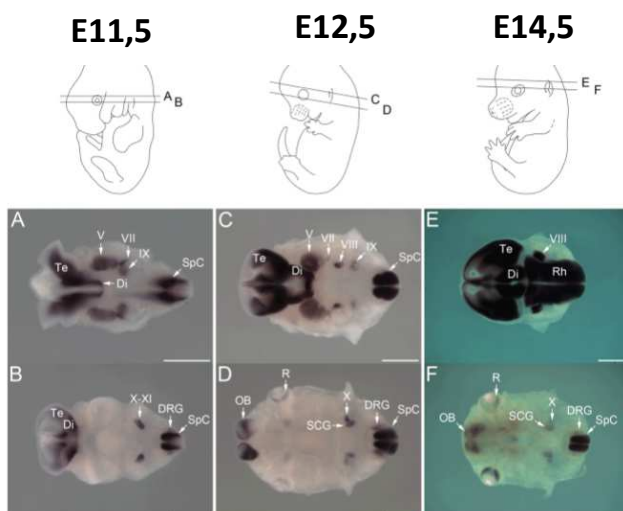
A ce jour, les effets développementaux du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont été principalement associés à son interaction avec Cdk5 ou la protéine Gs. Cependant, d'autres protéines dont l'implication dans le développement neural a déjà été mis en évidence, figurent dans l'interactome du récepteur 5-HT<sub>6</sub>. L'étude de l'interaction fonctionnelle avec ces autres partenaires constitue une approche qui promet de

mettre en lumière d'autres rôles du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le neurodéveloppement. Parmi ces partenaires, GPRIN1 (G Protein inducer of neurite outgrowth 1) apparait particulièrement prometteur.

En effet, GPRIN1 a été mis en évidence dans une étude précédente de « GST pull-down » utilisant l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT<sub>6</sub> comme appât. (Duhr et al. 2014).

Cette protéine de 827 acides aminés a initialement été découverte lors du criblage d'une banque de cDNA, ayant pour but d'identifier de nouveaux partenaires des sous-unités G $\alpha$ , en utilisant la protéine G $\alpha$ z liée au GTP $\gamma$ S comme appât (L. T. Chen, Gilman, et Kozasa 1999; Iida et Kozasa 2004). La séquence protéique de GPRIN1 ne possède aucune homologie avec des domaines ou motifs connus, rendant l'étude de sa fonction difficile. Deux autres variants ont été identifiés, GPRIN2 et GPRIN3, dont les rôles ont été peu étudiés. Ces variants présentent 48% d'homologie de séquence au niveau de leur région C-terminale. GPRIN1 est l'isoforme la plus longue et la GPRIN2 la plus courte. Si peu d'études ont à ce jour été consacrées à GPRIN1, les résultats obtenus suggèrent un rôle majeur de cette protéine dans le développement neuronal.

Tout d'abord, GPRIN1 est retrouvée spécifiquement dans le système nerveux central au niveau de la membrane des axones et dendrites. Elle n'est pas détectée dans les cellules gliales. Plus spécifiquement, l'expression de GPRIN1 est dynamique et varie au cours du temps (Masuho et al. 2008) : elle apparaît à E9,5 dans le domaine ventral de la moelle épinière puis se répartit progressivement en dorsolatéral, et on la retrouve finalement de façon quasi ubiquitaire dans le manteau embryonnaire (figure 13).



**Figure 13- Expression de GPRIN1 durant le développement.**

Coups transversales d'embryons de souris mettant en évidence l'expression des transcrits de la protéine GPRIN1 dans l'encéphale, par hybridation *in situ* à différents jours du développement embryonnaire. La représentation schématique figurant au-dessus des photos décrit les niveaux de coupe. L'expression de GPRIN1 est très forte durant le développement embryonnaire. On la trouve enrichie dans le télencéphale, le diencephale et les bulbes olfactifs de façon similaire au profil d'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub>. Te = télencéphale ; Di = diencephale ; Rh = rombencéphale ; DRG = Ganglion Rachidien Dorsal ; OB = bulbes olfactifs ; SCG = ganglion sympathique ; SpC = Moelle épinière ; les chiffres romains I à XI représentent les ganglions des nerfs crâniens correspondants. Echelle = 1mm. D'après Masuho et al, *Dev Dyn* 2008.

Durant l'embryogénèse, son expression augmente pour atteindre un pic à E16,5 et décroît après la naissance. A l'âge adulte, la localisation de GPRIN1 est restreinte à des zones bien précises incluant l'hippocampe, le striatum ventral et certaines régions corticales (Masuho et al. 2008). La dynamique de son expression est corrélée aux étapes de migration et de maturation neuronale. Des expériences d'immunohistochimie montrent un enrichissement dans le cône de croissance et dans les neurones en cours de différenciation (Iida et Kozasa 2004).

Des études fonctionnelles se sont focalisées sur le rôle de l'interaction de GPRIN1 avec les protéines  $G\alpha_i$ . En effet, une interaction préférentielle avec les formes activées des sous unités  $\alpha$  de la famille Gi dont  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_o$ ,  $G\alpha_z$  a été mise en évidence. Si l'expression de GPRIN1 seule dans les cellules Neuro2A n'a pas de conséquence spécifique, sa co-expression avec une sous-unités  $G\alpha_i/o$  activée (mutants constitutivement actif  $G\alpha_o^{205L}$ ) induit l'initiation de la pousse neuritique. En revanche, aucun effet morphologique de GPRIN1 n'a jusqu'à présent été observé en présence des sous-unités  $G\alpha_s$  ou  $G\alpha_q$  activées. La délétion du domaine d'interaction de GPRIN1 avec les protéines  $G\alpha$  (GPRIN1  $\Delta 717-827$ ) lui confère la capacité d'induire la pousse neuritique de façon constitutive même lorsque ce mutant est exprimé seul. Ces résidus semblent donc cruciaux pour l'activité de GPRIN1 dépendant des protéines G activées.

Par ailleurs, la localisation de GPRIN1 à la membrane ne semble pas requise puisque la mutation des domaines d'adressage à la membrane ne change ni son interaction avec les protéines  $G\alpha$  activées ni leur effet synergique sur la pousse neuritique. En revanche, différentes études indiquent un rôle important des petites GTPases Rac1 et Cdc42. Leur inhibition par l'expression d'un mutant un dominant négatif abolit les effets de la co-expression de GPRIN1 et de  $G\alpha_o^{205L}$  sur la pousse neuritique (Nakata et Kozasa 2005).

Outre son interaction avec les protéines  $G\alpha_i/o$ , d'autres partenaires de GPRIN1 ont été identifiés, incluant Cdk5, le récepteur Mu des opioïdes, le récepteur nicotinique  $\alpha 7$  de l'acétylcholine, le facteur de transcription E2F4, le facteur de croissance NELL2 et la protéine Sprouty2 (Hwangpo et al. 2012; Contreras-Vallejos et al. 2014; Nordman et Kabbani 2012). Ces partenaires sont tous connus pour leur

rôle dans la différenciation neuronale et constituent autant d'arguments en faveur du rôle de GPRIN1 dans la régulation du développement neuronal.

Une interaction de GPRIN1 avec le récepteur Mu des opioïdes a été identifiée par une approche de spectrométrie de masse. Les domaines du récepteur impliqués dans l'interaction avec GPRIN1 ont ensuite été étudiés : En plus de son interaction avec la sous-unité  $G\alpha_i$ , GPRIN1 peut interagir avec la 3<sup>ème</sup> boucle intracellulaire et l'extrémité C-terminale du récepteur Mu (Ge et al. 2009). Les auteurs ont également démontré que GPRIN1 joue un rôle majeur dans l'ancrage du récepteur Mu au niveau des radeaux lipidiques et amplifie de ce fait l'activation de la voie Src par le récepteur. De plus, GPRIN1 augmente la pousse neuritique induite par la stimulation du récepteur Mu par l'étorpine, un effet nécessitant l'intégrité des radeaux lipidiques (Ge et al. 2009).

De la même façon, GPRIN1 a été identifiée dans l'interactome du récepteur nicotinique  $\alpha 7$  de l'acétylcholine, un autre récepteur connu pour son implication dans le développement des synapses et la pousse neuritique (Nordman et al. 2014; Nordman et Kabbani 2012). Ainsi, dans les cultures de neurones de cortex et d'hippocampe, la régulation de la pousse neuritique par le récepteur nicotinique  $\alpha 7$  de l'acétylcholine dépend en partie de la présence de GPRIN1 (Nordman et Kabbani 2012; Nordman et al. 2014).

Enfin, il est particulièrement intéressant de souligner que GPRIN1 est un partenaire et un substrat de Cdk5. En effet, GPRIN1 peut être phosphorylée par CDK5 sur deux sites : la sérine 369 et la sérine 691 (Contreras-Vallejos et al. 2014). Si le rôle de l'interaction et de la phosphorylation de GPRIN1 par Cdk5 n'a pas encore été élucidé, il constitue une piste prometteuse dans la compréhension de ses fonctions neurodéveloppementales.

La protéine GPRIN1 a donc un pattern d'expression spatio-temporel proche de celui du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, interagit avec Cdk5, et est impliquée dans la pousse neuritique.

Dans ce contexte, l'interaction entre la protéine GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est particulièrement intéressante à étudier pour découvrir de nouvelles fonctions neurodéveloppementales du récepteur.

## IV. Le récepteur 5HT<sub>6</sub> : rôle dans la pathogénèse des maladies psychiatriques d'origine neurodéveloppementale

Comme nous avons pu le mettre en évidence lors de ce chapitre, l'homéostasie et l'équilibre de la signalisation sérotoninergique est critique pour le déroulement adapté des phases clés du développement du système nerveux.

Les perturbations neurodéveloppementales, affectant la maturation des circuits corticaux, sont des facteurs qui prédisposent et parfois même participent au déclenchement des troubles neuropsychiatriques. La schizophrénie, par exemple, est une pathologie psychiatrique dont l'origine neurodéveloppementale est maintenant communément admise (Seidman et Mirsky 2017). En effet, si elle est généralement diagnostiquée chez le jeune adulte, des signes prodromaux, comme l'émergence de troubles cognitifs, peuvent apparaître en amont laissant supposer la présence d'anomalies du développement cérébral précoce. L'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie est aussi supportée par l'observation d'anomalies de la morphologie et du positionnement neuronal ainsi que de la connectivité corticale. En association avec ces observations, un grand nombre de gènes prédisposant à la maladie sont impliqués dans la prolifération neuronale, la migration, le branching et la morphogénèse des épines dendritiques (Millan et al. 2016). Le même type d'observations sont faites pour les troubles du spectre de l'autisme (TSA), une autre catégorie de pathologies psychiatriques neurodéveloppementales qui partagent, avec la schizophrénie, certains des symptômes négatifs.

Comme précédemment discuté, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> contrôle finement des processus neurodéveloppementaux retrouvés perturbés dans de nombreuses pathologies psychiatriques. Certains de ses partenaires sont d'ailleurs connus pour leur implication dans l'émergence de troubles mentaux grave. La mutation de NF1, comme évoqué plus haut est associée à la neurofibromatose de type 1. Outre les symptômes somatiques tels que les « taches café au lait », et les neurofibromes, on retrouve des troubles cognitifs chez 50 à 70% des patients. Dans plus de 50% des cas un trouble du spectre de l'autisme est également diagnostiqué (Garg et al. 2013). La mutation d'un grand nombre de protéines associées au complexe mTORC1 induit des formes d'autisme syndromiques. La mutation de TSC1 par



exemple, inhibiteur de mTORC1, induit la sclérose tubéreuse de Bourneville. Il s'agit là encore d'une maladie neurodéveloppementale comportant des manifestations somatiques (cutanées, cardiaques, cérébrales et rénales) associées avec des troubles du comportement incluant des syndromes autistiques caractéristiques ou partiels (Reich et al. 1997). De la même façon, des mutations hétérozygotes du gène PTEN, une protéine régulatrice en amont de mTOR, ont par exemple été trouvées chez 20% des patients avec un TSA présentant une macrocéphalie importante (Butler et al. 2005). Le syndrome du X fragile, cause majeure de retard mental et TSA, est lié à la perte de fonction de la protéine FMRP (Fragile-X Mental Retardation Protein) régulant la transcription de nombreux gènes dont PTEN, TSC2 et NF1. Chez les souris génétiquement déplétées pour la protéine FMR1 ( $FMR1^{-/-}$ ) modèle de cette maladie, on retrouve également une suractivation de la voie mTOR (Sharma et al. 2010). D'autres formes d'autisme syndromiques ont été associés à des modulations de l'activité de mTOR, comme les syndromes d'Angelman ou de Rett (Magdalon et al. 2017). Par ailleurs, des polymorphismes atteignant le réseau de protéines de mTOR sont retrouvés dans des formes non syndromiques de TSA. Dans leur ensemble, ces observations désignent la dérégulation de la voie mTORC1 comme un mécanisme convergent dans l'étiologie des TSA. Dans ce contexte, le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, en tant que régulateur clef de l'activité de mTORC1, constitue une cible potentiellement impliquée dans la genèse des TSA.

Par ailleurs, des polymorphismes directement sur le gène du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont été mis en évidence dont le plus répandu est la substitution 267C >T. Si la littérature est assez hétérogène sur le sujet, une association entre les polymorphismes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et certaines pathologies psychiatriques ressort nettement. Etant donné l'affinité des drogues antipsychotiques pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, de nombreuses études se sont intéressées à l'association de ses polymorphismes avec la schizophrénie. Globalement, les résultats sont assez controversés et semblent dépendre du type de population (Shinkai et al. 1999; Masellis et al. 2001; Ohmori et al. 2001; Zhang et al. 2003; Kishi et al. 2012). Cependant, certaines études désignent le récepteur 5-HT<sub>6</sub> comme un facteur de prédisposition au développement de la schizophrénie. En 1999, Tsai *et al* montrent une association positive entre l'allèle 267T et la schizophrénie sur une cohorte de 183 patients (S. J. Tsai et al. 1999). Une autre étude sur des patients souffrant d'une psychose induite par la méthamphétamine, dont les symptômes sont similaires à ceux de la schizophrénie de type paranoïde, trouve également une association significative avec certains polymorphismes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (Kishi et al. 2011). Argumentant en faveur d'un lien entre

le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et la psychose, Lane *et al.* 2004 trouvent que le polymorphisme 267C/T influence la réponse aux antipsychotiques chez des patients schizophrènes (Lane et al. 2004)

On trouve globalement peu d'associations entre les polymorphismes du récepteur et les troubles de l'humeur. Une étude montre cependant une surreprésentation de l'allèle 267C dans une population de patients souffrant de bipolarité, un trouble de l'humeur qui présente des symptômes communs avec la schizophrénie, durant les phases de manies (Vogt et al. 2000).

Enfin, une seule étude s'est penchée sur la présence de polymorphismes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les troubles du spectre de l'autisme. De façon intéressante, cette étude met en avant l'association entre deux polymorphismes du récepteur avec les déficits cognitifs dans les TSA (Hervás et al. 2014).

Collectivement, ces études pointent une association entre deux grandes familles de pathologies psychiatriques d'origine neurodéveloppementales : les troubles du spectre de la schizophrénie et de l'autisme.

On peut cependant noter que si l'émergence des symptômes observés en corrélation avec les polymorphismes identifiés du récepteur peuvent être liés à des altérations au cours de développement, il est possible qu'ils soient également le reflet d'un rôle du récepteur dans le comportement et la cognition à l'âge adulte.

# Chapitre III : Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> de la sérotonine : rôles physiologiques et cible thérapeutique

L'enrichissement du récepteur dans le système limbique a rapidement soulevé la question de son implication dans le comportement. Dans les années 1990, l'émergence d'outils pharmacologiques spécifiques a permis d'étudier ses fonctions dans différents paradigmes comportementaux.

## I. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le comportement normal et pathologique

### a. Rôle dans les fonctions cognitives

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est particulièrement exprimé dans des régions connues pour leur implication dans la mémorisation et l'apprentissage (cortex préfrontal, hippocampe), suggérant une implication dans les processus cognitifs.

La première étude à avoir mis en évidence l'implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la cognition est celle de Woolley *et al.* (Woolley et al. 2001). Les auteurs ont injecté en intra-cerebro-ventriculaire (ICV) un oligonucléotide antisens afin d'inhiber l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, puis ils ont testé ses effets sur la mémoire dans le labyrinthe de Morris. Ils ont ainsi démontré que l'invalidation génétique du récepteur induit une augmentation de la rétention, traduisant un effet bénéfique sur la mémoire à long terme. Cet effet est reproduit la même année par Rogers *et al.* avec deux antagonistes, le SB271046 et le SB357134, dans le même paradigme (Rogers et Hagan 2001).

Depuis ces publications princeps, les effets de la modulation pharmacologique du récepteur sur la cognition a fait l'objet de nombreuses études. Les antagonistes du récepteur en particulier montrent des effets pro-cognitifs clairs dans différents paradigmes expérimentaux de mémoire. Ils augmentent le temps de rétention dans des paradigmes d'oubli naturel, ils améliorent les performances dans le test de

la reconnaissance du nouvel objet et semblent également améliorer la mémoire de travail (King, Marsden, et Fone 2008).

En plus de ces études pharmacologiques, Huerta *et al.* ont apporté des arguments en faveur d'un rôle physiologique important du récepteur dans la mémorisation. En effet, ces auteurs ont montré que l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> diminue lors d'une tâche d'apprentissage associatif dans le cortex préfrontal, le striatum et l'hippocampe, et cette diminution est corrélée aux progrès des animaux (Huerta-Rivas et al. 2010). Dans le même sens, l'équipe de John Neumaier a observé que la surexpression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le striatum (par une approche virale) altère l'apprentissage associatif dans une tâche de conditionnement opérant (Mitchell, Sexton, et Neumaier 2007)(Mitchell, Sexton, et Neumaier 2007).

On retrouve des effets des antagonistes dans d'autres domaines de la cognition. Molher *et al.* ont par exemple démontré que le PRX-07034, un autre antagoniste du récepteur, augmente l'alternance spontanée et diminue les persévérances dans un labyrinthe en croix, reflétant un effet potentiel sur l'inflexibilité cognitive (Mohler et al. 2012). De même, d'autres auteurs ont analysé les conséquences sur les capacités attentionnelles de l'administration subchronique du SB399885-T et du SB271046, deux antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> : les animaux traités mettent moins de temps à réapprendre les nouveaux critères lorsque les paramètres de la tâche changent, ce qui semble indiquer encore une fois une meilleure flexibilité cognitive (Hatcher et al. 2005).

#### ○ **La maladie d'Alzheimer**

Le déclin cognitif constitue la première manifestation symptomatique de plusieurs pathologies neurodégénératives. Parmi celles-ci, la maladie d'Alzheimer (MA) est la cause de démence la plus commune chez les personnes âgées. Cette maladie est notamment caractérisée par un déficit de la transmission cholinergique centrale causé par la dégénérescence des noyaux du cerveau antérieur basal. Cette dégénérescence de l'innervation cholinergique est responsable en grande partie des symptômes cognitifs. Ainsi, à l'heure actuelle, les stratégies thérapeutiques tentent de pallier au manque d'acétylcholine par l'administration d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChEs) (tacrine, donepezil, rivastigmine, galantamine). Dans les stades plus avancés de la maladie, la mémantine (antagoniste des récepteurs NMDA) est également prescrite pour contrer l'excitotoxicité neuronale résultant du

dysfonctionnement du système glutamatergique. Ces traitements sont uniquement symptomatiques. Dans certains cas, ils ralentissent le déclin cognitif sans pour autant contrer clairement la progression de la maladie.

Les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, du fait de leurs effets bénéfiques sur les processus mnésiques, se sont révélés être des cibles thérapeutiques potentielles pour lutter contre les troubles de la mémoire associés au vieillissement et à certaines pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer.

Plusieurs modèles murins de la MA ont été développés comme l'administration de scopolamine, un inhibiteur des récepteurs muscariniques par exemple qui repose sur la théorie cholinergique. Ce modèle pharmacologique est très utilisé pour étudier les symptômes cognitifs (Gilles et Ertlé 2000). Dans ce modèle, les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> préviennent les déficits cognitifs. Cet effet est très robuste et a été observé dans de nombreux tests tels que le labyrinthe de Morris ou la reconnaissance du nouvel objet (de Bruin et al. 2016; Da Silva Costa-Aze et al. 2012; Mitchell et Neumaier 2008). Quelques études ont également exploré les effets sur des modèles de primates non humains âgés tels que le singe rhésus ou le marmoset. Dans ces modèles, les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> améliorent la cognition et la discrimination visuo-spatiale. Une autre perspective intéressante du développement des antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> est la découverte de leurs effets synergiques avec les inhibiteurs de l'AchE (Więckowska et al. 2016). Enfin, une étude récente suggère que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> joue un rôle essentiel dans le développement de la maladie d'Alzheimer en régulant la morphologie et la fonction des cils primaires neuronaux (Hu, Wang, et Zhang 2017).

#### ○ **La schizophrénie**

La schizophrénie est une maladie psychiatrique qui apparaît chez le jeune adulte. Parmi les différents symptômes qui la caractérisent figurent les troubles cognitifs, insuffisamment pris en charge par les thérapies médicamenteuses existant à l'heure actuelle. Étant donné l'affinité des antipsychotiques pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, celui-ci a également été étudié dans le contexte de la schizophrénie.

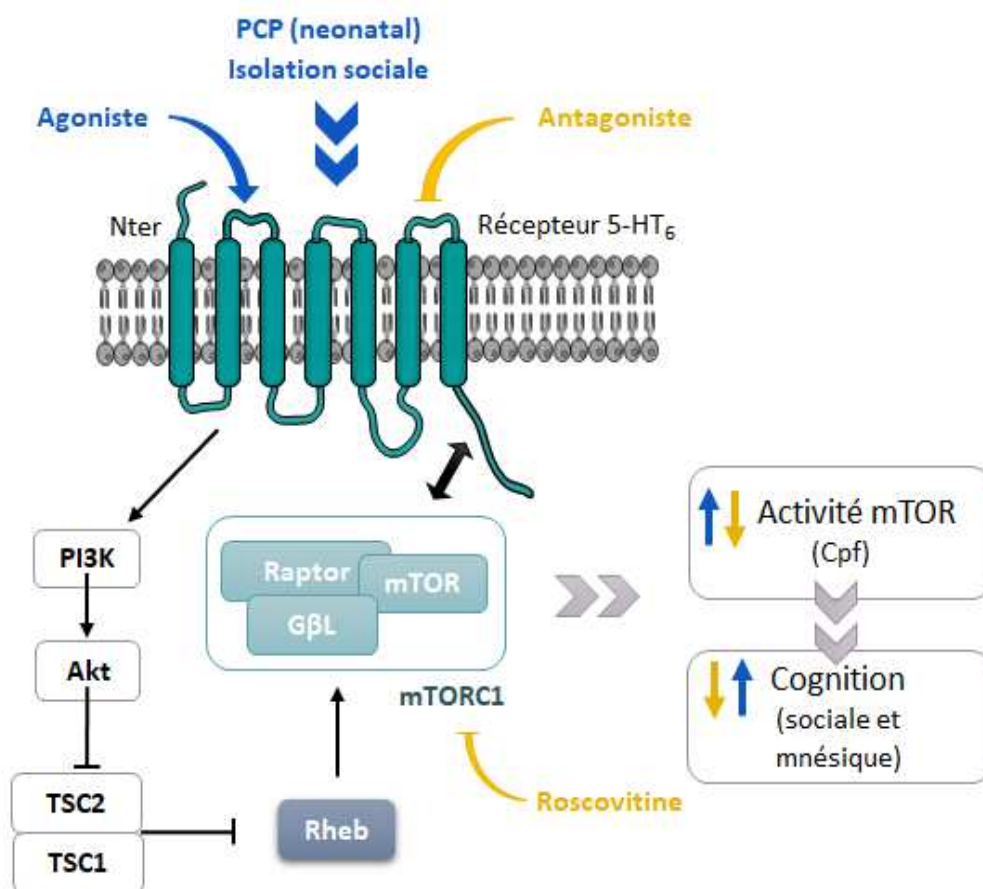
De nombreux modèles ont été proposés pour étudier la schizophrénie chez le rongeur. La plupart d'entre eux modélisent les symptômes négatifs, comme le retrait social et la dépression, ainsi que les troubles cognitifs. Parmi les modèles pharmacologiques proposés, l'injection de MK-801 (antagoniste

des récepteurs NMDA) permet en particulier d'étudier les déficits cognitifs associés à l'état de psychose aiguë. Dans ce modèle, les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> se sont montrés efficaces pour restaurer les déficits mnésiques dans différents tests comme celui de la reconnaissance du nouvel objet (Gravius et al. 2011). Les auteurs ont également testé les effets sur le déficit du réflexe d'inhibition conditionné, un symptôme particulièrement observé dans la schizophrénie. Chez des sujets contrôles, un stimulus sonore crée un réflexe de sursaut : celui-ci est inhibé si le bruit a été annoncé au préalable par un « *prepulse* » alors que, chez des sujets schizophrènes, le *prepulse* n'inhibe pas le réflexe de sursaut. Ce déficit du filtrage sensori-moteur peut être facilement modélisé chez le rongeur, on l'observe notamment dans le modèle MK-801. Les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> corrigent le déficit de « *prepulse inhibition* » observé dans ce modèle, témoignant d'un effet sur un symptôme caractéristique de la schizophrénie (Gravius et al. 2011).

Les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont également été étudiés dans d'autres modèles validés de schizophrénie, comme les rats élevés en isolement qui présentent des altérations cognitives et neurochimiques qui se rapprochent de celles qui sont observées dans la pathologie chez l'Homme (Jones, Watson, et Fone 2011). Dans ce modèle, le PRX-07034, un autre antagoniste du récepteur, normalise l'hyperactivité et corrige les déficits de mémorisation dans le test de reconnaissance du nouvel objet (King, Marsden, et Fone 2008; Fone et Porkess 2008; Marsden, King, et Fone 2011). D'autres études ont testé les effets de la modulation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le modèle d'administration subchronique de phencyclidine (PCP), antagoniste des récepteurs NMDA. Il s'agit d'une molécule psychotrope hallucinogène qui, comme le MK-801, induit des déficits cognitifs similaires à ceux observés dans la schizophrénie. De nombreuses études démontrent que l'administration d'antagonistes du récepteur améliore un large panel de troubles cognitifs observés dans ce modèle, comme les performances attentionnelles, la mémoire à long terme et la flexibilité cognitive (Hatcher et al. 2005; Arnt et al. 2010; de Bruin et al. 2013; Idris et al. 2010). Les antagonistes du récepteur améliorent également la cognition sociale dans deux modèles de schizophrénie. En effet, notre équipe a pu mettre en évidence dans des modèles neurodéveloppementaux de schizophrénie chez le rat, l'injection néonatale de PCP et l'isolement sociale, que les antagonistes du récepteur corrigent les troubles de la reconnaissance sociale de la même façon que la rapamycine. Ces effets procognitifs semblent être associés à une diminution de l'activité de mTOR (figure 14). En plus d'offrir une nouvelle piste thérapeutique pour le traitement des

troubles cognitifs dans la schizophrénie, ces données suggèrent que le recrutement de mTOR par les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, au niveau du cortex préfrontal, pourrait contribuer aux troubles cognitifs observés dans la maladie.

Enfin, les antagonistes du récepteur semblent avoir un effet synergique sur les troubles cognitifs avec certains antipsychotiques. Le SB271046, par exemple, potentialise les effets de la clozapine et de la rispéridone pour réduire les déficits de « prépulse inhibition » (Fijał, Popik, et Nikiforuk 2014).



**Figure 14- l'inhibition pharmacologique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> corrige les déficits cognitifs dans des modèles développementaux de schizophrénie.**

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> interagit avec les protéines du complexe mTORC1 sensible à la rapamycine. Cette interaction, associée à la voie canonique PI3K / Akt / Rheb, contribue à la signalisation mTOR induite par le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, qui sous-tend les déficits cognitifs observés dans deux modèles de schizophrénie, celui du traitement néonatal à la phencyclidine et celui de l'isolement social post-sevrage. Redessiné à partir de Meffre et al 2012.

D'autres études seront nécessaires pour comprendre plus précisément le rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la physiopathologie de la schizophrénie, mais son intérêt comme cible thérapeutique dans la maladie est indéniable et certains de ses antagonistes sont actuellement développés en clinique.

## b. Rôle dans la récompense

La forte densité des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> dans le striatum a soulevé la question de son implication dans les processus de récompense et les comportements dépendants du striatum au sens large. Ces aspects ont été essentiellement étudiés par l'équipe du John Neumaier à Washington.

Les premières évidences des fonctions du récepteur exprimé dans le striatum proviennent d'une étude de 2007 où les auteurs ont surexprimé le récepteur 5-HT<sub>6</sub> spécifiquement dans le **Striatum Dorso-Médian** (SDM) *via* une approche virale. Dans la tâche de conditionnement opérant testée, les animaux apprennent à presser un levier pour obtenir une pastille de sucre à l'apparition d'un signal lumineux. Les animaux contrôles, comme attendu, pressent de plus en plus le levier au fur et à mesure des sessions de conditionnement alors que les animaux, qui surexpriment le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le striatum dorso-médian, n'améliorent pas leurs performances au cours du temps. La consommation de nourriture palatable et les capacités locomotrices sont par ailleurs non affectées par l'expression virale du récepteur comme les performances dans le labyrinthe de Morris. Ces données semblent indiquer un effet délétère de la surexpression du récepteur dans **l'apprentissage associatif** (Mitchell, Sexton, et Neumaier 2007).

Dans une autre étude, l'équipe s'est focalisée sur le rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la réponse comportementale à la cocaïne (Ferguson, Mitchell, et Neumaier 2008). La cocaïne est connue pour ses propriétés récompensantes et psychostimulantes. Elle induit notamment une forte préférence de place. De même que précédemment, les auteurs ont utilisé une approche virale pour augmenter l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> en ciblant cette fois le **noyau accumbens** (Nac). Les animaux qui surexpriment le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le Nac ne montrent pas de préférence de place pour la cocaïne. La surexpression du récepteur pourrait donc interférer avec les propriétés récompensantes de la cocaïne. Les auteurs ont également observé que l'injection d'un antagoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, à l'opposé, facilite l'acquisition d'une préférence de place à la cocaïne. Ces résultats semblent démontrer une implication des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> localisés dans le Nac, dans la modulation de la récompense aux drogues, potentiellement *via* un effet sur l'apprentissage associatif (Ferguson, Mitchell, et Neumaier 2008).



Dans le striatum, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est exprimé aussi bien dans les neurones épineux de taille moyenne exprimant le récepteur D1 (voie directe) que les récepteurs D2 (voie indirecte). Afin de déterminer plus précisément quelle sous-population neuronale est impliquée dans les effets du récepteur, l'équipe de Neumaier a utilisé des constructions virales portant un promoteur enképhaline ou dynorphine pour observer, respectivement, une expression spécifiquement dans les neurones de la voie indirecte ou directe (Brodsky et al. 2016). La surexpression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les neurones du Nac exprimant les récepteurs D2 diminue de près de 50% la quantité de cocaïne auto-administrée dans un protocole de conditionnement opérant utilisant un ratio fixe. En revanche, aucune modification du point de rupture dans un protocole de ratio progressif, où la quantité de « travail » à fournir pour obtenir la même dose augmente au cours du temps, n'est observée. La motivation semble donc conservée. Les auteurs proposent que le récepteur pourrait augmenter la sensibilité des rats aux propriétés récompensantes de la cocaïne. Ceci expliquerait qu'ils s'autoadministrent une plus faible dose que les contrôles pour obtenir une réponse subjective similaire. En accord avec cette hypothèse, ils ont observé une augmentation de la préférence de place pour les doses faibles de cocaïne mais pas pour les doses plus élevées (Brodsky et al. 2016).

Dans une deuxième publication, l'équipe de Neumaier se penche sur les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> exprimés dans les dNEMs et les iNEMs du striatum dorsomédian ou dorsolatéral (DMS et DLS). Ils démontrent que l'augmentation de l'expression de 5-HT<sub>6</sub> dans les iMSN dans le striatum dorsomédian ralentit significativement l'apprentissage d'une tâche de conditionnement opérant (Eskenazi et Neumaier 2011a).

Collectivement, ces données semblent indiquer un rôle important du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, exprimé dans le striatum dorsal et ventral, dans la modulation fine de l'apprentissage associatif et de la récompense. Notons cependant que ces études induisent une surexpression du récepteur, on ne peut pas exclure que le récepteur surexprimé ne se comporte pas exactement de la même façon que le récepteur endogène. Ces résultats sont donc à considérer avec précaution, il reste beaucoup à faire pour élucider la fonction exacte du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la récompense en condition physiologique.

### c. Rôle dans le comportement social

Une seule étude s'est penchée sur les conséquences de la modulation pharmacologique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur l'interaction sociale chez le rongeur. Dans cet article, les auteurs ont caractérisé les effets d'un nouvel antagoniste du récepteur sur la cognition et le comportement social dans différents modèles. Dans un modèle d'autisme où les souris sont issues de mères traitées à l'acide valproïque, les auteurs ont démontré que l'injection subchronique d'un antagoniste du récepteur rétablit le temps passé en contact social (de Bruin et al. 2016). Ces travaux préliminaires ouvrent la voie à l'étude du rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le comportement social et les troubles du spectre de l'autisme.

### d. Rôle dans régulation de l'humeur

La sérotonine étant bien connue pour son implication dans les troubles de l'humeur, la question de l'implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> s'est rapidement posée. Les antagonistes et les agonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont été largement étudiés dans le contexte de l'anxiété et la dépression.

#### ○ **Dépression et anxiété**

Dans le test de la nage forcée, les antagonistes diminuent l'immobilité des animaux et augmentent le temps de nage, indiquant un effet « *Antidepressive-like* » aussi bien chez des animaux contrôles que dans des modèles de dépression (Hirano et al. 2009; Wesołowska 2010, 2007; Wesołowska et Nikiforuk 2007). Wesołowska *et al.* ont démontré que l'injection de SB258585 directement dans l'hippocampe produit le même effet dans le test de la nage forcée, indiquant l'importance de cette structure dans les effets observés (Wesołowska 2007). De plus, la même équipe a démontré que ces effets sont indépendants de l'innervation sérotoninergique car la lésion du système sérotoninergique n'a aucun impact (Wesołowska 2007; Wesołowska et Nikiforuk 2007).

Par ailleurs, Suárez-Santiago et *al.* ont étudié les effets de la modulation pharmacologique du récepteur dans un modèle de dépression majeure induit par l'injection subchronique de kétamine. Dans ce modèle, un traitement aigu avec un agoniste ou un antagoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub> induit le même effet antidépresseur dans le test de la nage forcée (Suárez-Santiago et al. 2017).

De nombreuses autres équipes ont étudié les agonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et des effets « *antidepressive-like* » similaires à ceux induits par la fluoxétine ont été mis en évidence dans différents paradigmes de dépression (Carr, Schechter, et Lucki 2011; Wesołowska 2010; Jastrzębska-Więsek et al.

2015; Nikiforuk, Kos, et Wesołowska 2011; Svenningsson et al. 2007). De plus, l'équipe de Paul Geengard a démontré que la co administration d'un antagoniste du récepteur avec la fluoxétine neutralise les effets antidépresseurs de cette dernière (Svenningsson et al. 2007). L'activation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> semble donc indispensable aux effets antidépresseurs de la fluoxétine.

- **Stress post-traumatique**

Les effets des antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont également été étudiés dans un modèle murin de conditionnement de peur provoqué par l'administration de chocs électriques dans un environnement donné. Ce protocole induit une peur contextuelle qui se traduit par l'immobilisation de l'animal (« *freezing* »), lorsqu'il est placé dans l'environnement conditionné, et une augmentation généralisée de l'anxiété. Il s'agit d'un modèle très utilisé dans l'étude du stress post-traumatique. Dans ce modèle, l'injection du SB399885 (antagoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub>) décroît l'anxiété mesurée dans le labyrinthe en croix surélevé et diminue le *freezing* des animaux placés dans le contexte associé à la peur (Abraham et al. 2015). Ces effets anxiolytiques ouvrent la porte à de nouvelles pistes thérapeutiques dans le contexte du stress post traumatique.

## e. Rôle dans la prise alimentaire

Historiquement, l'hypothèse que l'effet inhibiteur de la fenfluramine sur l'appétit est lié à la sérotonine a stimulé l'intérêt et la recherche sur le rôle de ce neurotransmetteur dans la satiété (Voigt et Fink 2015). Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est exprimé dans des régions du SNC qui jouent un rôle dans le contrôle de l'appétit, comme l'hypothalamus. De fait, il semblerait que le récepteur soit impliqué plus dans la modulation de la satiété, comme l'ont démontré différentes études portant sur l'obésité (D. Heal, Gosden, et Smith 2011).

- **Obésité**

La première indication que les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> peuvent jouer un rôle dans la régulation de la prise alimentaire provient d'études réalisées par Kevin Fone et ses collègues. Cette équipe a montré que l'administration de siRNA en ICV ou l'injection d'antagonistes du récepteur réduisent la prise alimentaire (Woolley et al. 2001). De nombreux ligands du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont depuis été étudiés pour leur capacité à promouvoir la satiété aussi bien chez les animaux naïfs que dans des modèles d'obésité. Les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> induisent une réduction dose dépendante de la prise alimentaire. Cet

effet hypophagique est proche de celui de la subitramine, molécule de référence pour la réduction de la prise alimentaire dans le cadre de l'obésité (D. Heal, Gosden, et Smith 2011).

D'autres auteurs comme Frisas et al. ont montré que des agonistes sélectifs du récepteur induisent également une réduction de la prise alimentaire assortie d'une diminution de la masse grasseuse de 31,7% dans un modèle d'obésité chez le rat (Fisas et al. 2006; D. J. Heal et al. 2008; Kotańska et al. 2018). Les contrôles permettent de déterminer que cet effet n'est pas lié à un désordre digestif mais passerait bien par une augmentation de la satiété (D. J. Heal et al. 2008; Fisas et al. 2006; Kotańska et al. 2018). Globalement, ces études permettent de conclure que les ligands des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> réduisent la prise alimentaire.

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats suggère que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est impliqué dans la modulation des processus cognitifs et dans la régulation de l'humeur (troubles affectifs, dépression, schizophrénie); ils semblent également être liés à de nombreux comportements motivés (comportement alimentaire, comportement addictif, etc.). Les principales applications thérapeutiques potentielles des ligands du récepteur sont le traitement de l'obésité et des troubles métaboliques associés, les troubles cognitifs, en particulier de l'apprentissage et de la mémoire dans les démences comme la MA.

## II. Rôle dans la modulation de la neurotransmission

Différentes études ont permis d'identifier les effets du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur différents systèmes de neurotransmission qui pourraient à l'origine de son implication dans différents désordres comportementaux décrits précédemment.

### a. Transmission cholinergique

Les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> se sont montrés particulièrement efficaces pour traiter les déficits cognitifs induits par l'administration d'agents anticholinergiques (exemple du modèle scopolamine) (Riemer et al. 2003). Ce constat a été le point de départ de l'étude du lien entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et la transmission cholinergique.

Wooley *et al.* ont tout d'abord démontré que l'injection ICV d'oligonucléotides antisens du récepteur induit des changements comportementaux qui peuvent être bloqués par un antagoniste des

récepteurs muscariniques, suggérant un rôle du récepteur dans la modulation de la fonction cholinergique (Woolley et al. 2001). De même, les effets pro-cognitifs des antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sont abolis par les antagonistes muscariniques. Corroborant ces données comportementales, des études de microdialyse ont démontré que l'inhibition du récepteur provoque une augmentation significative des niveaux d'acétylcholine dans différentes structures cérébrales. Les effets pro-mnésiques de l'inhibition du récepteur pourraient donc être le reflet d'une augmentation de la transmission cholinergique. De plus, l'inhibition du récepteur potentialise la capacité du donepezil (inhibiteur de l'acétylcholinestérase) à élever les taux extracellulaires d'acétylcholine. Ces effets sur la transmission cholinergique pourraient être à l'origine de l'amélioration des fonctions cognitives observée dans les modèles animaux de la MA et chez les patients co-traités avec le donepezil (Herrik et al. 2016).

Cependant, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est peu exprimé dans les neurones cholinergiques, suggérant des effets indirects.

## b. Transmissions glutamatergique et GABAergique

Des études de microdialyse ont révélé qu'en plus de son rôle fonctionnel dans le système cholinergique, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> peut également moduler d'autres systèmes de neurotransmission. Ces études ont ainsi démontré que l'administration d'un agoniste du récepteur bloque la libération de glutamate, alors qu'un antagoniste augmente les niveaux extracellulaires de glutamate dans le cortex et l'hippocampe (Dawson, Nguyen, et Li 2000; H. Y. Wang et al. 2016; Tassone et al. 2011). Ces effets sont abolis par l'infusion de tetrodotoxine mais ne sont pas affectés par la modulation du système cholinergique. L'inhibition du récepteur 5-HT<sub>6</sub> augmente donc la transmission excitatrice et cet effet semble être en amont de l'élévation du taux d'acétylcholine.

Par ailleurs, les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> sont connus pour être exprimés dans les interneurons GABAergiques. Ainsi, une étude de microdialyse a montré que l'administration d'un agoniste du récepteur induit la libération de GABA dans le cortex chez le rat. Il est donc possible que l'inhibition du récepteur par ses antagonistes induise une levée du frein GABAergique à l'origine de l'augmentation des transmissions glutamatergique et cholinergique.

### c. Transmission monoaminergique

Enfin, certaines études démontrent une implication du récepteur dans la transmission des monoamines. Lacroix et *al.* ont démontré que le SB271046, (antagoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub>) produit une augmentation significative des niveaux extracellulaires de dopamine et de noradrénaline, sans effet sur la sérotonine (Lacroix et al. 2004). Cette observation a été reproduite récemment par Mørk *et al.* qui ont observé une augmentation des niveaux extracellulaires de dopamine dans le cortex préfrontal médian suite à l'administration d'idalopirdine, un antagoniste du récepteur qui fait l'objet d'études cliniques pour différentes applications (Mørk et al. 2017).

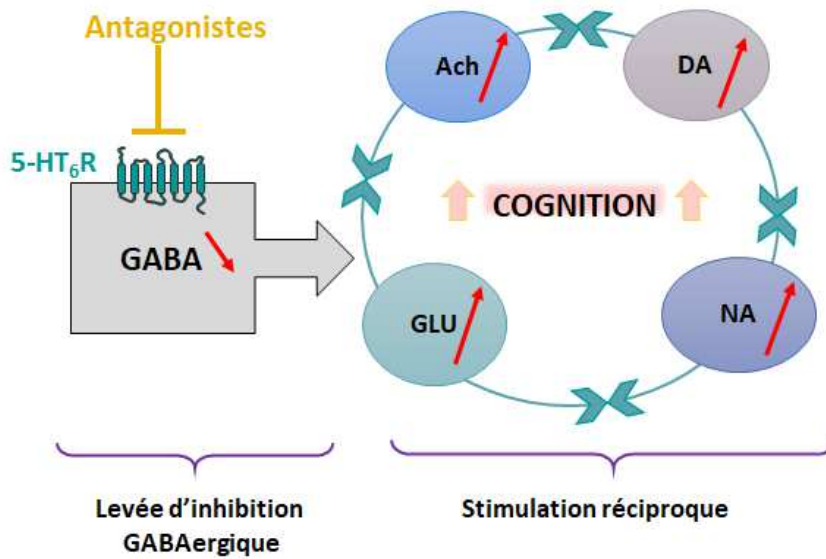
Par ailleurs, des effets synergiques entre certains antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et d'autres drogues neuromodulatrices ont été observés. Ainsi, les antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> potentialisent l'élévation de dopamine dans le striatum induite par les amphétamines (Dawson, Nguyen, et Li 2000). Le même type de potentialisation est observé avec certains antipsychotiques, comme l'haloperidol et la rispéridone (Z. Li et al. 2007). Ces résultats suggèrent que le blocage combiné des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et D2 contribue de façon synergique à la libération de dopamine induit par l'halopéridol et la rispéridone dans le mPFC ou l'hippocampe. Ces données démontrent à nouveau le potentiel thérapeutique des antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, pour améliorer la cognition dans la schizophrénie (figure 15).

### III. Le paradoxe des ligands du récepteur 5-HT<sub>6</sub>

Comme mentionné précédemment, certains agonistes et antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> présentent des effets similaires la prise alimentaire et la régulation de l'humeur. Ce paradoxe a suscité un intérêt considérable et plusieurs hypothèses ont été proposées à cet égard.

Tout d'abord, l'action des composés considérés comme ligands de référence du récepteur 5-HT<sub>6</sub> pourrait être due à l'activation d'autres cibles. En effet, certains de ces composés ont également démontré une affinité modérée pour d'autres cibles, récepteurs de la sérotonine ou autres (Karila et al. 2015).

Par ailleurs, Heal et *al.* proposent que la stimulation par des agonistes pourrait induire son internalisation et sa dégradation menant *in fine* à une inhibition de sa signalisation (D. J. Heal et al. 2008).



**Figure 15- Hypothèse mécanistique des effets pro cognitifs de l'inhibition pharmacologique du récepteur 5-HT<sub>6</sub>**  
 Plusieurs études ont démontré que l'inhibition pharmacologique des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> de la sérotonine augmente les niveaux extracellulaires de glutamate (GLU), noradrénaline (NA), dopamine (DA) et acétylcholine (Ach). Cet effet en particulier sur les niveaux d'acétylcholine semble sous-tendre les effets pro-cognitifs des antagonistes du récepteur sur la mémoire. Étant donné la diminution de libération de GABA également observée, on peut supposer que le blocage du récepteur induit une levée de l'inhibition GABAergique tonique sur les systèmes de neurotransmission précédemment cités. Ainsi l'augmentation de la libération de glutamate pourrait participer dans un second temps à la stimulation de la libération d'Ach, DA et NA et réciproquement. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> possède donc une position cruciale pour moduler à la fois les systèmes inhibiteurs et excitateurs. Les flèches rouges représentent la synthèse des études de microdialyse, l'ensemble du schéma illustre une hypothèse mécanistique.

Ce processus de désensibilisation pourrait expliquer les effets similaires des agonistes et des antagonistes dans certains paradigmes.

Enfin, il est important de noter que les agonistes et antagonistes sont classiquement définis en regard de leurs effets sur la voie Gs. Leur impact sur les autres voies de signalisation associées au récepteur ne sont pas toujours connus. Une partie des effets contradictoires des ligands du récepteur pourrait donc venir de la mobilisation de voies de signalisation différentes et compétitives. De plus, la plupart des molécules utilisées en tant qu'agonistes sont également des agonistes inverses du récepteur (Deraredj Nadim et al. 2016a). On peut donc supposer qu'une partie des effets bénéfiques de ces molécules passe par l'inhibition de l'activité constitutive de certaines voies de signalisation.

Pour conclure, l'élaboration d'outils pharmacologiques plus spécifiques est nécessaire pour une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à la modulation du récepteur 5-HT<sub>6</sub>. Les ligands biaisés notamment, dont le développement est en plein essor à l'heure actuelle permettront d'identifier

avec précision les voies de signalisations associées aux effets physiologiques de la modulation du récepteur, aboutissant à la création de nouveaux composés thérapeutiques aux effets secondaires minimisés (Karila et al. 2015).



# Chapitre IV : Sérotonine et Troubles du Spectre Autistique

## I. Généralités sur Les troubles du spectre de l'autisme

### a. Symptômes, signes cliniques et biomarqueurs

#### *i. Diagnostic comportemental*

Les TSA se composent d'un panel de troubles psychiatriques d'origine neurodéveloppementale. Leur prévalence ne cesse d'augmenter. Elle est évaluée à un cas sur 100 dans la plupart des pays (Baird et al., 2006).

Le diagnostic de TSA est basé sur le comportement et requiert la présence de symptômes primaires comprenant :

- **Des déficits persistants dans la communication et les interactions sociales**
- **Un répertoire de comportements, d'intérêts ou d'activités, restreints et répétitifs (inclut les stéréotypies motrices et l'inflexibilité cognitive).**

Ces symptômes apparaissent au cours des trois premières années de vie et causent des altérations importantes du fonctionnement normal de l'individu et de sa scolarisation. Des comorbidités sont fréquemment décrites, comme l'anxiété, des déficits cognitifs, une susceptibilité aux crises d'épilepsie, des troubles de la coordination motrice ainsi que de l'agressivité.

#### *ii. TSA et biomarqueurs*

Les TSA rassemblent une population de patients présentant des symptômes comportementaux similaires mais d'étiologies diverses. De ce fait, on retrouve une variabilité interindividuelle très forte dans l'expression de la maladie. Cette hétérogénéité rend l'identification d'un biomarqueur commun particulièrement difficile. On retrouve néanmoins certaines particularités **neuroanatomiques et**

**neurochimiques** récurrentes. La caractéristique anatomique la mieux documentée est l'augmentation du volume des hémisphères corticaux et de certaines régions sous-corticales comme l'amygdale et l'hippocampe. Cette macrocéphalie est accompagnée d'une augmentation de la circonférence crânienne (Courchesne, 2002; Hazlett et al., 2005). Ce symptôme, retrouvé chez le jeune enfant, persiste jusqu'à l'âge de 5-6 ans, stade auquel le volume cérébral rejoint la trajectoire de développement typique (Ecker 2017). En lien avec ces études d'imagerie, Courchene *et al.* ont observé une augmentation de plus de 67% du nombre de neurones dans le cortex préfrontal d'enfants atteints de TSA (Courchesne et al. 2011). Les analyses post-mortem ont également permis de mettre en évidence une augmentation de la densité des épines dendritiques dans les lobes frontaux, pariétaux et temporaux (Hutsler et Zhang 2010; Forrest, Parnell, et Penzes 2018).

En lien avec ces anomalies neuroanatomiques, les travaux d'Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle (IRMf) ont mis en évidence des altérations de la connectivité cérébrale (Ecker 2017). En particulier, l'étude du réseau de repos fait ressortir une diminution de la connectivité antéro-postérieure associée à une hyperconnectivité des circuits cortico-striataux (D. Li, Karnath, et Xu 2017).

Il est nécessaire de préciser que si ces anomalies neuroanatomiques et fonctionnelles sont retrouvées dans la majorité des cas d'autisme, il existe des sous-populations présentant des caractéristiques opposées. Les enfants avec un TSA associé à un lourd retard mental manifestent le plus souvent une diminution du volume cérébral. Ainsi, si ces observations sont intéressantes pour avancer vers une meilleure compréhension de la physiopathologie des TSA, elles ne peuvent pas servir en tant que marqueur diagnostique.

De nombreuses études ont essayé d'identifier des biomarqueurs sur la base d'échantillons biologiques comme le sang et la salive. Si ces études se heurtent encore une fois au facteur limitant de l'hétérogénéité de la population, un marqueur a cependant pu être identifié de façon récurrente. En effet, on retrouve une **augmentation des taux sanguins de sérotonine dans 25% à 47%** des cas en fonction des publications (Muller, Anacker, et Veenstra-VanderWeele 2016; Kuperman et al. 1985; Abramson et al. 1989; Cook et al. 1990; Leventhal et al. 1990; Leboyer et al. 1999). Une telle convergence malgré la diversité des TSA est frappante et pose la question de l'implication de la sérotonine dans la physiopathologie des TSA. Enfin, certains polymorphismes touchant en particulier des gènes de la

plasticité et du développement neuronal, ainsi que des gènes des systèmes glutamatergique et ocytocinergique sont fréquemment observés.

À ce jour, aucun biomarqueur diagnostique n'a été mis en évidence. Les études de protéomique et de transcriptomique, réalisées sur des échantillons de sang, d'urine, de salive et même de liquide céphalorachidien, sont en plein essor et constituent un véritable espoir pour l'identification d'un marqueur des TSA.

## **b. Thérapies existantes**

Le traitement des TSA constitue un enjeu humain, sociétal et économique majeur. À l'heure actuelle, l'éventail thérapeutique est très restreint et aucun des traitements envisagés n'a montré d'efficacité curative. Les thérapies existantes visent donc les symptômes, dans le but d'améliorer l'apprentissage et le développement afin d'optimiser les possibilités d'insertion sociale.

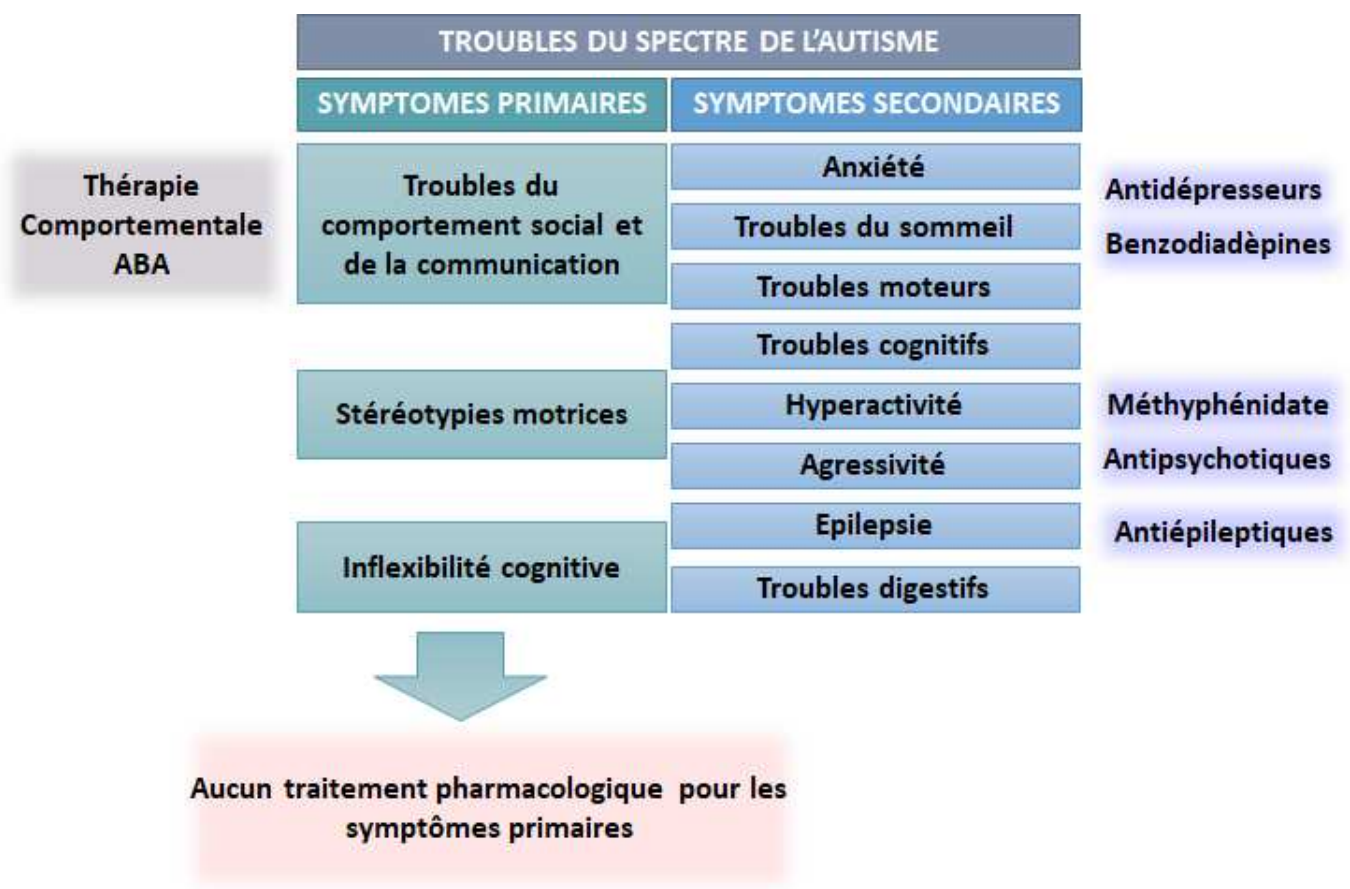
### ***i. Thérapies comportementales***

Plusieurs thérapies comportementales ont été développées : psychothérapies, thérapies cognitives, interventions sensorimotrices, ou orthophoniques. Le seul traitement à avoir démontré une efficacité tangible sur les symptômes primaires, validé par plusieurs études, est l'intervention comportementale précoce, dite méthode ABA "Applied Behavior Analysis" (Reichow et al. 2012; Linstead et al. 2017)(Roberts 2011). Cette thérapie se base sur les principes fondamentaux de l'apprentissage opérant et de la motivation, afin de renforcer les comportements désirés et éteindre les comportements déviants. On peut dire qu'il s'agit du traitement de référence de l'autisme à l'heure actuelle.

### ***ii. Traitements pharmacologiques***

Il existe très peu de traitements pour l'autisme, et aucun d'entre eux n'a d'efficacité sur les symptômes primaires (déficits de communication, comportements sociaux, intérêts restreints). Les traitements pharmacologiques existants visent donc les symptômes comorbides. Parmi les plus prescrits, figurent les antipsychotiques (risperidone, aripiprazole) qui ciblent l'agressivité et l'automutilation, les anxiolytiques (benzodiazépines) pour soigner l'anxiété et les troubles du sommeil, les psychostimulants (méthylphénidate) pour l'hyperactivité parfois associée, ainsi que des antiépileptiques et des

antidépresseurs (soin des phobies et des TOCs). Ces traitements ne sont pas spécifiques à l'autisme et engendrent de nombreux symptômes secondaires parfois très invalidants (gain de poids, sédation, nausées, diabète, dyskinésies). Des pistes alternatives sont actuellement exploitées en recherche clinique (ocytocine, bumétanide) et préclinique (modulateurs allostériques des récepteurs mGlu4 et 5) mais pour le moment la pharmacologie n'offre pas de solution pour le traitement des déficits sociaux caractéristiques de l'autisme (Masi et al. 2017). La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques représente donc un enjeu majeur pour les années à venir.



**Figure 16- Diagnostic de troubles du spectre de l'autisme et principaux traitements.**

Le diagnostic des TSA est à l'heure actuelle exclusivement basé sur le comportement, et requiert la présence de symptômes primaires, souvent accompagnés de symptômes secondaires. Le seul traitement efficace pour améliorer les symptômes primaires est une thérapie comportementale, basée sur l'apprentissage opérant, l'ABA (Applied Behavioral Analysis). Il est donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour une meilleure prise en charge des patients avec TSA.

## c. Théories étiologiques

Aucune étiologie commune aux TSA n'a à ce jour été clairement identifiée. L'hypothèse la plus probable est celle de la concordance entre prédisposition génétique et des facteurs environnementaux déclenchant. Le fait que des causes très hétérogènes convergent vers l'expression d'un même spectre de trouble indique le recrutement d'un mécanisme pathologique commun. Différentes théories explicatives existent à différents niveaux, aussi bien psychanalytique, que cognitif ou développemental.

### *i. Facteurs génétiques*

Dans une minorité de cas, la présence d'altérations chromosomiques (duplications 15q11–q13, 2q37, 22q11.2 et délétions 22q13.3) ou de mutations de gènes (fragile X, sclérose tubéreuse, neurofibromatose, syndrome de Rett) permet de définir une **origine génétique** claire (Betancur 2011). Si ces exemples d'autisme syndromique ne représentent que 10% des sujets, la récurrence de l'apparition de ce trouble au sein de certaines familles indique néanmoins une place importante de la génétique dans l'étiologie de la pathologie. Des études d'association pangénomiques réalisées sur des cohortes de patients ont permis d'identifier des gènes dont les polymorphismes sont fréquemment associés aux TSA. Plusieurs familles de gènes aux fonctions bien précises ont ainsi été identifiées. Dans un premier groupe, on retrouve des gènes impliqués dans le contrôle de la **prolifération cellulaire**. En particulier des gènes suppresseurs de tumeurs qui jouent un rôle crucial dans la modulation de la prolifération des progéniteurs neuronaux, comme les membres de la voie mTOR (TSC1/2, PTEN, NF1). Un deuxième cluster contient des gènes impliqués dans le contrôle de la **transcription et de la traduction** comme MECP2 et FMR1. Finalement, un grand nombre de gènes impliqués dans le **développement du système nerveux** et la **transmission synaptique** sont retrouvés comme, par exemple, NLGN3/4, SHANK3, NRXN1 et PTEN.

### *ii. Facteurs environnementaux*

De nombreux facteurs environnementaux ont été liés au risque de développement des TSA. Tout d'abord, de différents produits chimiques exogènes présents dans l'air, l'eau et le sol ou les produits ménagers ont été identifiés. Parmi les plus souvent mis en cause par les études épidémiologiques, on peut citer les organophosphates, une classe de pesticides, ainsi que les phtalates présents dans les produits plastiques et les polychlorobiphényles, composants chimiques polychlorés, utilisés comme

isolants électriques (Hertz-Picciotto, 2018 ; Schmidt RJ, 2014). La pollution de l'air a également été étudiée comme facteur favorisant le développement des TSA. Cette dernière est cependant très discutée, car souvent corrélée au statut socio-économique et fait donc probablement partie d'un ensemble plus large d'éléments qui confèrent dans leur ensemble une augmentation du risque (Hertz-Picciotto, 2018 ; Schmidt RJ, 2014).

D'autres facteurs de risques majeurs, bien identifiés à l'heure actuelle, sont la prise de certains médicaments pendant la grossesse. L'acide valproïque (traitement antiépileptique) a été mis en cause dans le déclenchement de l'autisme. Le thalidomide, médicament prescrit dans les années 1950 aux femmes enceintes comme anti-nauséeux, induit des malformations congénitales associées à un fort risque de développer un TSA. Comme pour l'acide valproïque, la prescription de thalidomide est maintenant strictement interdite aux femmes enceintes. Depuis les cinq dernières années, un nombre croissant d'études mettent en relation la prise **d'inhibiteurs de la recapture de la sérotonine** et une augmentation significative du risque de développer un TSA( Lyall K et al, 2014). En outre, la santé et la physiologie maternelle durant la grossesse sont des éléments particulièrement importants. La nutrition pendant la grossesse semble jouer un rôle : la consommation d'acide folique et d'acides gras polyinsaturés ou de vitamines a par exemple été associée à une réduction du risque de développer un TSA. Enfin, certaines infections virales maternelles sont connues pour augmenter le risque d'apparition des TSA. Plus précisément, la production d'anticorps maternels serait en cause. Plusieurs éléments convergent vers une théorie de la neuro-inflammation, suggérant un rôle de la du système immunitaire et de la glie durant le développement des TSA (Hertz-Picciotto, 2018 ; Schmidt RJ, 2014).

L'ensemble des facteurs précédemment cités a un point commun, ils interfèrent avec le développement du système nerveux central. Ainsi, tous les mécanismes prédisposant au déclenchement des TSA convergent clairement vers la théorie neurodéveloppementale.

### ***iii. Théorie neuro-développementale***

Comme je l'ai discuté précédemment dans le chapitre II, les altérations précoces du développement du système nerveux central mènent à des anomalies de la connectivité neuronale et constituent un facteur étiologique majeur de différents troubles psychiatriques. Certaines études démontrent également que la période d'exposition à ces facteurs est déterminante.

Chacune des grandes étapes du développement du cerveau a été associée aux TSA. D'une part, la macrocéphalie observée chez un grand nombre de patients et l'augmentation du nombre de neurones dans le cortex préfrontal suggère **une prolifération excessive** des progéniteurs neuronaux ou une diminution de l'apoptose (Kaushik et Zarbalis 2016; Courchesne et al. 2011, 2007). La **migration neuronale** semble également être altérée : on retrouve des positionnements neuronaux anormaux notamment au niveau cortical (Reiner et al. 2016). De plus, une méta-analyse récemment publiée a mis en évidence une contribution de mutations du gène de la **reeline**, une protéine qui joue un rôle crucial dans la migration et le positionnement correct des neurones corticaux (Z. Wang et al. 2014). On observe par ailleurs des anomalies du nombre et de la morphologie **des épines dendritiques** dans les TSA. Plusieurs hypothèses ont été avancées. Frith a proposé un défaut de l'élimination synaptique durant les phases embryonnaires (Frith 2003, 2004). Thomas et al. ont proposé que ce défaut d'élagage précoce s'accompagne d'un excès d'élagage plus tardif durant l'enfance (M. S. C. Thomas et al. 2016).

Ces anomalies du développement cérébral conduisent à une altération des réseaux dont la fonctionnalité est indispensable à l'expression d'un répertoire comportemental adapté. Plusieurs théories cognitives ou comportementales ont été proposées pour expliquer les déficits comportementaux observés chez les sujets avec TSA.

#### ***iv. Théorie de l'esprit***

La théorie de l'esprit est un modèle très étudié pour comprendre les déficits cognitifs dans l'autisme. Elle désigne la capacité à comprendre les états mentaux subjectifs d'autrui, et les mécanismes cognitifs qui permettent la reconnaissance des émotions et la cognition sociale. L'enfant acquiert cette capacité au cours de son développement jusqu'à 6 ans. Des altérations de la connectivité corticale pourraient donc directement affecter l'apprentissage social nécessaire au développement d'un comportement social adapté.

#### ***v. Théorie du déficit de récompense sociale***

Selon cette théorie, les altérations neurodéveloppementales convergeraient vers une atteinte du système de récompense sociale sous-tendant une perte de saillance de stimuli sociaux (Chevallier et al. 2012). La stimulation sociale étant un élément très important pour le développement et l'expression

d'un répertoire comportemental adéquat, l'altération de ce système pourrait à elle seule être à l'origine d'une cascade de déficits expliquant le phénotype dans sa globalité.

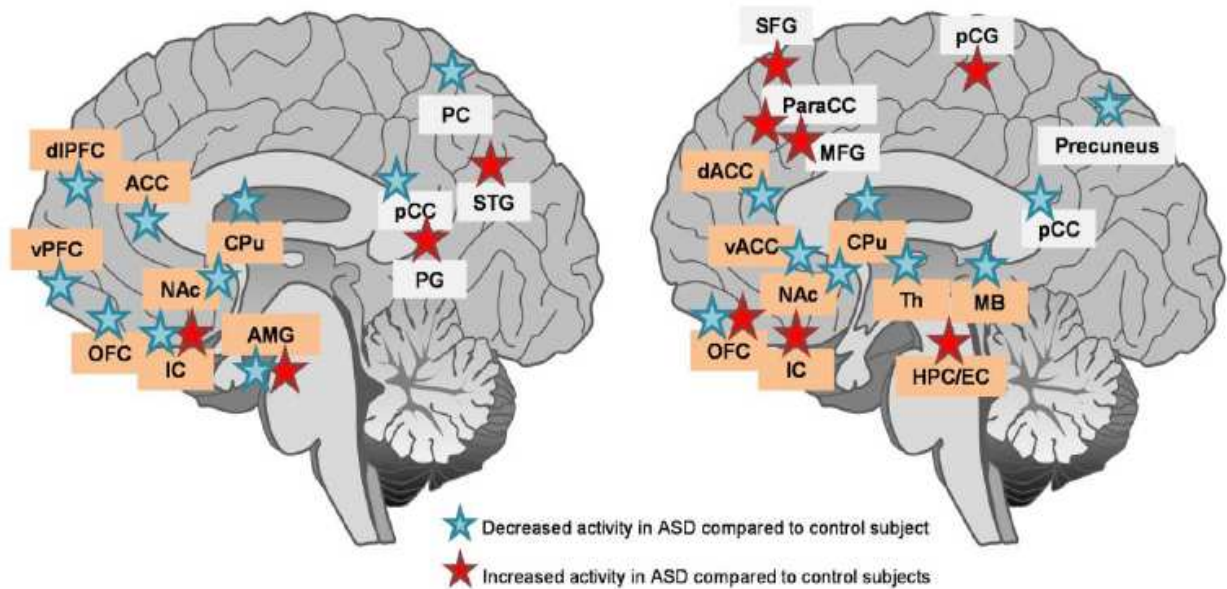
Le système de récompense sociale fait partie du système global de récompense qui est à l'origine des effets renforçant et récompensant de stimuli naturels (nourriture, interactions sociales) ou artificiels (drogues d'abus). Il est composé de différents noyaux du système méso-cortico-limbique incluant le noyau accumbens, l'aire tegmentale ventrale, l'hypothalamus latéral, le septum et le cortex préfrontal (Loeth, Ellingsen, et Leknes 2014). La dopamine est le neurotransmetteur principalement impliqué dans les effets renforçant de ce système, alors que les récepteurs Mu des opioïdes contribuent à la qualité hédonique du stimulus (Le Merrer et al. 2009). La particularité de la récompense sociale figure dans sa modulation spécifique par l'ocytocine et la **sérotonine** et les récepteurs Mu des opioïdes (Pellissier et al. 2017).

En faveur d'une altération de ce système dans les TSA, plusieurs études d'imagerie fonctionnelle ont montré chez les sujets autistes un défaut d'activation du circuit méso-cortico-limbique par rapport aux groupes témoins dans une tâche de go/no go récompensée par des stimuli sociaux (Kohls et al. 2013; Scott-Van Zeeland et al. 2010). Par ailleurs, lors de la visualisation seule de stimuli sociaux, un déficit d'activation très marqué est observé dans ces mêmes zones. De même, très précocement, quand des enfants au développement typique préféreront diriger leur attention visuelle sur des stimuli sociaux présents dans une image, les enfants souffrant d'autisme ne présentent pas de préférence, leur regard s'attachant autant, voire plus, aux objets non sociaux. Ce dernier point démontre une altération précoce de la saillance des stimuli sociaux.



## Social reward

## Monetary reward



**Figure 17- Déficit d'activation du système de récompense en regard de stimuli sociaux chez les patients avec TSA.**

Les schémas représentent les zones cérébrales activées de manière différentielle chez les patients atteints de TSA par rapport aux contrôles lors de l'anticipation et / ou la réception de récompenses sociales (gauche) ou monétaire (droite). La latéralisation des réponses cérébrales (hémisphère droit ou gauche) n'a pas été prise en compte pour simplifier la représentation. La comparaison des modèles d'activation cérébrale pour la récompense sociale et monétaire révèle une hypoactivation du circuit fronto-striatal comprenant des régions clés pour la récompense telles que le cortex cingulaire antérieur (ACC), le noyau accumbens (Nac) et le caudé putamen (CPu) chez les patients atteints de TSA. Les régions du cerveau appartenant aux circuits de récompense sont surlignées en orange. AMG, amygdale; d ACC = cingulatécortex antérieur dorsal; d IPFC = cortex préfrontal dorsolatéral x; HPC / EC = hippocampe / cortex enthorinal; IC = cortex insulaire; MB = mésencéphale; MFG = frontgyrus médial; OFC = cortex orbitofrontal; paraCC = cortex paracigulaire ; PC = cortex pariétal; pCC = cortex cingulaire postérieur; PCG = gyus précentral ; PG = gyus parahippocampique; SFG = gyus frontal supérieur; STG = gyus temporal supérieur; vPFC = cortex pré frontal ventral. *D'après Pellisier et al 2017 Br J Pharmaco.*

## d. Modélisation des TSA

De nombreux modèles animaux ont été mis au point pour l'étude des différentes facettes des TSA. Ils présentent l'avantage de permettre des tests contrôlés de facteurs pathogènes spécifiques sur la pathologie et de les corrélés avec les résultats comportementaux. Ainsi, les modèles animaux sont indispensables pour avancer sur la compréhension de la physiopathologie des TSA et la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Un bon modèle doit répondre à différents critères. Tout d'abord, la validité d'aspect correspond à la similarité entre les signes et symptômes exprimés dans la maladie et retrouvés dans le modèle. Ensuite, la validité prédictive nécessite l'expression d'une réponse similaire aux traitements utilisés en clinique. Enfin, la validité de construction ou validité théorique représente le degré de similarité dans les mécanismes qui sous-tendent la maladie dans le modèle et chez l'Homme. Dans les TSA, les validités théoriques et prédictives sont très difficiles à vérifier, étant donné qu'à l'exception des cas d'autisme syndromique, aucun mécanisme physiopathologique commun n'a été clairement identifié, et qu'aucun traitement n'améliore les symptômes primaires. La plupart des modèles animaux est donc basé sur l'exposition à des facteurs de risque connus, comme le modèle valproate (où les mères injectées à l'acide valproïque durant la gestation pour déclencher des troubles du comportement social chez la descendance) ou sur la mutation de gènes associés à la maladie, comme les souris *Fmr1*<sup>-/-</sup> (le gène FMR1 est muté dans la maladie du X fragile) (Varghese et al, 2013).

La deuxième démarche consiste à muter des gènes connus pour leur implication dans le comportement social. Dans ce contexte, les souris génétiquement invalidées pour le récepteur Mu des opioïdes (*Oprm1*<sup>-/-</sup>) nous ont servi de modèle de TSA durant ma thèse.

### ➤ Les souris génétiquement invalidées pour le récepteur Mu des opioïdes modèle de TSA

#### ***i. Les récepteurs Mu des opioïdes***

Les récepteurs Mu appartiennent à la famille des récepteurs des opioïdes avec les récepteurs Delta et Kappa. Les trois récepteurs appartiennent à la superfamille des RCPGs canoniquement couplés à la protéine Gi. Comme pour les récepteurs sérotoninergiques, l'activité fonctionnelle de ces récepteurs est finement régulée par des partenaires protéiques. Si à ce jour aucune étude n'a caractérisé de façon

globale l'interactome du récepteur Mu, des interactions fonctionnelles avec de nombreuses protéines ont été identifiées. Il est important de souligner que parmi ces protéines on retrouve deux partenaires communs avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

D'une part, le récepteur Mu interagit avec NF1. Une étude fonctionnelle a démontré que NF1 régule l'activation de la voie Ras par le récepteur Mu dans les neurones épineux de taille moyenne de la voie directe. L'interaction entre NF1 et le récepteur Mu participe ainsi à la sensibilisation des souris aux effets psychomoteurs et récompensant de la morphine (Xie et al. 2016).

Par ailleurs, GPRIN1 interagit également avec le récepteur Mu. Ge *et al.* ont montré que l'expression de GPRIN1 stabilise l'expression du récepteur Mu dans les radeaux lipidiques, potentialisant ainsi sa signalisation. De plus, cette interaction accroît les effets de la stimulation du récepteur sur la pousse neuritique (Ge et al. 2009).

## ***ii. Expression et fonction des récepteurs Mu des opioïdes***

D'un point de vue anatomique, le récepteur Mu est largement exprimé dans le système nerveux central, particulièrement dans le cortex, le système limbique et le tronc cérébral (Le Merrer et al. 2009). Il est intéressant de constater que les récepteurs sont plus spécifiquement exprimés dans des structures clés du système de récompense, comme le noyau accumbens, l'aire tegmentale ventrale, l'amygdale et l'habénula. Ainsi, de nombreuses données expérimentales montrent l'implication des récepteurs Mu dans **les processus de récompense** associés à des renforçateurs naturels (alimentaires, sexuels) ou artificiels (drogues d'abus)(Le Merrer et al. 2009).

## ***iii. Récepteur Mu et comportement social***

Les comportements sociaux sont conservés au cours de l'évolution et retrouvés chez la plupart des mammifères. Ils jouent un rôle crucial pour la survie de l'espèce. De même que la reproduction ou l'alimentation, l'interaction sociale est un comportement naturellement récompensant, aux vertus hédoniques et renforçantes aussi bien chez l'humain que chez le rongeur (Trezza, Campolongo, et Vanderschuren 2011; Panksepp et Lahvis 2007; Calcagnetti et Schechter 1992). De nombreuses évidences indiquent que les récepteurs Mu sont au cœur de la régulation du comportement social. Des études pharmacologiques réalisés sur différentes espèces (primate, rat souris, campagnole) ont démontré que l'injection systémique d'antagonistes (DAMGO, naloxone) des récepteurs Mu induit une

diminution des comportements sociaux (nombre et durée des interactions, toilettage, jeu, comportement maternel) et de la détresse de séparation (analyse des vocalisations)(Trezza, Campolongo, et Vanderschuren 2011; Carden, Barr, et Hofer 1991). D'autres travaux chez le campagnole (espèce monogame) indiquent que l'administration d'un antagoniste des récepteurs Mu dans le noyau caudé et le putamen abolit la préférence pour le partenaire habituel (Burkett et al. 2011). De même, une étude réalisée chez le rat a démontré que l'infusion de naloxone, dans le NAc abolit la préférence sociale tandis qu'une infusion de morphine augmente les comportements sociaux associés au jeu (Trezza, Campolongo, et Vanderschuren 2011). La manipulation pharmacologique des récepteurs Mu module donc le comportement social. Il a également été observé chez le macaque rhésus qu'un polymorphisme induisant un gain de fonction (augmentation d'expression) des récepteurs Mu induit un accroissement de l'attachement à la mère chez le jeune primate (traduit par une augmentation du temps passé en contact social)(Barr et al. 2008). Ces données chez l'animal indiquent que les récepteurs Mu jouent un rôle crucial dans un vaste répertoire de comportements sociaux, allant de l'attachement à l'interaction avec les congénères. En lien avec ces données, une étude chez l'Homme a démontré qu'un polymorphisme du récepteur Mu (A118G) est associé à une différence de sensibilité au rejet social. Une autre étude d'imagerie chez l'humain utilisant le [<sup>11</sup>C]carfentanil, un ligand radiomarqué spécifique des récepteurs Mu, a montré une activation prononcée de ces récepteurs dans différentes structures liées au système de récompense durant des expériences de rejet social ou au contraire d'acceptation (Hsu et al. 2013). Ces résultats suggèrent une implication complexe du système opioïde et en particulier du récepteur Mu dans la gestion des comportements sociaux et de la récompense sociale chez l'Homme, en faisant un candidat de premier intérêt pour l'étude de l'étiologie et le traitement de l'autisme (Pellissier et al. 2017; Loseth, Ellingsen, et Leknes 2014).

#### ***iv. Les souris génétiquement déplétées en récepteur Mu (*Oprm1*<sup>-/-</sup>) comme modèle d'autisme***

Des mutations du récepteur Mu ont été observées dans certaines cohortes de patients souffrant de TSA (base de données de la *SFARI*, <https://www.simonsfoundation.org/>). En lien avec cette observation, les souris invalidées pour le récepteur mu aux opioïdes (*Oprm1*<sup>-/-</sup> récapitulent la plupart des symptômes comportementaux essentiels au diagnostic de la pathologie (Becker et al. 2014). En effet, dès 8 jours, les souriceaux isolés de leur mère émettent moins de vocalisations, et celles-ci ne sont pas

influencées par la présence de traces olfactives appartenant à la mère à la différence des animaux contrôles (Moles, Kieffer, et D'Amato 2004; Wöhr et al. 2011). De même, lorsqu'on laisse le choix entre deux nids aux petits séparés de la mère, ces derniers ne présentent pas de préférence pour le nid de la mère par rapport à un nid de provenance inconnue. Ces résultats démontrent un déficit précoce dans le domaine de l'attachement et de la communication sociale. A l'âge adulte, les souris *Oprm1<sup>-/-</sup>* ne montrent pas de préférence sociale et affichent un déficit d'interaction sociale directe marqué (diminution de la durée et du nombre des contacts sociaux) (Becker et al. 2014). Ces souris présentent donc des altérations dans un large panel de comportements sociaux comprenant l'attachement, la communication et l'interaction sociale. On observe par ailleurs la présence de stéréotypies motrices (secouements de la tête, toilettages répétitifs) et un déficit de flexibilité cognitive (persévérations lors de l'exploration d'un labyrinthe en Y). De nombreux symptômes secondaires sont également observés, comme une augmentation de l'anxiété, de l'agressivité, un déficit de coordination motrice et une susceptibilité accrue aux crises d'épilepsie (Becker et al. 2014).

Ce modèle récapitule donc un large panel de symptômes propres à la pathologie, confirmant le lien entre les récepteurs Mu des opioïdes et les TSA, justifiant son utilisation dans le domaine de la recherche pré clinique (Pellissier et al. 2017).

## II. La sérotonine dans les TSA

### a. Quelles évidences de l'implication de la sérotonine dans les TSA ?

Comme je l'ai mentionné précédemment, le biomarqueur le plus robuste des TSA est l'hypersérotoninergie. Si celle-ci semble avoir une origine plutôt périphérique, on peut rappeler que jusqu'à la fermeture de la barrière hémato-encéphalique, la sérotonine d'origine périphérique et extra-embryonnaire joue un rôle important dans le développement du système nerveux. Ainsi, un nombre croissant d'études montrent que la prise d'inhibiteurs de la recapture de la sérotonine durant la grossesse constitue un facteur de risque majeur pour le développement des TSA (Gemmel et al. 2017) (Devlin et al. 2005; Hervás et al. 2014; Huang et Santangelo 2008)..

Par ailleurs, on retrouve une association positive du polymorphisme 5-HTTLPR situé dans le promoteur du gène SLC6A4 (codant pour SERT) avec des cas familiaux de TSA (Gadow et al. 2013; Cook

et al. 1997; Sutcliffe et al. 2005; Cho et al. 2007; Coutinho et al. 2004; McCauley et al. 2004). Ce polymorphisme induit une diminution de l'expression de SERT et donc une augmentation du taux de sérotonine dans la fente synaptique. Wassink *et al.* ont démontré que ce polymorphisme est associé à une augmentation du volume cortical observé chez les enfants avec autisme. Ce polymorphisme est également associé à une augmentation de l'activation de l'amygdale en regard des stimuli sociaux chez les enfants avec TSA, faisant écho avec la théorie du déficit de récompense sociale (Wiggins et al., 2014). Finalement, les études montrent que la déplétion en tryptophane aggrave les comportements répétitifs et l'irritabilité chez des sujets atteints de TSA (McDougle et al., 1993, McDougle et al., 1996)

Dans leur ensemble, ces données semblent indiquer qu'une élévation du taux de sérotonine joue un rôle important dans la pathogenèse des TSA. On peut rappeler qu'un excès de sérotonine induit une augmentation de la prolifération des progéniteurs neuronaux, associée à une diminution de la mort neuronale, des défauts de migration, ainsi que des anomalies de la cytoarchitecture neuronale et de la morphogenèse des épines dendritiques. Chacune de ces anomalies fait également partie des marqueurs neuropathologiques des TSA. Il se pourrait donc que l'altération de l'homéostasie sérotoninergique durant le développement soit un des mécanismes à l'origine des TSA.

## b. Sérotonine et modélisation des TSA

En lien avec cette théorie sérotoninergique de l'autisme, des modèles animaux ont été mis au point pour étudier la corrélation entre hypersérotoninergie et trouble du comportement social. Veenstra-VanderWeele *et al.* ont généré une souris "*knock-in*" pour un polymorphisme de SERT associé aux TSA dans un étude précédente. En plus de présenter une élévation du taux sanguin de sérotonine, ces souris montrent également une absence de préférence sociale, des altérations de la communication sociale (analyse des vocalisations émises par les souriceaux lors de la séparation maternelle) et des stéréotypies motrices (Veenstra-VanderWeele et al., 2012). Les souris génétiquement déplétées en SERT ont été très étudiées (Bengel et al. 1998). On retrouve chez ces souris une diminution de la sociabilité, associée avec une anxiété accrue et une diminution de la dominance sociale (Murphy et Lesch 2008; Moy et al. 2009). On peut noter que, le croisement des souris SERT<sup>+/-</sup> avec une lignée haploinsuffisante pour PTEN aggrave la macrocéphalie et le déficit de sociabilité de ces souris (Page et al., 2009). Ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle l'activité de SERT doit être contenue dans une certaine

plage pour assurer un fonctionnement normal, et l'altération du fonctionnement de SERT accroît la vulnérabilité aux TSA.

Par ailleurs, des phénotypes « *autistic like* » ont été rapportés dans un grand nombre de lignées murines génétiquement déplétées pour des protéines critiques du système sérotoninergique. Par exemple, les souris dépourvues de Tph2 présentent une diminution de la communication sociale (diminution des vocalisations et de l'exploration sociale) ainsi que des déficits apparents dans la mémoire sociale et une inflexibilité cognitive (Kane et al. 2012; Del'Guidice et al. 2014; Mosienko et al. 2015). Les souris dépourvues de MAOA<sup>-/-</sup>, montrent quant à elles une diminution de l'interaction sociale, de l'émission de vocalisations et une inflexibilité cognitive (Bortolato et al. 2013)(Bortolato et al., 2013).

De plus, on retrouve des anomalies du système sérotoninergique dans certains modèles murins de formes syndromiques d'autisme. Par exemple, les souris exprimant la duplication 15q11-q13 (modèle d'une forme d'autisme syndromique évoquée précédemment) montrent une augmentation de la concentration de sérotonine dans la zone ventriculaire durant le développement (Waage-Baudet et al. 2003).

Ces modèles animaux suggèrent donc que l'altération du système sérotoninergique conduit à l'expression de troubles comportementaux et confère une vulnérabilité pour le développement des TSA. L'hypothèse la plus probable permettant d'expliquer les effets délétères sur le comportement social des anomalies du système sérotoninergique est leur impact sur dans le développement de la circuiterie impliquée dans ce comportement. Dans ce sens, de multiples interactions entre les systèmes sérotoninergiques et ocytocinergiques ont été mis en évidence notamment par le laboratoire du Dr. Malenka à Stanford (Dölen et al. 2013; Dölen 2015).

### c. Ocytocine, sérotonine et comportement social

Le rôle de l'ocytocine dans le comportement social et la récompense sociale a été très étudié ces dernières années. En particulier, il semblerait que les récepteurs ocytocinergiques exprimés dans le Nac, en agissant de concert avec la dopamine, soient indispensables à l'expression d'une préférence sociale (Dolen, 2015). Des anomalies au niveau de ce système pourraient donc sous-tendre des déficits du comportement social.

***i. Interaction des systèmes sérotoninergique et ocytocinergiques durant le développement***

Plusieurs études ont démontré l'importance de l'influence mutuelle de la sérotonine et de l'ocytocine pour le développement harmonieux de ces circuits. Eaton et al. ont démontré que l'injection post-natale d'ocytocine chez le campagnol augmente la densité des axones sérotoninergiques dans l'hypothalamus antérieur et ventromédian ainsi que dans l'amygdale (Eaton et al. 2012). Réciproquement, plusieurs études ont montré que l'hypersérotoninergie diminue le nombre de cellules ocytocinergiques (McNamara et al. 2008; Martin, Liu, et Wang 2012)(McNamara et al., 2008, Martin et al., 2012). Ces études apportent la preuve d'une interaction entre les systèmes sérotoninergiques et ocytocinergiques durant le développement. Des anomalies de l'un ou l'autre de ces systèmes pourraient avoir un impact direct sur le comportement à l'âge adulte.

***ii. Interaction du système sérotoninergique et ocytocinergique à l'âge adulte***

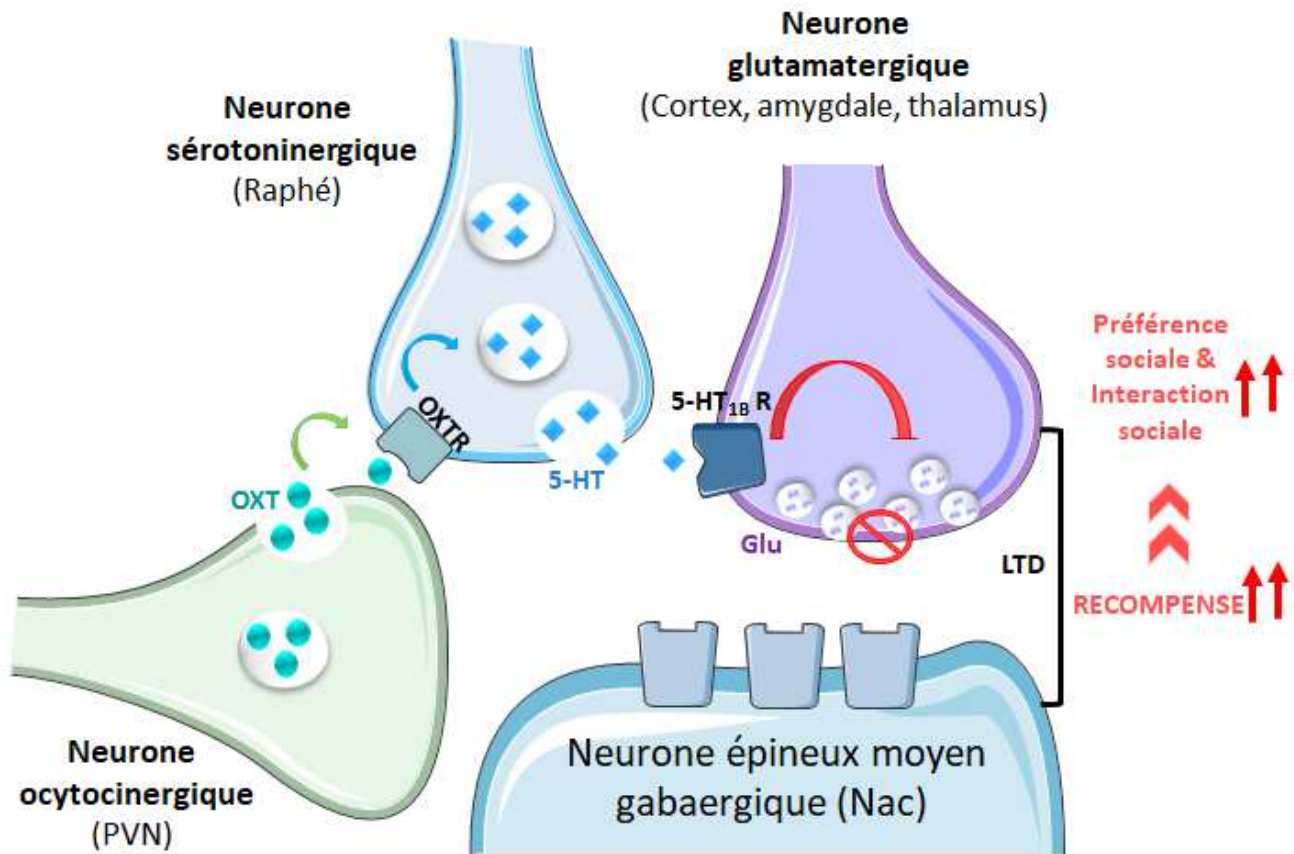
L'étude des drogues « pro sociales » (aussi appelées entactogènes) dans des modèles animaux a permis de révéler des mécanismes neuronaux cruciaux pour le comportement social. En particulier, les études sur la MDMA (3,4-méthylène dioxyméthamphétamine), qui bloque le SERT, ont mis en évidence l'interaction entre les systèmes sérotoninergiques et ocytocinergiques. En effet, l'administration de MDMA augmente les taux plasmatiques d'ocytocine chez le rat, effet bloqué par la pré-administration systémique d'un antagoniste du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> (Thompson et al., 2007). De même, l'augmentation des comportements sociaux induite par le MDMA est inhibée par la pré-administration (ICV) d'un antagoniste des récepteurs de l'ocytocine (Thompson et al. 2007; Kuteykin-Teplyakov et Maldonado 2014). Ces résultats suggèrent que le système sérotoninergique module le comportement social *via* la régulation de la libération d'ocytocine. Cette modulation semble être réciproque. En effet, Yoshida et al. ont démontré chez le rongeur que certaines cellules sérotoninergiques du raphé expriment le récepteur de l'ocytocine, et que la stimulation de ce dernier induit la libération de sérotonine (Yoshida et al. 2009). En faveur d'un rôle conjoint de ces deux systèmes de neurotransmission, Dölen et ses collègues (2013) ont montré que la déplétion génétique des récepteurs de l'ocytocine exprimés par les neurones du raphé abolit la préférence de place conditionnée pour un stimulus social. En particulier, ces auteurs ont montré que les récepteurs présynaptiques de l'ocytocine, localisés sur les projections de raphé dorsal au niveau



du noyau accumbens, induisent la libération de 5-HT dans le Nac et que l'activation des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> post-synaptiques est nécessaire pour établir la préférence sociale (figure 18). Dölen et al. ont ainsi montré donc que les propriétés récompensantes de l'interaction sociale chez la souris requièrent l'activité coordonnée de l'ocytocine et de la 5-HT dans le noyau accumbens.

Cette interaction entre ocytocine et sérotonine a également été démontrée chez l'Homme où l'administration d'ocytocine déplace la liaison du radio marqueur [<sup>18</sup>F]MPP, un ligand du récepteur 5-HT<sub>1A</sub>, et augmente la concentration de sérotonine dans le sérum (Mottolese et al. 2014). Une autre étude indique qu'à l'opposé de ce qui est observé chez des sujets sains, l'ocytocine ne modifie ni la liaison des ligands du récepteur 5-HT<sub>1A</sub>, ni les concentrations plasmatiques de sérotonine chez des sujets avec TSA (Lefevre et al. 2017). Collectivement, ces études mettent en évidence un rôle crucial de l'interaction entre le système sérotoninergique et l'ocytocine dans la récompense sociale, et son altération potentielle chez les sujets atteints TSA.

On peut noter que l'administration intranasale d'ocytocine a récemment été étudiée en tant que traitement potentiel des TSA. Malheureusement, les résultats cliniques et précliniques se sont révélés peu reproductibles (Alvares, Quintana, et Whitehouse 2017). Les altérations du système sérotoninergique observées chez les sujets atteints de TSA pourraient expliquer l'inefficacité de l'ocytocine. Dans ce contexte, la combinaison de l'ocytocine avec des traitements ciblant le système sérotoninergique paraît particulièrement prometteuse. Si le rôle des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et 5-HT<sub>1B</sub> dans la récompense sociale a déjà été mis en évidence, d'autres récepteurs de la sérotonine pourraient également être impliqués. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est particulièrement exprimé dans le Nac, où il apparaît réguler l'apprentissage. Une étude préliminaire a démontré les effets bénéfiques d'un de ses ligands sur l'interaction sociale dans un modèle d'autisme. De plus, une autre étude a trouvé une association d'un variant du récepteur aux TSA. Ces différents éléments font du récepteur 5-HT<sub>6</sub> une cible thérapeutique particulièrement intéressante à étudier dans le contexte du déficit d'apprentissage associatif et les effets renforçant de la cocaïne et du sucre.



**Figure 18-** l'action coordonnée de l'ocytocine et de la sérotonine dans le noyau accumbens (Nac) promeut la récompense sociale

Les neurones sérotoninergiques du raphé et oxytocinergiques du noyau paraventriculaire du thalamus projettent au niveau du noyau accumbens (**Nac**), où leur action conjuguée permet d'instaurer une dépression à long terme (**LTD**) de la libération de glutamate (**Glu**). L'inhibition des neurones épineux moyens du Nac qui en résulte promeut la récompense. Ce mécanisme semble jouer un rôle crucial dans le système de récompense social en particulier, la suppression des récepteurs oxytocinergiques présents sur les projections du raphé suffit à rompre la préférence sociale. Oxytocine (**OXT**), noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (**PVN**), sérotonine (**5-HT**), récepteur de l'ocytocine (**OXTR**), récepteur de la sérotonine 1b (**5-HT<sub>1b</sub>R**), Redessiné à partir de *Dölen, et al Nature 2013*.

# Objectifs

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> de la sérotonine a émergé depuis une dizaine d'années comme un acteur clef des processus neurodéveloppementaux. Son rôle a déjà été mis en évidence dans différents mécanismes clefs comme la migration neuronale et l'initiation de la pousse neuritique, *via* son interaction avec un de ses partenaires, Cdk5. Plusieurs autres partenaires identifiés par notre équipe sont connus pour leur implication dans les processus neurodéveloppementaux. Parmi ceux-ci, GPRIN1 a attiré notre attention car il s'agit d'une protéine connue pour interagir avec les protéines G $\alpha$  activées et promouvoir la pousse neuritique.

Dans ce contexte, le 1<sup>er</sup> but de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle de l'interaction entre GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la différenciation neuronale.

Dans ce cadre, j'ai poursuivi plusieurs objectifs :

- Caractériser les sites d'interaction de GPRIN1 avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, sa modulation et sa dynamique d'interaction.
- Mettre en évidence la fonction de cette interaction : 1) dans la signalisation du récepteur (*via* l'engagement de la voie Gs) et 2) dans la pousse neuritique et la morphogenèse de l'arbre dendritique induites par le récepteur, dans un modèle classiquement utilisé pour l'étude de la différenciation neuronale, les cellules NG108-15, puis dans des cultures primaires de neurones de souris issues de différentes régions cérébrales dans lesquelles le récepteur est fortement exprimé (striatum, cortex, hippocampe).

En particulier, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est exprimé dans des zones hautement liées aux processus de récompense et à la cognition, comme le striatum. Les fonctions du récepteur exprimé dans le striatum ont cependant été peu étudiées et son rôle dans la régulation de la récompense aux stimuli naturels et des comportements motivés reste à mettre en évidence. De façon intéressante, deux des partenaires du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, NF1 et GPRIN1, interagissent également avec le récepteur Mu des opioïdes laissant présager une interaction fonctionnelle potentielle entre ces deux RCPGs. Le récepteur Mu est un acteur central des processus de récompense dont le rôle a été très étudié dans l'addiction. Plus particulièrement, le récepteur Mu apparaît comme un modulateur clef de la récompense sociale. Le

déficit de récompense sociale est un des symptômes des troubles du spectre de l'autisme. Les souris génétiquement déplétées pour le récepteur Mu aux opioïdes (*Oprm1*<sup>(-/-)</sup>) présentent des déficits comportementaux, qui récapitulent les symptômes primaires, et de nombreux symptômes secondaires propres aux TSA. Ainsi, ces souris ont été proposées comme modèle d'autisme. En corrélation avec leur phénotype comportemental, ces souris présentent un déficit d'activation du système de récompense mis en jeu par des stimuli sociaux.

Dans ce contexte, je me suis intéressée dans la deuxième partie de ma thèse au rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les déficits comportementaux observés chez les souris *Oprm1*<sup>(-/-)</sup> et en particulier les déficits des comportements dépendant du striatum.

Notre première approche pour débiter cette étude a été de tester les effets du traitement sub-chronique des souris avec le SB258585 (agoniste inverse du récepteur) sur le comportement des souris sauvages et *Oprm1*<sup>(-/-)</sup>. Nous avons évalué les effets de ce composé sur :

- Le comportement social
- La préférence sociale
- L'inflexibilité cognitive
- Les comportements stéréotypés
- L'anxiété
- L'apprentissage moteur
- La sensibilité à la douleur

---

# MATERIEL ET METHODES

## I. Techniques d'étude moléculaires et cellulaires

### ○ ANIMAUX

Les souris *knock-in* (KI) 5-HT<sub>6</sub><sup>GFP/GFP</sup> exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> fusionné à la GFP au niveau de son extrémité C-terminale, ont été générées par recombinaison homologue par l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch-Graffenstaden, France, [http:// www .ics-mci.fr / fr /](http://www.ics-mci.fr/fr/)). Elles ont été fonctionnellement caractérisées (Deraredj Nadim et al. 2016a). Les cultures primaires de neurones ont été réalisées à partir de souris OF1 provenant de Charles River *Laboratories*. Les procédures ont été réalisées dans le strict respect des directives d'utilisation et de soin des animaux de l'Université de Montpellier (autorisation D34-172-4).

### ○ PLASMIDES PRODUITS CHIMIQUES ET ANTICORPS

Les constructions sauvages (Wt) du récepteur 5-HT<sub>6</sub> humain, étiquetées HA et YFP humain ont été décrites précédemment (Duhr et al., 2014). Tous les mutants du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont été générés par mutagenèse dirigée et contrôlés par séquençage. Le plasmide humain GPRIN1 a été construit par sous-clonage du clone I.M.A.G.E BC052950 (source bioscience) dans le plasmide d'expression eucaryote pRK5. La sonde CAMYEL a été fournie par la plateforme pharmacologique ARPEGE (BioCampus Montpellier, France).

Trois ShRNA dirigés contre GPRIN1, ainsi qu'un shRNA contrôle fusionné à l'eGFP, clonés dans un vecteur d'expression lentiviral pLKO ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich. Les particules virales ont été produites par la Plateforme de Vectorologie de Montpellier (PVM, BioCampus, Montpellier, France).

L'anticorps anti-HA conjugué aux billes agarose (clone n ° HA-7) a été acheté auprès de Sigma-Aldrich. L'anticorps de lapin anti-GPRIN1 (référence 13771-1-AP) de proteintech, l'anticorps anti-Gαs de lapin de Calbiochem (référence 371732), l'anticorps anti-HA de rat (clone n ° 3F10) de Roche et l'anticorps anti-MAP2 de souris de Novus biologics.

Le SB 271046, le Way 187181, le KT 5720 et le sel de triéthylammonium RP-cAMPS proviennent de chez Tocris Biosciences. La coelentérazine h utilisée pour les expériences de BRET a été achetée chez Nanolight Technology (référence 50909-86-9) . Les peptides TAT synthétiques (pureté > 90%) ont été

achetés chez Genscript. Les séquences peptidiques sont les suivantes : peptide TAT Ct320-342 : YGRKKRRQRRRPLFMRDFKRALGRFLPCPRPRPR ; et peptide TAT contrôle : GRKKRRQRRRPPCPCPLFRGLARKFDRMFLP.

- **CULTURE CELLULAIRE TRANSFECTION ET TRAITEMENTS**

### **Culture et transfection des lignées**

Les cellules NG108-15 ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal dialysé, 2% d'un mix hypoxanthine/aminopterin/thymidine (Life Technologies), et des antibiotiques. Les cellules ont été transfectées en suspension avec la Lipofectamine 2000 (Life Technologies) selon le protocole recommandé par le fournisseur. Les cellules ont été traitées 5h ou 24h après la transfection avec les composés indiqués aux concentrations suivantes : SB271046 (10  $\mu$ M), KT 5720 (2  $\mu$ M), cAMPS-RP (25  $\mu$ M), TAT Ct320-342 ou contrôle (TAT *scrambled*) (1  $\mu$ M). Les cellules ont été utilisées 24h ou 48h après transfection.

### **Culture primaire neuronale.**

Les cultures primaires de neurones de striatum, de cortex et d'hippocampe ont été préparées à partir d'embryons de souris OF1, aux jours embryonnaires 15,5 pour les neurones de cortex et de striatum et 17,5 pour les neurones d'hippocampe. Les structures prélevées ont été dissociées mécaniquement et reprises dans un milieu constitué de neurobasal (ThermoFischer scientific) supplémenté avec du B27 (ThermoFischer scientific), du GlutaMAX (ThermoFischer scientific) et un cocktail de penicilline/streptomycine. Les neurones dissociés sont ensuite placés sur des lamelles en verre de 12mm, préalablement coatées avec de la polyornithine et de la laminine. Les cultures ont ensuite été conservées dans un incubateur au taux d'humidité, de CO<sub>2</sub> et à la température contrôlés (à 37 °C 5% CO<sub>2</sub>). Pour les expériences de mesure de pousse neuritique de 1 à 3 DIV, les neurones ont été traités avec le peptide TATCt320-342 (1 $\mu$ M) ou le peptide TAT contrôle (1 $\mu$ M), 5h ou 24h après ensemencement, puis fixées après 1, 2, ou 3 jours de culture *in vitro* (DIV). Pour les expériences de mesure de l'arborisation dendritique à 13DIV, les neurones de striatum ont été traités au peptide TATCt320-342 ou contrôle (1 $\mu$ M) à partir de 4 DIV puis un jour sur deux jusqu'à 13DIV. Pour les expériences d'extinction de

l'expression de GPRIN1, les cultures ont été infectées à 3 DIV avec le ShRNA ciblant GPRIN1 ou un ShRNA contrôle *scrambled* eGFP puis lysées ou fixées à 13 DIV.

- **IMMUNOCYTOCHIMIE ET ANALYSES MORPHOLOGIQUES**

Les cellules NG 108-15 ont été fixées dans une solution de PBS à 4% de paraformaldehyde pendant 10 min, les neurones ont été fixés dans de la paraformaldehyde diluée à 2% dans le milieu de culture neuronale, pendant 15min. Les cellules ont ensuite été incubées dans une solution de PBS-glycine (0,1M) pendant 15 minutes, puis avec l'anticorps primaire (souris anti-MAP-2, 1: 1000, lapin anti GPRIN1 1: 500 ou rat anti-HA, 1: 1000) dans une solution de PBS à 5% de BSA et (Albumine de sérum bovin) et 0,1% de Triton à température ambiante pendant 1h. Après 3 lavages au PBS les cellules ont été placées dans la solution d'anticorps secondaire (anti-souris conjugué à l'Alexa Fluor 488 ou anti-lapin conjugué à l'Alexa Fluor 594, 1: 1000, dilué dans une solution PBS à 5% de BSA et 0,1% de Triton) à température ambiante pendant 1h heure. Les lamelles ont été montées dans du mowiol et visualisée avec un microscope à épifluorescence AxioImagerZ1 (Zeiss), en utilisant un objectif 20X. La longueur des neurites a été mesurée à l'aide du plugin NeuronJ du logiciel ImageJ. Un minimum de 15 champs de cellules a été analysé par condition, provenant d'au moins 3 expériences indépendantes. La ramification a été évaluée en utilisant une analyse de Sholl semi-automatisée qui évalue le nombre d'intersections coupant des cercles concentriques partant du soma et séparés par un intervalle de 5  $\mu\text{m}$  (SynD, MatLab), (Schmitz et al. 2011). Un minimum de 45 cellules ont été analysées pour chaque condition, provenant d'au moins 3 expériences indépendantes.

- **TECHNIQUES BIOCHIMIQUES**

#### **Lyse cellulaire**

Les cellules NG108-15 transfectées ont été lysées dans un tampon contenant : 20 mM d'HEPES, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1% de NP40, 10% de glycérol 4 mg / ml de dodécylmaltoside, des inhibiteurs de phosphatases (NaF, 10 mM, Na + -vanadate, 2 mM, Na + -pyrophosphate, 1 mM et  $\beta$ -glycérophosphate, 50 mM) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche) pendant 1 h sur roue à 4 ° C. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 15 000 g pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant a été transféré dans



un tube propre. La concentration en protéines a ensuite été évaluée en utilisant la méthode de dosage à l'acide bicinchoninique (BCA, sigma).

### **Immunoprécipitation**

#### 1) Immunoprécipitation par l'étiquette HA

Les protéines solubilisées (1 mg par condition) ont été incubées avec un anticorps anti-HA fixé sur billes d'agarose. Les billes sont ensuite culotées par centrifugation (15000 rcf, 15 minutes) et lavées avec du tampon de lyse. Cette étape est répétée 5 fois

#### 2) Immunoprécipitation par l'étiquette GFP

Les protéines solubilisées (1mg par condition) sont incubées avec des billes couplées à un nanobody dirigé contre la GFP (GFP TRAP®, Chromotek) pendant 1h à 4°C. Les billes GFP TRAP® sont ensuite culotées par centrifugation (2400 rcf, 4minutes) et lavées 4 fois avec un tampon contenant 10mM Tris/Cl ph 7.5; 500mM NaCl; 0.5mM EDTA. Un dernier lavage avec un tampon contenant 150mM NaCl est réalisé. L'élution des protéines immunoprécipitées est réalisée dans du tampon Laemmli 2X avec chauffage à 70°C pendant 10 minutes, avant analyse par immuno-blot.

### **Western-blot**

Les protéines ont été séparées sur minigel de polyacrylamide à 10% par migration dans un tampon tris-glycine dans un système mini-protean II (Biorad). Elles ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose Hybond C (GE Healthcare) *via* un système de transfert semi sec de biorad (Trans-Blot Turbo®). Après une étape de blocage dans du TBS contenant 0,1% de Tween-20 et 5% de lait écrémé, les membranes ont été incubées pendant une nuit à 4 ° C avec l'anticorps primaire dilué dans un tampon TBS contenant 0,1% de tween-20, 5% de BSA et 0,02% de sodium azide (anti-GPRIN1 1: 500 de lapin, anti-Gαs 1: 500 de lapin, anti-HA de rat 1: 1000). Les membranes ont ensuite été lavées trois fois dans du TBS-Tween et incubées 1h avec l'anticorps secondaire dilué dans du TBS-Tween avec 5% de lait (anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) anti-rat ou anti-lapin, 1/5000, GE Healthcare). L'immunoréactivité a été détectée par chemiluminescence améliorée (réactif de détection ECL plus, GE Healthcare) et développée grâce à un système « chemidoc® » (Biorad). Les bandes révélées ont été quantifiées par densitométrie à l'aide du logiciel ImageJ.

- **EXPERIENCES DE BRET (BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER)**

### **Analyse de l'interaction entre Cdk5-RLuc et 5-HT<sub>6</sub>-YFP**

Les cellules ont été transfectées en suspension avec une quantité fixe de plasmide codant pour la protéine Cdk5 fusionnée à la luciférase (Cdk5-RLuc) et une concentration croissante de plasmide codant pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> fusionné à la YFP (5-HT<sub>6</sub>-YFP, de 0 à 20 ng d'ADN / puits) et ensemencées dans des microplaques blanches à 96 puits (Greiner) à une densité de 50000 cellules par puits. Le signal de BRET de chaque plaque a été mesuré deux fois : une première mesure a été faite 24 heures après la transfection et une seconde mesure a été réalisée 48 heures après la transfection. Afin de mesurer le signal de BRET, le substrat de la luciférase, la coelenterazine h, a été ajouté à une concentration finale de 5 µM et incubée pendant 2 minutes. La luminescence issue de la luciférase et la fluorescence de la YFP ont été détectées à l'aide d'un Multithread Mithras LB 940 (Berthold), qui permet l'intégration séquentielle des signaux détectés avec deux filtres (filtre RLuc, 485 ± 10 nm, filtre YFP, 530 ± 12 nm). Ces valeurs ont été utilisées comme mesures relatives des expressions totales des protéines étiquetées YFP et RLuc. Pour les mesures de BRET, l'excitation est faite à la longueur d'onde correspondant à la luciférase et Les signaux d'émission à 530 nm ont été divisés par les signaux d'émission à 485 nm. Le rapport de BRET a été défini comme la différence entre le rapport d'émission obtenu avec les protéines de fusion RLuc et YFP co-transfectées et celui obtenu avec la protéine de fusion RLuc exprimée seule (bruit de fond). Les résultats ont été exprimés en unités milliBRET. La fluorescence totale et la luminescence, respectivement. Chaque point de la courbe de BRET correspond au signal de de BRET en fonction du ratio entre la fluorescence totale la luminescence totale pour chaque condition de transfection. Les courbes représentent les résultats de 4 expériences menées sur des cultures différentes.

### **Mesures des niveaux d'AMPc**

Les cellules ont été transfectées dans des microplaques blanches à 96 puits (Greiner) avec une quantité fixe de sonde CAMYEL (capteur AMPc composé d'une fusion YFP-Epac-RLuc dont la conformation change lors de la liaison AMPc) et de récepteur 5-HT<sub>6</sub>, avec ou sans GPRIN1 (Jiang Li et al, 2007). 24h ou 48h après la transfection, la coelenterazine h a été ajoutée à une concentration finale de 5 µM comme précédemment, la plaque est ensuite analysée après 2mn d'incubation. Le BRET a été mesuré en utilisant

un lecteur de plaques Mithras LB 940. L'élévation de l'AMPC dans la cellule induit un changement de conformation de la sonde CAMYEL : les deux extrémités porteuses de la RLuc et de la YFP s'éloignent, diminuant ainsi le signal de BRET. L'expression de 5-HT<sub>6</sub> dans les cellules NG 108-15 induit une forte diminution du signal CAMYEL BRET, par rapport aux cellules transfectées avec un vecteur vide. Cette observation correspond à une augmentation des taux d'AMPC en l'absence de stimulation par un agoniste dans les cellules exprimant le récepteur et a donc été utilisé comme indice de l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> à la signalisation Gs. Pour les expériences de dose réponse, les cellules ont été traitées 5 mn avant l'ajout de coelanterzine avec des concentrations croissantes de SB 271046 ou de WAY 187181.

## II. Analyses comportementales

### ○ ANIMAUX ET CONDITIONS D'HÉBERGEMENT

Les souris, mâles et femelles, sauvages (*Oprm1<sup>+/+</sup>*) ou invalidées pour le récepteur Mu aux opioïdes (*Oprm1<sup>-/-</sup>*), âgées de 6 à 8 semaines ont été élevées sur un fond génétique hybride 50% 129SVPas - 50% C57BL/6J (Matthes et al., 1996). Les animaux sont stabulés par groupes de 2 à 3 par cage d'élevage de type T2, la pièce d'hébergement est soumise à un cycle jour / nuit de 12 h (6h à 18h). Les conditions de température (22±2°C) et d'humidité (40±10%) sont maintenues constantes. L'accès à la nourriture et à l'eau est *ad libitum*. L'ensemble des procédures expérimentales a été évalué et approuvé par le comité d'éthique local en matière d'expérimentation animale (Comité d'éthique de la PCEA, INRA Nouzilly).

### ○ TRAITEMENT

Le SB258585 (Tocris) a été administré par injection intrapéritonéale à une dose de 2,5mg/Kg. Les animaux ont été injectés quotidiennement une semaine avant la batterie de tests afin d'analyser les effets de l'exposition subchronique au composé dès le début des tests comportementaux. Les animaux ont ensuite été injectés chaque jour 30mn avant le début des tests.

### ○ TESTS COMPORTEMENTAUX

La batterie de test comportementaux utilisée a été conçue pour analyser les effets du SB258585 sur les déficits comportementaux des souris *Oprm1<sup>-/-</sup>* modélisant les troubles observés dans les TSA (Becker et al. 2014). Les troubles du comportement social ont été évalués avec le test d'interaction sociale directe

et le test des trois chambres (préférence sociale). Les comportements stéréotypés et restreints ont été évalués par l'analyse de l'alternance spontanée dans un labyrinthe en Y et la quantification des stéréotypies motrices. Parmi les symptômes secondaires, ont été évalués : l'anxiété, (test de suppression de l'alimentation par la nouveauté, test d'enfouissement de billes), la maladresse motrice (rotarod), et la sensibilité à la douleur (test d'immersion de la queue). Le nombre de souris est identique pour tous les tests soit : *Oprm1<sup>+/+</sup>* Véhicule, n=10 ; *Oprm1<sup>+/+</sup>* SB258585 n=8 ; *Oprm1<sup>-/-</sup>* Véhicule, n=8 ; *Oprm1<sup>-/-</sup>* SB258585, n=12.

### ***Test d'enfouissement de billes (« Marble Burying test »)***

Le but de ce test est d'évaluer les stéréotypies d'enfouissement suscitées par l'anxiété. Le protocole a été adapté depuis la publication d'Amodeo et al. (Amodeo et al., 2012). Des cages d'élevage de taille T1 (21×11×17 cm), transparentes, sont préparées avec 5 cm de sciure fraîche sur laquelle sont disposées 20 billes de verre (diamètre : 1,5 cm) régulièrement espacées. L'intensité lumineuse de la pièce est réglée à 40 Lux. Les souris sont placées individuellement dans les cages recouvertes d'un couvercle filtrant. Après 15 mn, les souris sont retirées et le nombre de billes enfouies à plus de 50% est compté.

### ***Test d'interaction sociale directe***

Ce test permet d'évaluer les comportements sociaux spontanés des animaux à l'égard d'un congénère inconnu. Chaque arène (40x40 cm) est délimitée par des parois en polypropylène noires opaques (H50 cm). Le dispositif est placé sur un plancher infrarouge permettant de mieux visualiser les animaux lors de l'analyse à posteriori des enregistrements vidéo réalisés à chaque session. L'intensité lumineuse est fixée à 15 lux pour limiter l'anxiété des animaux. La veille du test, les souris sont habituées à l'arène durant 10 mn. Le jour du test, deux souris de même génotype, genre et traitement mais provenant de cages d'élevage différentes, sont introduites simultanément dans l'arène pour une session de 10 mn. Les enregistrements vidéo sont analysés à *posteriori* avec un clavier éthologique (viewpoint Lyon). Les paramètres suivants sont évalués : le nombre et la durée des contacts du museau et des pattes ; le nombre de toilettages totaux et après interaction sociale ; le nombre de redressements, de mouvements circulaires (circlings), d'attaques et de poursuites.

### ***Test de l'alternance spontanée dans un labyrinthe en Y***

Ce test permet d'évaluer la flexibilité cognitive au cours d'une séquence d'exploration spatiale. Les souris sont placées dans un labyrinthe en Y, constitué de trois bras en plexiglas (40x9x16 cm) tapissés de motifs distincts. Les souris sont placées au centre du labyrinthe durant 5 mn, l'intensité lumineuse est fixée à 15 lux. La séquence d'exploration du labyrinthe (entrées dans les bras A, B et C) est analysée *à posteriori* à partir d'enregistrements vidéos. Sont dénombrés pour chaque triades d'entrées : les alternances spontanées complètes (ex : A-B-C), les alternances entre deux bras (ex : A-C-A) et les retours dans le même bras (ex : A-A-C). L'augmentation du nombre de persévérations (alternances entre deux bras ou retours dans le même bras), en absence de troubles de la mémoire de travail ou de la mémoire spatiale, traduit un déficit de flexibilité cognitive.

### ***Analyse des stéréotypies motrices***

Pour ce test, les souris sont placées individuellement dans une cage d'élevage transparente (21x11x17 cm) contenant une couche de 3 cm de sciure durant 10 mn. Sont scorés en direct : le nombre de secouements de la tête, les redressements, les enfouissements (durée et nombre), les mouvements circulaires et les toilettages.

### ***Test des trois chambres (« test de Crawley »)***

Le protocole expérimental a été adapté de (Peca et al., 2011). Le dispositif de test est constitué d'une boîte en acrylique transparente divisée en trois chambres de taille égale (40 x 20 x 22,5 cm). Deux portes coulissantes (8 x 5 cm) permettent la circulation entre les chambres. Des cages grillagées, métalliques et de forme cylindriques (18 x 9 cm) sont utilisées pour contenir les souris interactrices. Les souris interactrices (qui serviront de stimuli sociaux) sont habituées au confinement dans les cages grillagées pendant 2 jours (20 minutes / jour). Le jour du test, l'animal testé est habitué au dispositif pendant 10 minutes (cages métalliques vides). Au bout de ces 10 mn la souris testée est ramenée dans la chambre du milieu pendant que qu'une souris non familière (nouveau social) est introduite dans une cage métallique dans l'une des chambres latérales et qu'un objet (8 x 10 cm) est introduit dans la seconde cage métallique comme témoin de nouveauté non sociale. Les portes coulissantes sont relevées et l'animal expérimental est autorisé à explorer librement l'appareil pendant 10 min. Le nombre d'entrées dans chaque chambre, le temps passé dans chaque chambre et le nombre et la durée des contacts du nez avec la souris stimulus ou l'objet (ou la cage métallique, sauf escalades) sont analysés *à posteriori* à

partir des enregistrements vidéo. La position relative des souris stimulus et des objets (chambre de gauche ou chambre de droite) est randomisée d'une souris à l'autre.

### ***Test de suppression de l'alimentation en réponse à la nouveauté (« Novelty Supressed Feeding » ; NSF)***

Le test de suppression de l'alimentation en réponse à la nouveauté permet de mesurer l'anxiété de conflit. Après 24 heures de jeûne, les souris sont placées individuellement dans une arène (40x40x50 cm) dont le sol est recouvert de sciure (10 cm). Au centre de l'arène, éclairée à 100 lux, est placé un mouchoir blanc sur lequel sont disposés 3 granulés alimentaires standards. La souris est mise dans l'arène et le temps que met l'animal avant de se nourrir est quantifié. Les souris ont tendance à éviter le centre de l'arène, qui est plus éclairé donc anxiogène, la présence de granulés alimentaires au centre stimule en contre partie des comportements d'approches.

### ***Apprentissage Moteur :***

La performance d'apprentissage moteur a été évaluée comme décrit précédemment (Le Merrer et al., 2013). L'appareil utilisé est un rotarod (Bioseb, Valbonne, France) accélérant de 4 à 40 tr / min en 5 min. L'axe est recouvert d'un tube isolant pour une meilleure adhérence, son périmètre externe est de 5 cm. La pièce est éclairée à 40 lux. Au jour 1, les souris sont, tout d'abord, habituées à marcher sur l'axe rotatif à 4 rpm. L'entraînement dure jusqu'à ce qu'elles puissent rester plus de 180s. Du jour 2 au jour 5, les souris sont testées à raison de trois essais quotidiens séparés chacun par 60 secondes de repos. Pour chaque essai, les souris sont placées sur l'axe rotatif, la rotation commence à une vitesse constante de 4 tr / min pendant 60 s. Ensuite, le programme d'accélération est lancé, le test est terminé pour une souris lorsqu'elle tombe de l'axe. Le temps passé sur l'axe rotatif est automatiquement enregistré. Le temps pendant lequel l'animal reste sur l'axe en rotation le jour 2 est une mesure de l'équilibre, de la coordination, de la condition physique. L'évolution du temps passé sur le rotarod avant la chute au fur et à mesure des 5 sessions est le reflet de l'apprentissage moteur.

### ***Test de l'immersion de la queue***

L'animal expérimental est immobilisé dans un dispositif de contention (sachet en tissu). La queue de l'animal est ensuite immergée dans un bain marie chauffé à une température constante. Trois

températures sont testées successivement : 48°C, 50°C et 52°C. Le temps de latence avant l'observation d'un réflexe de retrait de la queue est mesuré.

### III. Analyse Statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism4 (GraphPad Software Inc).

Pour la partie 1 des résultats, les données ont été analysées avec un test de student lorsque deux conditions seulement ont été comparées. Les résultats de l'analyse de sholl ont été analysés avec une ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de Sidak pour comparer les effets de GPRIN1 à chaque distance du soma. Dans tous les autres tests, les données ont été analysées avec une ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tukey pour les comparaisons multiples.

Pour la partie 2 des résultats, (analyse comportementale), les données ont été analysé *via* une ANOVA à deux facteurs (génotype et traitement) et suivie d'un test *à posteriori* de Tukey pour les comparaisons multiples. Le test des trois chambres (Crawley) a été analysé avec une ANOVA à deux facteurs suivis d'un test de Sidak pour comparer pour chaque groupe les données d'interaction avec l'objet ou la souris interagtrice.

Des tableaux détaillant les statistiques pour chacune des figures sont disponibles en annexe 1, ils sont classés par type d'analyse.

---

# RESULTATS



# Chapitre I : L'interaction dynamique entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et Ses partenaires protéiques façonne l'architecture de l'arborisation dendritique

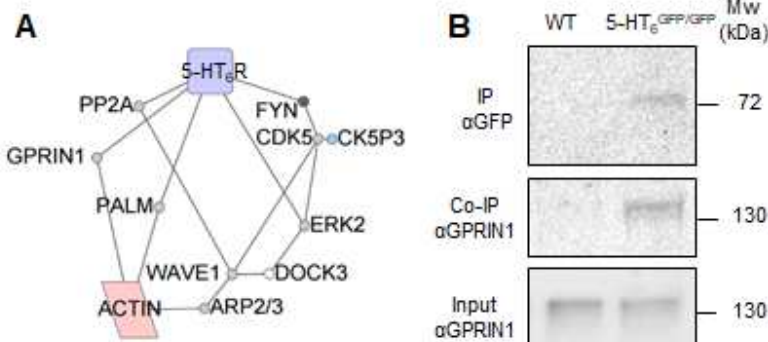
## a. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> interagit avec la protéine GPRIN1 *in vivo*

Dans une étude interactomique précédente, basée sur approche associant chromatographie d'affinité (« GST pull-down ») et identification des protéines isolées par affinité par spectrométrie de masse en tandem (AP-MS), l'équipe a mis en évidence une association entre l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et un réseau de protéines impliquées dans le développement neuronal (Duhr et al. 2014). Ces candidats partenaires du récepteur comprennent GPRIN1, un substrat de Cdk5, connu pour son rôle dans la pousse neuritique, auquel nous nous sommes donc intéressés dans cette étude (Figure 19)

Notre premier objectif a été de vérifier l'interaction de GPRIN1 avec la forme entière du récepteur. Pour cela, nous avons utilisé un modèle hétérologue, les NG108-15. Il s'agit d'une lignée de neuroblastomes, fréquemment utilisée pour étudier la différenciation neuronale. Ces cellules n'expriment ni le récepteur 5-HT<sub>6</sub> ni GPRIN1 de façon endogène, nous les avons donc exprimés par transfection. Nous avons pu observer que GPRIN1 co-immunoprécipite avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> (HA-5-

**Figure 19- GPRIN1 un nouvel interacteur du récepteur 5-HT<sub>6</sub>**

(A) Représentation schématique de l'interactome du récepteur 5-HT<sub>6</sub> impliqué dans la dynamique du cytosquelette d'actine modélisée à partir de Cytoscape (v 2.8.1). Les points gris représentent les partenaires identifiés dans Duhr et al 2014. (B) Le récepteur 5-HT<sub>6</sub>-GFP a été immunoprécipité (IP) à partir de lysats de cerveaux de souris 5-HT<sub>6</sub><sup>GFP/GFP</sup> via un système GFP TRAP®. La co-immunoprécipitation de GPRIN1 (Co-IP) a été révélée en utilisant un anticorps anti-GPRIN1 (αGPRIN1) et l'immunoprécipitation du récepteur 5-HT<sub>6</sub>-GFP avec un anticorps anti GFP (αGFP). L'immunoprécipitation témoin a été réalisée en utilisant un extrait de protéines de cerveau de souris sauvages (WT). Un immunoblot représentatif de trois expériences indépendantes est montré.



HT<sub>6</sub>) dans les cellules NG 108-15 (figure 20A), confirmant la présence d'une interaction entre ces deux protéines entières dans un contexte cellulaire, *in vitro*.

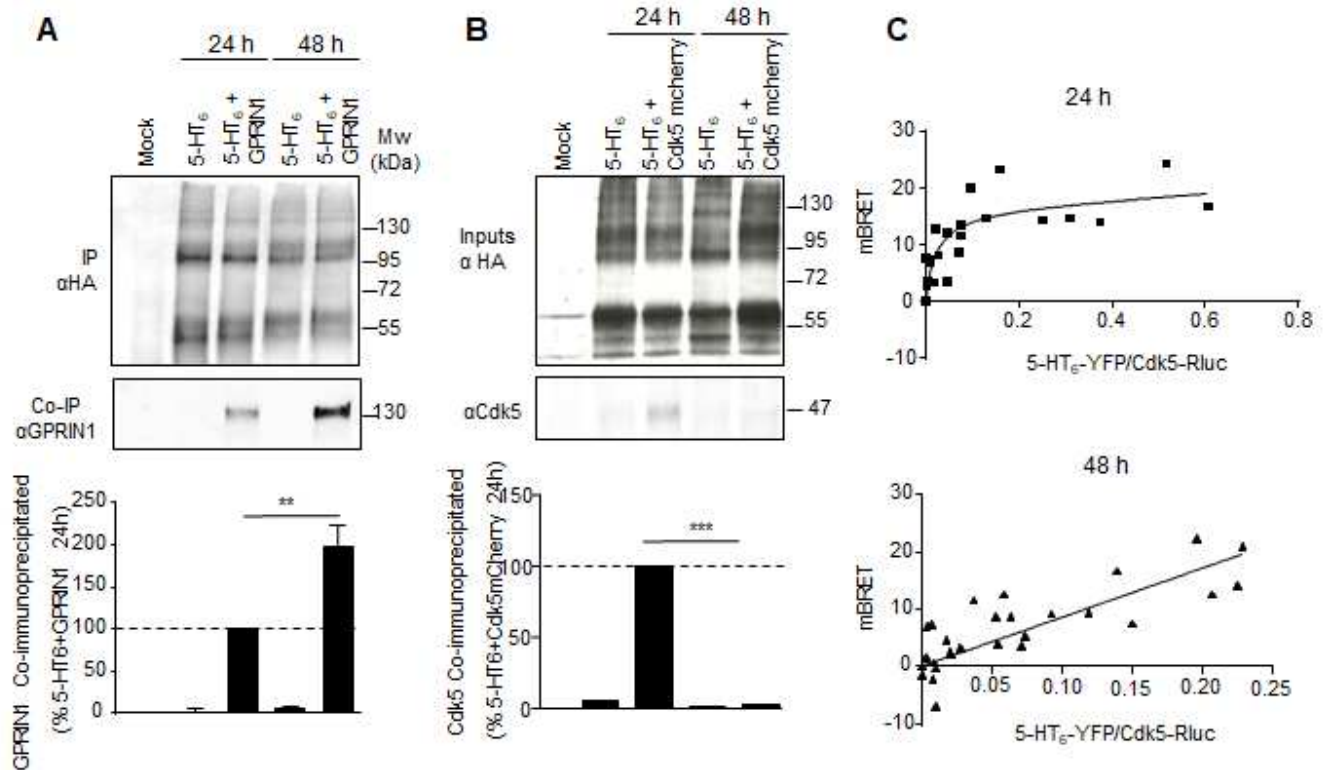
Nous avons ensuite étudié cette interaction *in vivo* avec le récepteur natif en réalisant une co-immunoprécipitation (GFP Trap®) à partir de lysats de cerveau provenant d'une souris *knock-in* exprimant une version étiquetée GFP du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (souris 5-HT<sub>6</sub><sup>GFP/GFP</sup> générée par le laboratoire). J'ai observé une co-immunoprécipitation de GPRIN1 avec le récepteur, nous permettant de confirmer son interaction avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> endogène, dans un contexte tissulaire authentique (figure 19B). Collectivement, ces résultats indiquent que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> sous sa forme entière, interagit avec GPRIN1 *in vitro* et *in vivo*.

## b. Dynamique temporelle des interactions 5-HT<sub>6</sub>-Cdk5 et 5-HT<sub>6</sub>-GPRIN1 dans les cellules NG 108-15

Pour aller plus loin dans l'étude de cette interaction, nous avons étudié son évolution au cours du temps dans les cellules NG108-15.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que cette interaction suit une dynamique temporelle. En effet, les expériences de co-immunoprécipitation démontrent que l'interaction entre GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est beaucoup plus robuste 48h après la transfection, comparé à l'interaction observée 24h après la transfection (+ 140 ± 15,3 %  $p < 0,0001$ , figure 20A). Par ailleurs, nous observons que l'expression de GPRIN1 et du récepteur dans les lysats totaux augmentent également entre 24h et 48h (figure 21A). Le ratio d'expression de GPRIN sur l'expression du récepteur reste cependant identique aux deux temps, indiquant que l'expression des deux protéines varie dans les mêmes proportions. Ainsi, il est peu probable que l'augmentation d'interaction de GPRIN1 avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, observée à 48h s'explique uniquement par cette variation d'expression.

Il est par ailleurs important de souligner que toutes nos tentatives d'ajout d'un tag à la séquence de GPRIN1 ont résulté en une altération de l'expression de GPRIN1 à la membrane. De ce fait, nous n'avons pas pu étudier l'interaction récepteur 5-HT<sub>6</sub>/GPRIN1 avec des techniques de BRET ou de FRET.



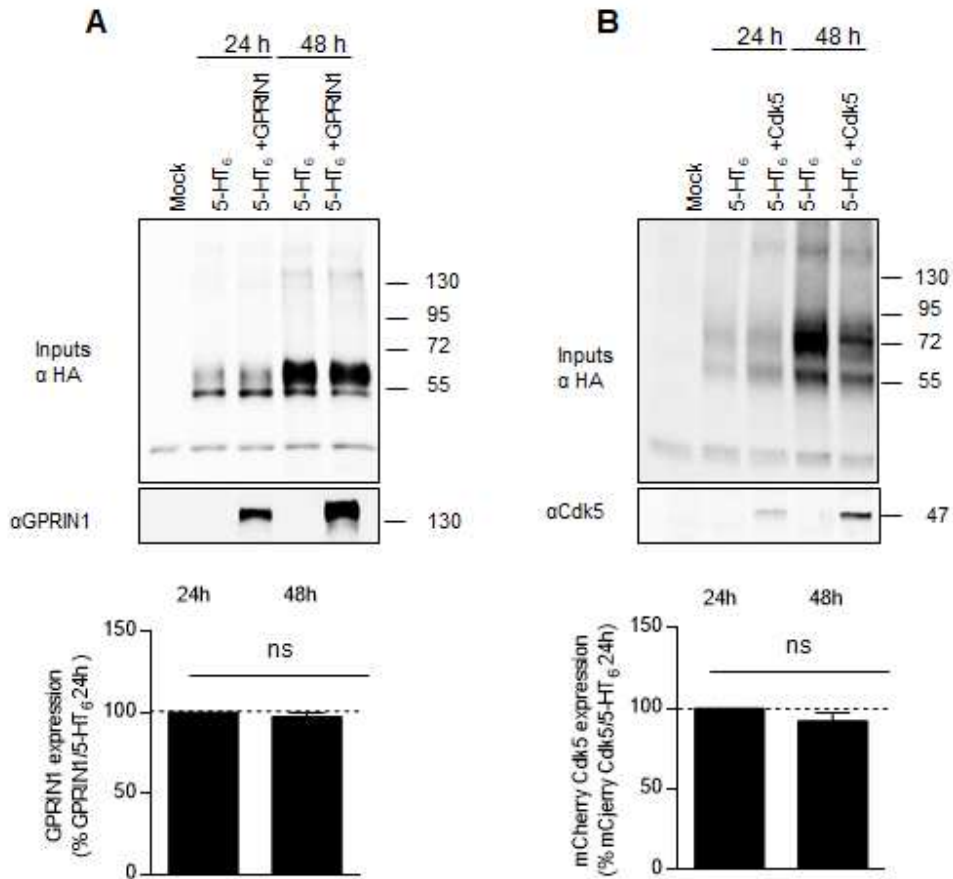
**Figure 20 Les interactions de GPRIN1 et Cdk5 avec le récepteur suivent une dynamique temporelle**

Les NG108-15 ont été transfectées avec le récepteur HA-5-HT<sub>6</sub> seul ou en combinaison avec GPRIN1 **(A)** ou Cdk5 mcherry **(B)**. Les cellules ont été lysées 24h ou 48h après la transfection. Le récepteur a été immunoprécipité en utilisant des billes d'agarose conjuguées à un anticorps anti-HA. La co-immunoprécipitation de GPRIN1 (Co-IP) a été révélée en utilisant un anticorps anti-GPRIN1 (αGPRIN), la co-immunoprécipitation de Cdk5mcherry (Co-IP) a été révélée en utilisant un anticorps anti-Cdk5 (αCdk5), et l'immunoprécipitation (IP) du récepteur HA-5-HT<sub>6</sub> avec un anticorps anti HA (αHA). Un immunoblot représentatif est montré dans le panneau supérieur, et l'histogramme en dessous représente les résultats de l'analyse densitométrique de quatre expériences indépendantes, les inputs sont présentés sur la page suivante. Les résultats ont été analysés par une ANOVA suivie d'un test de Tukey, et sont représentés en moyenne ± SEM. \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  et \*\*\* $p < 0.001$ . **(C)** Les NG108-15 ont été transfectées dans des plaques 96 puits avec une dose fixe Cdk5-Rluc (donneur) et des concentrations croissantes de 5-HT<sub>6</sub>-YFP (accepteur). Le signal de BRET a été mesuré 24h et 48h après la transfection, la proximité entre Cdk5-Rluc et 5-HT<sub>6</sub>-YFP a été évaluée *via* l'analyse de la saturation du signal de BRET. Les mesures représentent les résultats cumulatifs de 4 expériences.

Dans une étude précédente, notre équipe a étudié l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et un autre de ses partenaires protéiques : Cdk5. L'interaction récepteur 5-HT<sub>6</sub>-Cdk5 n'avait cependant été mise en évidence dans les cellules NG108-15 que 24h après la transfection (Duhr et al. 2014) i.e. dans des conditions expérimentales où l'association entre GPRIN1 et le récepteur est faible. Suite à l'observation de la variation d'interaction de GPRIN1 avec le récepteur au cours du temps, nous nous sommes demandés si l'interaction entre le récepteur et Cdk5 suivait également une dynamique temporelle. Confirmant les résultats obtenus précédemment par l'équipe, j'ai pu mettre en évidence

une co-immunoprécipitation de Cdk5-mcherry exprimée dans les cellules NG 108-15 avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> après 24h de transfection (figure 20B). Cependant, 48h après la transfection (condition où l'association entre GPRIN1 et le récepteur est fortement augmentée), on n'observe pas de co-immunoprécipitation de Cdk5 avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> ( $-96,9 \pm 3,25$  %  $p < 0,0001$ , figure 20B). J'ai ensuite utilisé une technique de BRET pour confirmer ce résultat. J'ai pu observer une saturation du signal de BRET dans les cellules coexprimant 5-HT<sub>6</sub>-YFP et Cdk5-RLuc 24h après la transfection, confirmant la présence d'une interaction spécifique entre les deux protéines (figure 20C panel haut). Toutefois, 48h après la transfection, on observe une absence de saturation du signal de BRET, indiquant l'absence d'interaction spécifique entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub>-YFP et Cdk5-RLuc (figure 20C panel bas). Si l'expression de Cdk5mcherry augmente au cours du temps, à l'image de ce qui a été mis en évidence pour GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, le ratio de l'expression de Cdk5 sur celle du récepteur reste identique aux deux temps (figure 21B).

Collectivement, ces données semblent indiquer que les interactions entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et Cdk5 d'une part, et GPRIN1 d'autre part, sont des processus dynamiques et que le récepteur interagit avec l'un des deux partenaires de façon exclusive. Il s'agit, à notre connaissance d'une des premières observations d'une dynamique temporelle d'interaction entre deux partenaires d'un RCPG qui s'associent au même domaine du récepteur (le domaine C-terminal dans le cas du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, comme nous le verrons par la suite).



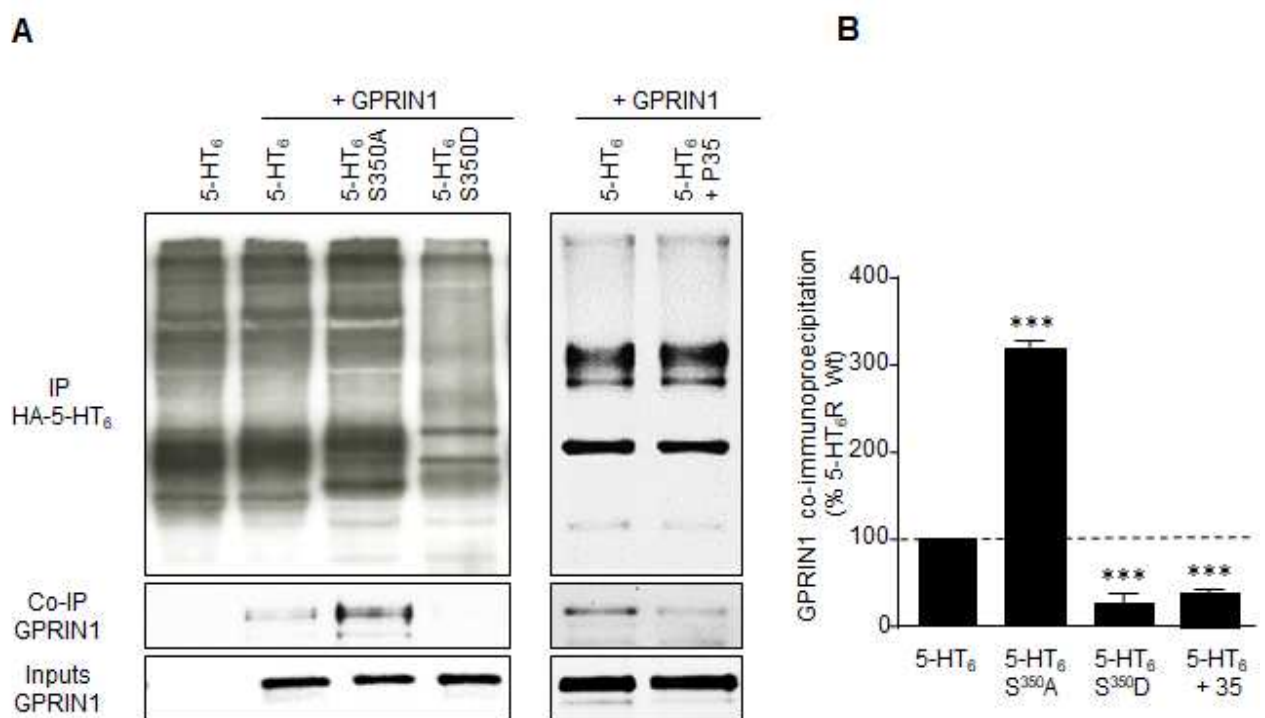
**Figure 21- L'expression de 5-HT<sub>6</sub>, GPRIN1 et Cdk5 évolue au cours du temps.**

**(A)** Les cellules NG108-15 ont été transfectées avec des plasmides codant pour le récepteur HA-5-HT<sub>6</sub> seul ou en combinaison avec GPRIN1 ou Cdk5 mcherry. Les cellules ont été lysées 24h ou 48h après la transfection. Les extraits protéiques (inputs) ont été déposés sur gel à quantité de protéines équivalentes pour chaque condition. GPRIN1a été révélée en utilisant un anticorps anti-GPRIN1 ( $\alpha$ GPRIN1), le récepteur HA-5-HT<sub>6</sub> avec un anticorps anti HA ( $\alpha$ HA) et Cdk5 mcherry avec un anticorps anti Cdk5 ( $\alpha$ Cdk5). Un immunoblot représentatif est montré dans le panneau supérieur, et l'histogramme en dessous représente les résultats de l'analyse densitométrique de trois expériences indépendantes. Les résultats ont été analysés avec un test de Student et sont représentés en moyenne  $\pm$  SEM.

### c. La phosphorylation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> : Rôle dans la dynamique d'interaction entre GPRIN1 et Cdk5

Nous avons démontré que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> exprimé dans les cellules NG 108-15, interagit séquentiellement avec deux partenaires : Cdk5 et GPRIN1.

Nous avons alors recherché quel mécanisme pouvait sous-tendre la succession de ces interactions. Comme je l'ai évoqué dans l'introduction, Cdk5 phosphoryle le récepteur sur la sérine 350



**Figure 22- La phosphorylation du récepteur sur la Ser350 module l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et GPRIN1.**

Les cellules NG 108-15 ont été transfectées avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> sauvage étiqueté HA, (HA-5-HT<sub>6</sub>) ou muté au niveau de la Ser350 (5-HT<sub>6</sub><sup>S350A</sup> et 5-HT<sub>6</sub><sup>S350D</sup>), seul ou en combinaison avec GPRIN1 comme indiqué au-dessus des immunoblots. Dans la dernière condition, le récepteur sauvage a été transfecté avec GPRIN1 et P35, une sous unité activatrice de Cdk5. Après 48h de transfection, les cellules ont été lysées et le récepteur a été immunoprécipité avec des billes d'agarose couplées à un anticorps anti HA. La présence de GPRIN1 et du récepteur ont été mises en évidence avec un anticorps anti GPRIN1 et anti HA respectivement. **(A)** Les images montrent des immunoblots représentatifs de trois expériences indépendantes menées sur des cultures différentes. **(B)** Les histogrammes montrent les résultats de l'analyse densitométrique. Les résultats ont été analysés avec une ANOVA suivi d'un test de Tukey, et sont représentés en moyenne ± SEM. \**P* < 0.05 \*\**P* < 0.01 et \*\*\**p* < 0.001 vs. condition HA-5-HT<sub>6</sub> + GPRIN1.

au niveau de son extrémité C-terminale (Duhr et al. 2014). La phosphorylation est un mécanisme de régulation dynamique qui peut affecter la conformation et donc la fonction d'une protéine. Cette modification est labile, puisque l'action conjointe de kinases et phosphatases permet aux protéines d'alterner entre état phosphorylé et dé phosphorylé. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle cette phosphorylation pourrait jouer un rôle dans la dynamique d'interaction observée.

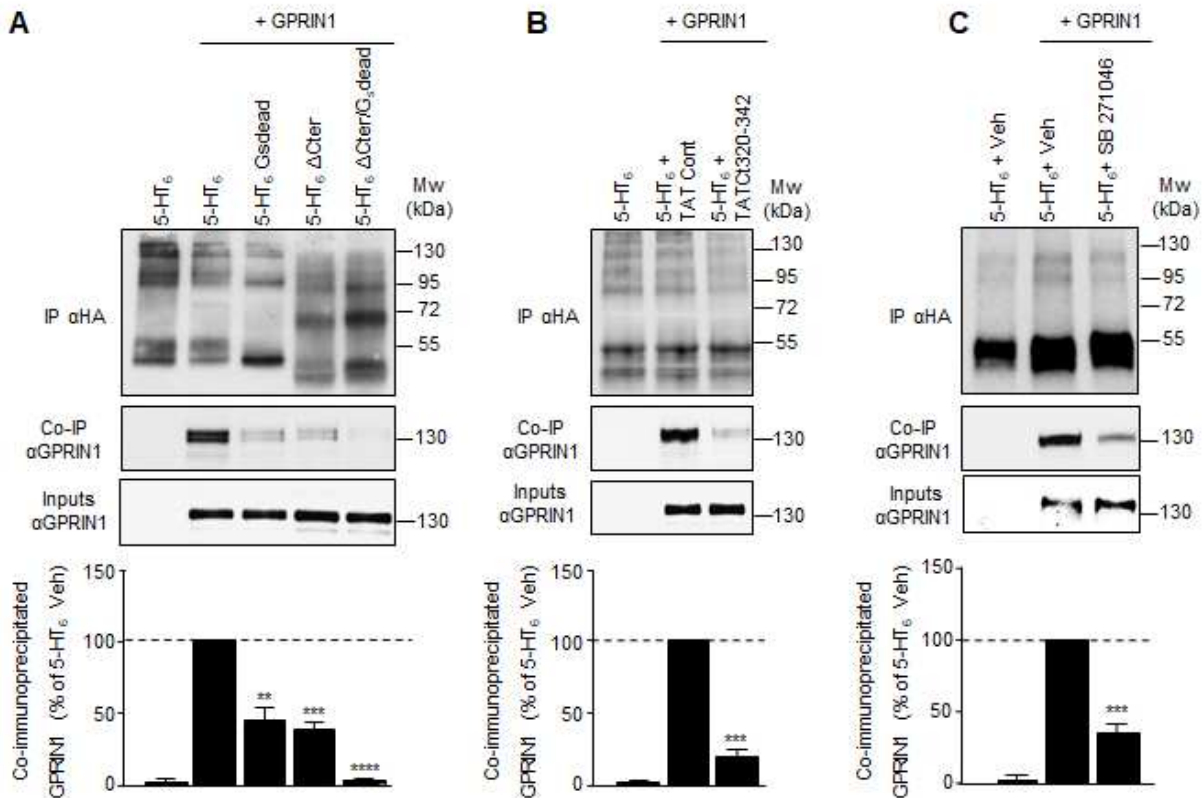
Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord étudié l'effet de la mutation du site de phosphorylation sur l'interaction du récepteur avec GPRIN1 dans les cellules NG 108-15, 48h après transfection. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub>S<sup>350</sup>A (non phosphorylable par Cdk5) interagit plus fortement avec GPRIN1 que le récepteur sauvage (+ 217 ± 5 % p < 0,0001, figure 22). A l'inverse, le mutant 5-HT<sub>6</sub>S<sup>350</sup>D (qui mime un état de phosphorylation constitutif) ne recrute pratiquement plus GPRIN1 (-83 ± 5 % p < 0,0001, figure 22). Pour confirmer le rôle de la phosphorylation du récepteur par Cdk5, et exclure la possibilité d'un artefact conformationnel dû aux mutations, nous avons choisi de moduler l'activité de Cdk5 en surexprimant p35, un des activateurs de Cdk5 (L. H. Tsai et al. 1994; Duhr et al. 2014; Meffre et al. 2012). La surexpression de p35 induit une diminution de l'interaction entre GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, similaire à celle qui est observée dans les cellules exprimant le mutant 5-HT<sub>6</sub>S<sup>350</sup>D, (figure 22), confirmant que GPRIN1 interagit préférentiellement avec la forme non phosphorylée du récepteur. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle clef de la phosphorylation de la Ser<sup>350</sup> dans la dynamique d'interaction des partenaires du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et en particulier dans le recrutement séquentiel de Cdk5 et GPRIN1 par le récepteur.

#### d. L'association de GPRIN1 avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> requiert le domaine C-terminal et la protéine G $\alpha$ s

Comme cela a été mentionné précédemment, l'interaction entre GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> a été initialement mise en évidence à partir d'un GST-pulldown utilisant le domaine C-terminal du récepteur 5-HT<sub>6</sub> comme appât (Duhr et al 2014). Afin de confirmer l'importance de ce domaine dans l'interaction de GPRIN1, nous avons coexprimé la protéine avec un récepteur tronqué de la totalité du domaine C-terminal (5-HT<sub>6</sub>  $\Delta$ Cter). La délétion du domaine C-terminal réduit fortement l'interaction (~65% par rapport au récepteur 5HT<sub>6</sub> entier) mais ne l'abolit pas, suggérant la présence d'un autre site

d'interaction (figure 23A). Afin de préciser le site d'interaction au sein du domaine C-terminal, nous avons réalisé des délétions croissantes du domaine C-terminal (à partir de l'extrémité C-terminale). Nous avons ainsi montré que GPRIN1 co-immunoprécipite avec la même efficacité avec le récepteur sauvage et un récepteur tronqué des 98 résidus C-terminaux (i.e. ne conservant que les 22 résidus N-terminaux du domaine C-terminal), démontrant l'importance de cette séquence de 22 acides aminés dans le recrutement de GPRIN1. Afin de confirmer son rôle dans l'interaction, nous avons utilisé un peptide interférant correspondant à ces 22 résidus et rendu capable de traverser la membrane plasmique grâce sa fusion au domaine de transduction de la protéine Tat du virus HIV (TATCt320-342). Le prétraitement des cellules avec le peptide TATCt320-342 (1  $\mu$ M, 12 h) réduit significativement l'interaction entre GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et la quantité résiduelle de GPRIN1 co-immunoprécipitée avec le récepteur à partir des cellules traitées au peptide est équivalente à celle qui est mesurée à partir des cellules co-exprimant GPRIN1 et le récepteur mutant 5-HT<sub>6</sub>  $\Delta$ Cter. L'ensemble de ces résultats indique que les 22 acides aminés N-terminaux de l'extrémité C-terminale du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sont importants pour le recrutement de GPRIN1 par le récepteur, mais également qu'un autre mécanisme contribue à cette interaction (figure 4B). Nous avons ensuite recherché cet autre mécanisme contribuant au recrutement de GPRIN1 par le récepteur 5-HT<sub>6</sub>. Rappelons que GPRIN1 est connu pour interagir avec les protéines G $\alpha$  activées. Pour déterminer le rôle de la protéine G $\alpha$ s, nous avons utilisé un mutant « Gs dead » du récepteur, incapable d'engager la signalisation dépendante de Gs du fait de son incapacité à lier la protéine G $\alpha$ s activée (Jacobshagen et al. 2014). Cette mutation réduit l'association de GPRIN1 au récepteur de façon similaire à ce qui est observé dans les cellules traitées au peptide TATCt320-342 ou exprimant le récepteur mutant 5-HT<sub>6</sub>  $\Delta$ Cter (~65% par rapport au récepteur 5HT<sub>6</sub> entier, figure 5A). Pour confirmer que ces deux mécanismes concourent au recrutement de GPRIN1 par le récepteur, nous avons créé un double mutant « Gs dead » et tronqué pour l'extrémité C-terminale (5-HT<sub>6</sub>  $\Delta$ Cter/Gsdead). On observe un effet additionnel de ces deux mutations conduisant à une réduction de plus de 95% de l'interaction (figure 23A). L'ensemble de ces résultats suggère que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> recrute un





**Figure 23- L'interaction entre GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> requiert le domaine C-terminal et l'interaction avec la protéine Gs** Les NG108-15 ont été transfectées avec le récepteur HA-5-HT<sub>6</sub> sauvage, ou mutant, seul ou en combinaison avec GPRIN1. Les cellules ont été lysées 48h après la transfection. Le récepteur a été immunoprécipité en utilisant des billes d'agarose conjuguées à un anticorps anti-HA. La co-immunoprécipitation de GPRIN1 (Co-IP) a été révélée en utilisant un anticorps anti-GPRIN1 (αGPRIN1) et l'immunoprécipitation (IP) du récepteur HA-5-HT<sub>6</sub> avec un anticorps anti HA (αHA). Un immunoblot représentatif est montré dans le panneau supérieur, et l'histogramme en dessous représente les résultats de l'analyse densitométrique de trois expériences indépendantes. **(A)** Résultats obtenus pour le mutant Gsdead (5-HT<sub>6</sub>/Gsdead), le mutant tronqué pour le domaine C-terminal (5-HT<sub>6</sub>ΔCter) et le double mutant Gsdead et tronqué pour le domaine C-terminal (5-HT<sub>6</sub> ΔCter/Gsdead). **(B)** Résultats obtenus pour les cellules NG108-15 ont transfectées avec le récepteur HA-5-HT<sub>6</sub> sauvage, + GPRIN1 et traitées avec le TAT peptide Ct320-342 ou avec un scrambled TAT peptide comme contrôle (1μM, 12h). **(C)** Résultats obtenus pour les cellules NG108-15 ont été transfectées avec GRPIN1 et le récepteur HA-5-HT<sub>6</sub> sauvage puis traitées avec un vehicule (DMSO) ou avec le SB271046, un agoniste inverse du récepteur (10 mM) pour une durée de 5mn ou 12h. Les résultats ont été analysés avec une ANOVA suivi d'un test de Tukey, et sont représentés en moyenne ± SEM. \*P < 0.05 \*\*P < 0.01 et \*\*\*p < 0.001 vs. Condition 5-HT<sub>6</sub> Wt ou vehcl + GPRIN1.

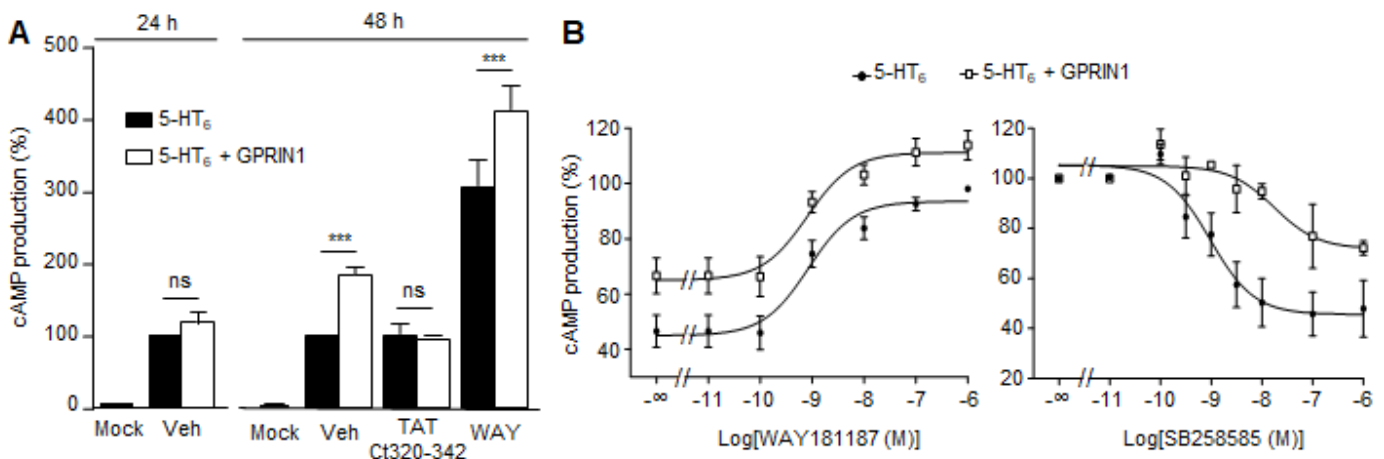
complexe constitué de la G<sub>s</sub> activée et de GPRIN1 et que la G<sub>s</sub> favorise l'association de GPRIN1 à un site de liaison localisé dans la partie N-terminale du domaine C-terminal du récepteur.

Il est important de souligner que, paradoxalement, cette association a été mise en évidence en absence d'agoniste. Or le récepteur 5-HT<sub>6</sub> présente un niveau d'activité constitutive très important vis-à-vis de la voie de signalisation G<sub>s</sub> (Pellissier et al. 2009)(cf intro), c'est à dire qu'il est capable d'adopter en absence d'agoniste une conformation capable d'activer la protéine G<sub>s</sub> et de ce fait de recruter la

protéine GPRIN1. En accord avec cette hypothèse, un traitement des cellules NG108-15 par le SB271046 (1  $\mu$ M, 12 h), un agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, réduit fortement le recrutement de GPRIN1 (Figure 5C). Ce résultat confirme que l'interaction récepteur 5-HT<sub>6</sub>/GPRIN1 est un processus dynamique qui dépend de la conformation du récepteur et de sa capacité à activer la protéine Gas.

### e. GPRIN1 augmente l'activité constitutive Gs du récepteur 5-HT<sub>6</sub>

Dans un deuxième temps, nous nous sommes penchés sur les aspects fonctionnels de l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et GPRIN1 et avons d'abord étudié son impact sur l'activation de la voie Gs par le récepteur. En utilisant un biosenseur bioluminescent issu de la protéine EPAC (sonde CAMYEL) permettant de mesurer au cours du temps les modifications de la concentration intracellulaire d'AMPc par BRET, j'ai démontré que la co-expression de GPRIN1 avec le récepteur 1) augmente significativement l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (+60,5  $\pm$  10,8 %,  $p < 0,0001$ ) ; 2) augmente dans les mêmes proportions la production d'AMPc induite par la stimulation du récepteur par un agoniste, le WAY181187, sans changer l'affinité apparente de ce dernier (5-HT<sub>6</sub> + WAY : EC<sub>50</sub> = 9,1  $\times 10^{-10}$  M vs. 5-

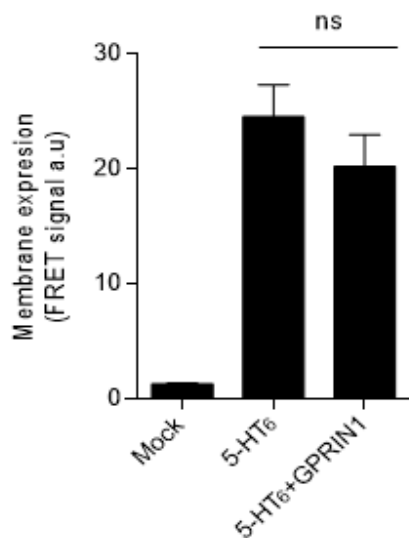


**Figure 24- GPRIN1 augmente l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> à la signalisation Gs / cAMP**

(A) L'histogramme représente la concentration cellulaire en AMPc exprimée en % (signal BRET de la sonde CAMYEL) de la condition 5-HT<sub>6</sub> Vehicle (Veh) et mesurée à partir de cellules transfectées avec le récepteur seul ou avec GPRIN1 puis traitées ou non avec le peptide TAT Ct320-342 (10 $\mu$ M) ou un agoniste du récepteur, le WAY181187 (1  $\mu$ M, 5mn). Les résultats ont été analysés avec une ANOVA suivi d'un test de Tukey, et sont représentés en moyenne  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  et \*\*\* $p < 0.001$  (B) Le panneau de gauche montre la courbe de dose-réponse pour l'activation du récepteur exprimé seul ou avec GPRIN1 par son agoniste le WAY181187. Sur le panneau de droite, la courbe dose-réponse montre l'inhibition de l'activité constitutive par l'agoniste inverse SB258585 lorsque le récepteur est exprimé seul ou coexprimé avec GPRIN1.

HT<sub>6</sub> + GPRIN1 + WAY : EC<sub>50</sub> = 7,4 x 10<sup>-10</sup> M) (figure 24). Ce résultat suggère que GPRIN1 favorise spécifiquement l'activation agoniste-indépendante de la voie Gs par le récepteur 5-HT<sub>6</sub> sans affecter la réponse induite par l'agoniste. En accord avec cette hypothèse, l'expression de GPRIN1 diminue l'affinité apparente du SB271046 pour le récepteur et sa capacité à inhiber l'activité constitutive du récepteur vis-à-vis la voie Gs (5-HT<sub>6</sub> + SB : IC<sub>50</sub>=9,6 x 10<sup>-9</sup> M vs. 5-HT<sub>6</sub> + GPRIN1 + SB : IC<sub>50</sub> = 1,75 x 10<sup>-7</sup> M, figure 24).

Les effets de GPRIN1 sont observés 48h après la transfection, sa co-expression n'affecte pas l'activation agoniste-indépendante de la voie Gs 24h après la transfection, condition expérimentale où, rappelons-le, l'association de GPRIN1 au récepteur est faible. Ceci suggère un rôle critique de cette interaction dans l'activité constitutive du récepteur vis-à-vis de la voie Gs. Corroborant cette hypothèse, le traitement des cellules par le peptide TATCt320-342 abolit totalement les effets de GPRIN1 sur les taux d'AMPC (figure 24). Il est important de souligner que l'expression totale (mesurée en Western blot, figure 21) et membranaire (évaluée par une technique de FRET, figure 25) du récepteur est identique avec ou sans GPRIN1. La potentialisation de l'activité agoniste-indépendante du récepteur induite par GPRIN1 n'est donc pas due à une modulation de l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ou de sa localisation à la membrane plasmique.

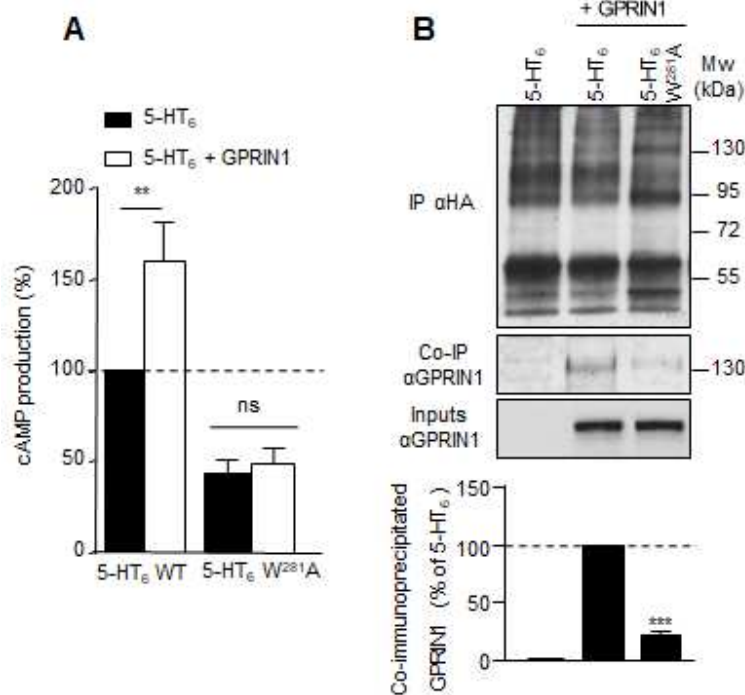


**Figure 25- GPRIN1 n'a pas d'effet sur l'expression membranaire du récepteur 5-HT<sub>6</sub>**

Les cellules NG 108-15 ont été transfectées avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> portant une étiquette SNAP fusionnée à une fluorophore à son extrémité N-terminale (SNAP-5-HT<sub>6</sub>) seul ou avec GPRIN1. L'histogramme représente le signal de FRET émis par le récepteur 5-HT<sub>6</sub> exprimé à la membrane provenant de 5 expériences indépendantes. Les résultats ont été analysés avec un test de Student et sont représentés en moyenne ± SEM.

Afin de confirmer le rôle de GPRIN1 dans l'adoption par le récepteur d'une conformation active, nous avons muté en alanine le résidu W281, situé au cœur de la 6<sup>ème</sup> hélice transmembranaire du récepteur 5-HT<sub>6</sub>. Ce résidu, proche du motif « BBXXB » important pour l'activité constitutive de nombreux RCPG, correspond au W272 du récepteur 5-HT<sub>4</sub>, un récepteur proche du récepteur 5-HT<sub>6</sub> du

point de vue de la séquence et présentant également un niveau d'activité constitutive élevé vis-à-vis de la voie Gs. Notre équipe a démontré en 2009 que le résidu W272 joue un rôle crucial dans le changement de conformation qui permet au récepteur 5-HT<sub>4</sub> d'activer la protéine G de façon agoniste indépendante. En effet, la mutation de ce résidu en alanine (5-HT<sub>4</sub>W<sup>272</sup>A) abolit l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>4</sub> (Pellissier et al. 2009). De la même façon, la mutation en alanine du résidu correspondant dans la séquence du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (5-HT<sub>6</sub>W<sup>281</sup>A), diminue l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sans toutefois l'éteindre totalement, et abolit les effets stimulateurs de GPRIN1 sur cette activité agoniste-indépendante (figure 26). Ces résultats montrent une absence d'effet de l'expression de GPRIN1 sur un récepteur 5-HT<sub>6</sub> pratiquement dépourvu d'activité constitutive et confirment donc que l'interaction de GRPIN1 avec le récepteur affecte spécifiquement son activité constitutive.



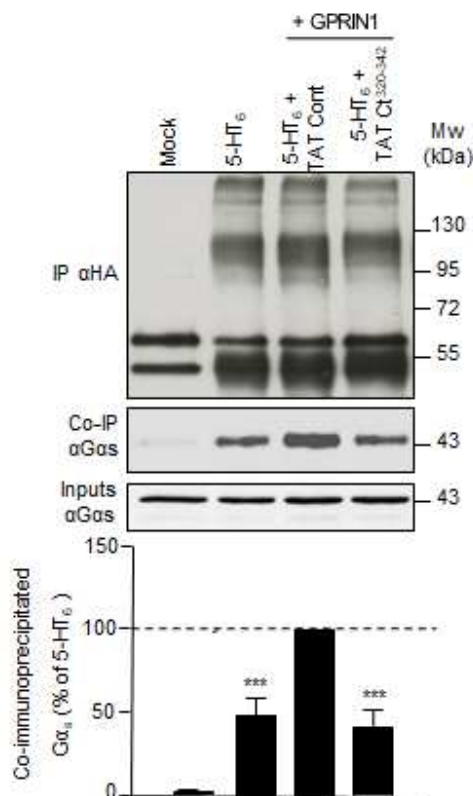
**Figure 26- La mutation du résidu W281 abolit les effets de GPRIN1 sur l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.**

(A) L'histogramme représente la concentration cellulaire en AMPc, exprimée en % de la condition 5-HT<sub>6</sub> sauvage (WT), est mesuré à partir de cellules NG 108-15 transfectées avec des plasmides codant pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> WT ou W<sup>281</sup>A, seul ou avec GPRIN1. (B) Co-immunoprécipitation (Co-IP) de GPRIN1 avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> WT ou W<sup>281</sup>A, exprimés dans les NG108-15, 48h après la transfection. Le récepteur a été immunoprécipité comme décrit dans la figure 3. Un immunoblot représentatif est montré dans le panneau supérieur, et l'histogramme en dessous représente les résultats de l'analyse densitométrique de trois expériences indépendantes. Les résultats ont été analysés avec une ANOVA suivi d'un test de Tukey, et sont représentés en moyenne ± SEM. \**P* < 0.05 \*\**P* < 0.01 et \*\*\**p* < 0.001.

## f. L'activité Gs du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et GPRIN1 : un dialogue bidirectionnel ?

Pour mieux comprendre le mécanisme par lequel GPRIN1 favorise l'activation constitutive de la voie Gs par le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, nous avons examiné l'impact de son expression sur le recrutement de la protéine Gs par le récepteur.

La co-immunoprécipitation de Gs avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est significativement augmentée en présence de GPRIN1 (figure 27). Cet effet est aboli par le traitement des cellules avec le peptide TATCt320-342 (figure 27). Il semblerait donc que GPRIN1 favorise une conformation du récepteur qui augmente son interaction avec la protéine G $\alpha$ s se traduisant par une augmentation de son activité constitutive. Par ailleurs, la mutation en alanine du résidu W281 décrite précédemment, diminue significativement l'interaction du récepteur avec GPRIN1. Il semblerait donc que la conformation active du récepteur favorise son interaction avec GPRIN1 qui réciproquement augmente à la fois l'interaction



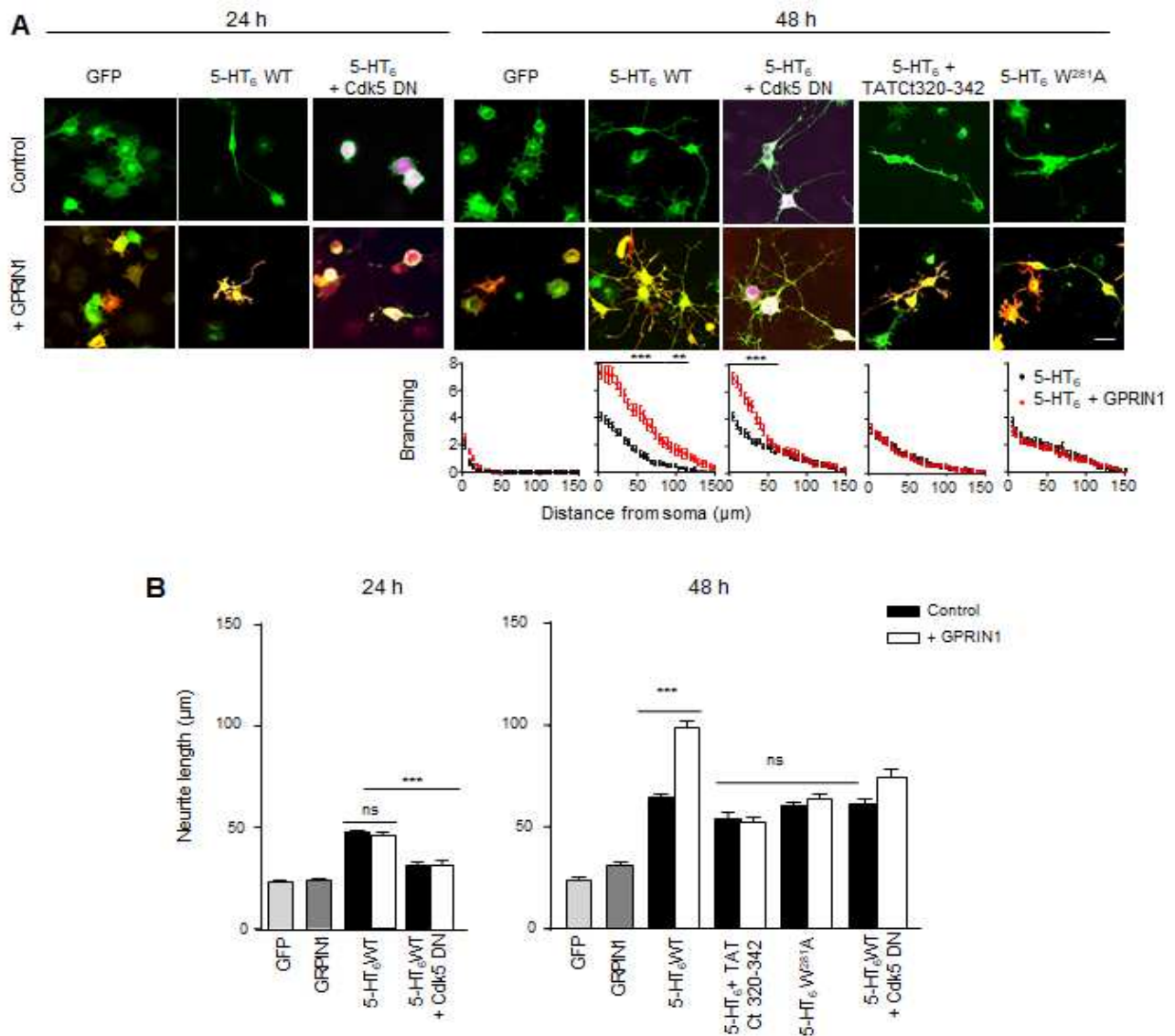
**Figure 27- GPRIN1 augmente l'interaction du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec la protéine Gs.**

Les cellules NG108-15 ont été transfectées avec des plasmides codant pour le récepteur HA-5-HT<sub>6</sub> sauvage, seul ou en combinaison avec GPRIN1, et traitées avec le TAT peptide Ct320-342 ou avec un scrambled TAT peptide comme contrôle (1μM, 12h). Les cellules ont été lysées 48h après la transfection. Le récepteur a été immunoprécipité en utilisant des billes d'agarose conjuguées à un anticorps anti-HA. La co-immunoprécipitation de G $\alpha$ s endogène (Co-IP) a été révélée en utilisant un anticorps anti-G $\alpha$ s ( $\alpha$ G $\alpha$ s) et l'immunoprécipitation (IP) du récepteur HA-5-HT<sub>6</sub> avec un anticorps anti HA ( $\alpha$ HA). Un immunoblot représentatif est montré dans le panneau supérieur, et l'histogramme en dessous représente les résultats de l'analyse densitométrique de trois expériences indépendantes. Les résultats ont été analysés avec une ANOVA suivie d'un test de Tukey et sont représentés en moyenne  $\pm$  SEM. \* $P$  < 0.05 \*\* $P$  < 0.01 et \*\*\* $p$  < 0.001.

du récepteur avec la protéine Gs et l'activation agoniste-indépendante de Gs par le récepteur. Ceci pourrait illustrer un dialogue bidirectionnel entre l'activité Gs agoniste-indépendante du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et GPRIN1.

### g. L'interaction de GPRIN1 avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> favorise l'élongation et la ramification de l'arborisation dendritique à 48h dans les cellules NG 108-15

La protéine GPRIN1 est également connue pour son rôle dans la pousse neuritique. Nous avons donc dans un second temps, étudié le rôle du complexe récepteur 5-HT<sub>6</sub>-GPRIN1 dans la différenciation neuronale. Nous avons tout d'abord examiné la morphologie des cellules NG 108-15 exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> en présence ou en absence de GPRIN1. 24h après la transfection, l'expression du récepteur induit une pousse neuritique qui est identique en présence ou en absence de GPRIN1, corroborant les résultats obtenus précédemment démontrant une faible association de GPRIN1 au récepteur dans ces conditions expérimentales. 48h après la transfection, la co-expression de GPRIN1 avec le récepteur induit à la fois une augmentation significative de la longueur des neurites et une complexification de l'arborisation dendritique (augmentation du nombre de branches mise en évidence grâce à une analyse de Scholl), comparé aux cellules exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> seul (figure 28). Ces effets de GPRIN1 sur la pousse neuritique et la complexité de l'arbre dendritique sont supprimés par un prétraitement des cellules par le peptide TATCT320-342, démontrant l'importance de l'interaction physique entre GPRIN1 et le récepteur dans ce processus de différenciation neuronale. De même, l'expression de GPRIN1 n'a pas d'effet significatif sur l'arborisation dendritique des cellules exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub>W<sup>281</sup>A (figure 28).



**Figure 28- L'interaction de GPRIN1 avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> augmente la pousse et la densification de l'arborisation dendritique à 48h**

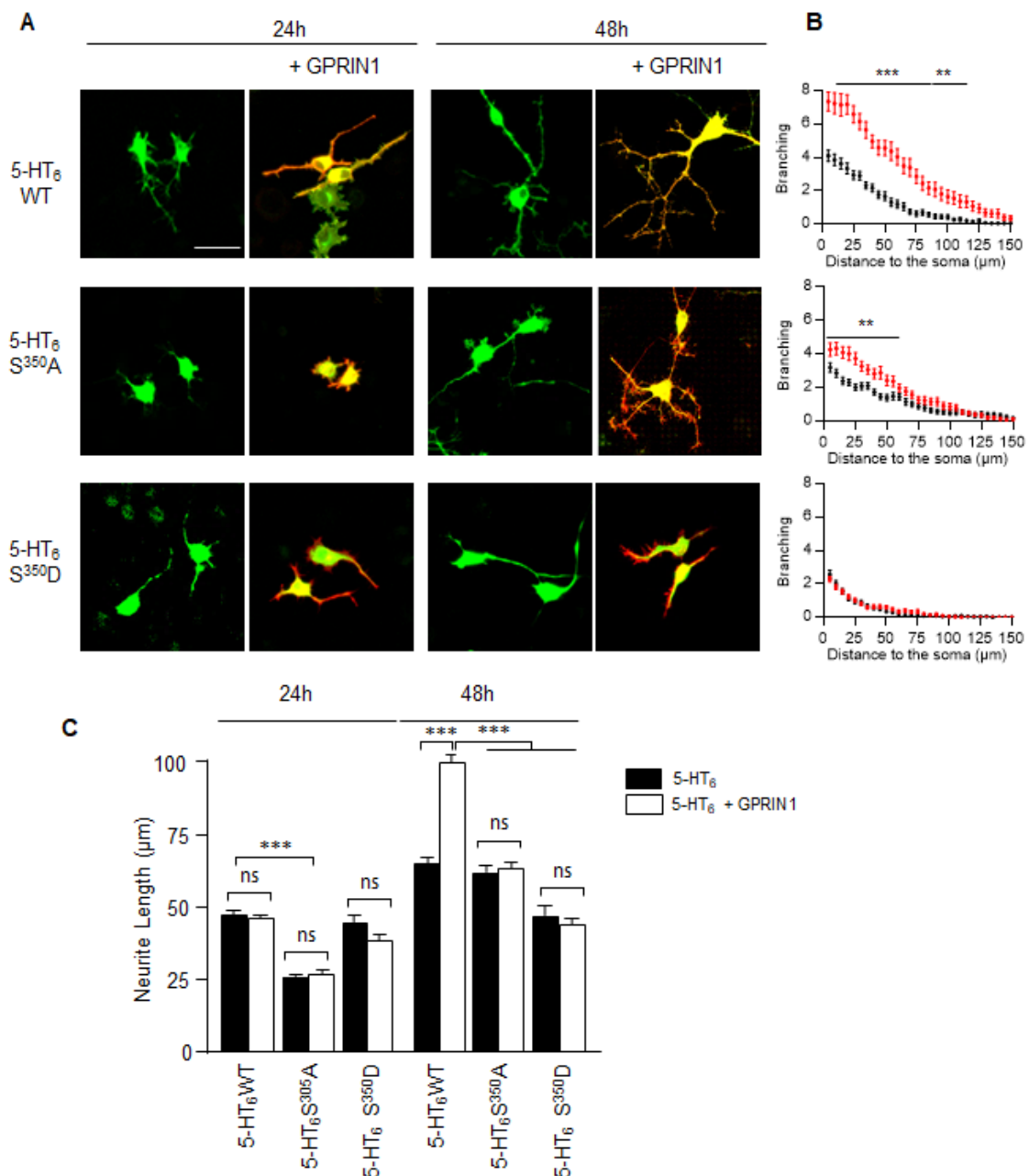
Les cellules NG 108-15 ont été transfectées avec des plasmides codant pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, sauvage (5-HT<sub>6</sub>) ou muté (5-HT<sub>6</sub>W<sup>281A</sup>), seul ou en combinaison avec GPRIN1 et/ou un mutant dominant négatif de Cdk5 étiqueté mcherry (Cdk5 DN). Lorsque cela est indiqué, les cellules transfectées avec le récepteur de sauvage ont été traitées avec le TAT peptide Ct320-342 (1μM, 12h). Les cellules ont été fixées 24h ou 48h après la transfection. GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont été marqués par immunocytochimie avec un anticorps anti GPRIN1 et anti HA respectivement. Le Cdk5 dominant négatif apparaît en violet sur la figure. (A) Les images montrent des champs représentatifs de trois expériences indépendantes menées sur des cultures différentes. (B) Les graphiques représentent le « branching », un indice de ramification (correspondant au nombre d'intersections entre les dendrites et des sphères concentriques successives s'éloignant du soma), en fonction de la distance au soma, en μm à 48h (n=45 cellules/condition). (C) L'histogramme montre les résultats de la quantification de la longueur des neurites en μm à 24h et 48h (n≥300 neurites/condition). Les résultats ont été analysés avec une ANOVA suivie d'un test de Tukey, et sont représentés en moyenne ± SEM. \*P < 0.05 \*\*P < 0.01 et \*\*\*p < 0.001. Echelle 50 μm

## h. Rôle de la dynamique d'association de Cdk5 et GPRIN1 avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la différenciation neuronale.

À l'image de ses effets sur l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, GPRIN1 ne semble jouer un rôle dans la différenciation des cellules NG108-15 que 48h après la transfection. Dans ce contexte, nous nous sommes posé la question du rôle de la dynamique temporelle d'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, d'une part et Cdk5 ou GPRIN1 d'autre part, sur la différenciation neuronale. Pour répondre à cette question, nous avons surexprimé un mutant dominant négatif de Cdk5 (Cdk5 DN) qui inhibe l'activité de la protéine Cdk5 endogène (Duhr et al. 2014), puis étudié son impact sur la différenciation des cellules guidée par le récepteur, avec ou sans GPRIN1. 24h après la transfection, l'expression du mutant Cdk5 DN inhibe l'initiation de la pousse neuritique induite par l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, confirmant les résultats précédemment obtenus par l'équipe, de la même façon en absence ou en présence de GPRIN1 (figure 29). 48h après la transfection, on observe que les cellules qui expriment le mutant Cdk5DN et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont émis des neurites, dont la longueur et la ramification sont significativement augmentées en présence de GPRIN1 (figure 29). Il semble donc que l'activité de Cdk5 permette de catalyser spécifiquement l'initiation de la pousse neuritique et que cette activité n'est pas indispensable aux étapes suivantes du processus de différenciation neuronale, que ce soit l'élongation ou la ramification de l'arborisation dendritique. De ce fait, les effets de GPRIN1 sur la ramification de l'arbre dendritique sont aussi indépendants de l'activité Cdk5.

Comme je l'ai évoqué dans l'introduction, la phosphorylation du récepteur sur la sérine 350 par Cdk5 déclenche l'initiation de la pousse neuritique *via* le recrutement de Cdc42. Un mutant alanine pour ce site de phosphorylation (5-HT<sub>6</sub>S<sup>350</sup>A) n'initie pas de pousse neuritique dans les cellules NG 108-15 tandis qu'un mutant qui mime une phosphorylation constitutive (5-HT<sub>6</sub>S<sup>350</sup>D) initie une pousse neuritique à 24h, semblable à celle observée chez le récepteur sauvage (Duhr et al. 2014). Le mutant 5-HT<sub>6</sub>S<sup>350</sup>A conserve une activité constitutive vis-à-vis la voie Gs similaire à celle du récepteur sauvage, tandis que la mutation en aspartate abolit l'activité Gs du récepteur (Duhr et al. 2014).





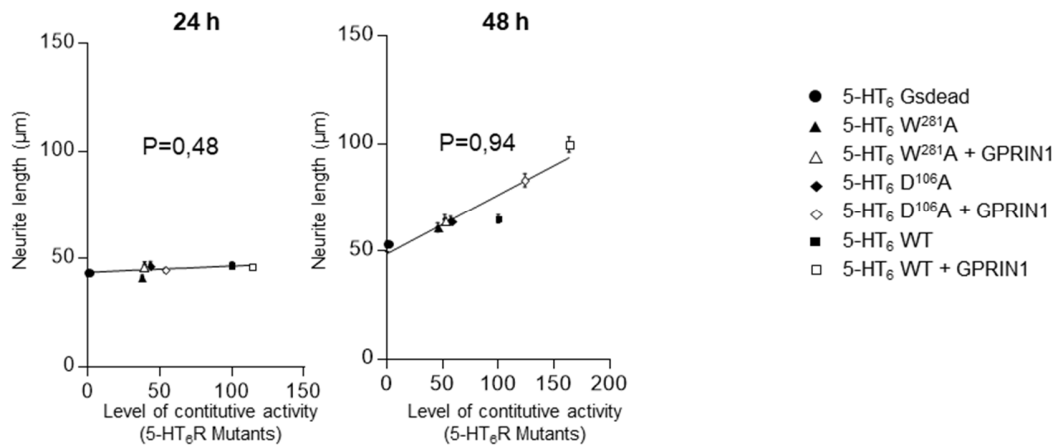
**Figure 29- La phosphorylation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> à la sérine 350 inhibe la pousse et la densification de l'arborisation dendritique à 48h.** Les cellules NG 108-15 ont été transfectées avec des plasmides codant pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> taggé HA, sauvage (HA-5-HT<sub>6</sub>) ou muté au niveau de la sérine 350 (5-HT<sub>6</sub><sup>S350A</sup> et 5-HT<sub>6</sub><sup>S350D</sup>), seul ou en combinaison avec GPRIN1. Les cellules ont été fixées 24h ou 48h après la transfection. GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont été marqués par immunocytochimie avec un anticorps anti GPRIN1 et anti HA respectivement. **(A)** Les images montrent des champs représentatifs de trois expériences indépendantes menées sur des cultures différentes. **(B)** Les graphiques représentent le « branching », un indice de ramification (correspondant au nombre d'intersections entre les dendrites et des sphères concentriques successives s'éloignant du soma), en fonction de la distance au soma, en μm à 48h (n=45 cellules/condition). **(C)** L'histogramme montre les résultats de la quantification de la longueur des neurites en μm à 24h et 48h (n≥300 neurites/condition). Les résultats ont été analysés avec une ANOVA suivie d'un test du Tukey, et sont représentés en moyenne ± SEM. \*P < 0.05 \*\*P < 0.01 et \*\*\*p<0.001. Echelle 50 μm.

Nous avons démontré plus haut que cette phosphorylation semble moduler l'interaction du récepteur avec GPRIN1. Nous avons donc examiné l'impact de cette phosphorylation sur le passage d'une étape à l'autre de la différenciation neuronale, en étudiant l'effet de l'expression des récepteurs mutés au niveau du site de phosphorylation sur la morphologie des cellules NG108-15, exprimant GPRIN1 ou non, 24h et 48h après la transfection. Confirmant les données précédentes de l'équipe (Duhr et al. 2014), 24h après la transfection, le mutant 5-HT<sub>6</sub>S<sup>350D</sup> se comporte de façon similaire au récepteur sauvage, tandis que le mutant 5-HT<sub>6</sub>S<sup>350A</sup> n'induit pas de pousse neuritique (figure 29). L'expression de GPRIN1 n'induit aucun changement sur la longueur des neurites, quel que soit le récepteur exprimé. 48h après la transfection, on observe que les cellules co-exprimant le mutant 5-HT<sub>6</sub>S<sup>350A</sup> et GPRIN1 ont émis des neurites alors que les cellules exprimant le mutant 5-HT<sub>6</sub>S<sup>350D</sup> n'ont pas évolué entre 24h et 48h (figure 29). On observe également que l'arborisation des cellules exprimant le mutant 5-HT<sub>6</sub>S<sup>350D</sup> et GPRIN1 ne se complexifie pas entre 24h et 48h contrairement à ce qui est observé pour le récepteur sauvage. En revanche, les cellules exprimant le mutant 5-HT<sub>6</sub>S<sup>350A</sup> commencent à développer une arborisation dendritique dont la complexité est significativement augmentée en présence de GPRIN1 (figure 29).

Ces résultats confirment que la phosphorylation du récepteur par Cdk5 permet de déclencher l'initiation rapide de la pousse neuritique, observable en 24h et indépendante de GPRIN1. Ils confirment également que la phosphorylation du récepteur par Cdk5 n'est pas nécessaire pour le déclenchement tardif (au-delà de 24h après la transfection) de la pousse neuritique. Enfin, ils indiquent que le maintien d'un état constitutivement phosphorylé du récepteur inhibe l'extension et la complexification des dendrites entre 24h et 48h après la transfection, et abolit les effets morphologiques de GPRIN1.

### i. La pousse neuritique dépend de l'activation agoniste-indépendante de la voie G<sub>s</sub> par le récepteur 5-HT<sub>6</sub>

Il est intéressant de noter que les effets de GPRIN1 sur l'activation agoniste-indépendante de G<sub>s</sub> et la différenciation neuronale coïncident dans le temps. Afin de déterminer si ces deux processus sont réellement corrélés, nous avons exprimé différents mutants du récepteur possédant des niveaux

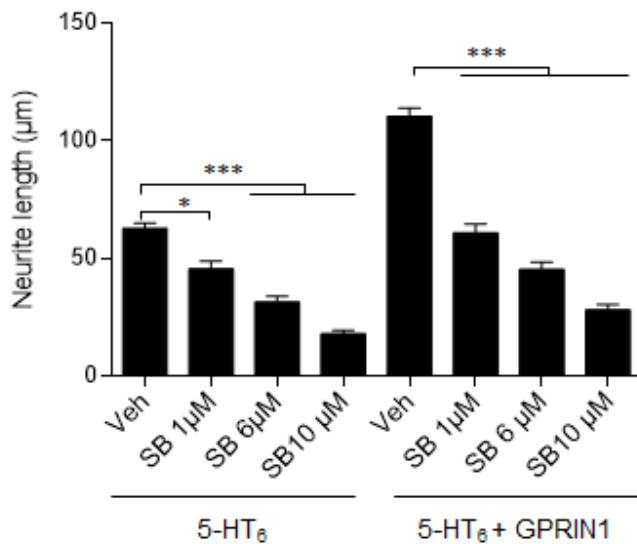


**Figure 30- La pousse neuritique dépend de l'activité constitutive Gs du récepteur 5-HT<sub>6</sub> à 48h**

Les cellules NG 108-15 ont été transfectées avec des plasmides codant pour différents mutants du récepteur possédant des niveaux d'activité constitutive différents, avec et sans GPRIN1. Pour chacun de ces mutants, nous avons évalué le niveau de production constitutive d'AMPC et la longueur des neurites, à 24h et 48h, avec ou sans GPRIN1. Les graphiques représentent la corrélation entre la production d'AMPC induite par l'activité constitutive du récepteur, en fonction de la longueur des neurites, pour chaque condition de transfection, à 24h ou à 48h. Les résultats sont représentés en moyenne  $\pm$  SEM, P représente le coefficient de Pearson.

d'activité constitutive différents, avec et sans GPRIN1, dans les cellules NG 108-15. Pour chacun de ces mutants, nous avons évalué le niveau de production d'AMPC induite par l'expression du récepteur (activité constitutive) en absence ou en présence de GPRIN1 et la longueur des neurites, 24h et 48h après la transfection avec ou sans GPRIN1. Après 24h d'expression, la longueur des neurites est similaire quel que soit le niveau d'activité constitutive du mutant considéré (figure 30). Ce résultat indique qu'à ce stade, la pousse neuritique est indépendante du niveau d'activité constitutive (vis-à-vis de la voie Gs) du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, confirmant les observations réalisées précédemment par l'équipe (Duhr et al. 2014). En revanche, après 48h d'expression, on observe une corrélation entre le niveau d'activité constitutive du récepteur et la longueur des neurites (coefficient de Pearson = 0,94, figure 30). Il semble donc qu'entre 24h et 48h, l'élongation des neurites devienne dépendante de l'activation constitutive de la voie Gs par le récepteur. Pour confirmer le rôle de cette activité constitutive, nous avons étudié l'impact d'un traitement des cellules par un agoniste inverse du récepteur sur la pousse neuritique, en absence et en présence de GPRIN1, 48h après la transfection. Nous avons appliqué différentes concentrations de SB271046 sur les cellules NG108-15 pendant 12 h, avant de les fixer 48h après la transfection. Le

SB271046, réduit de façon concentration-dépendante la longueur des neurites dans les cellules exprimant le récepteur seul et les cellules coexprimant le récepteur et GPRIN1 (figure 31).



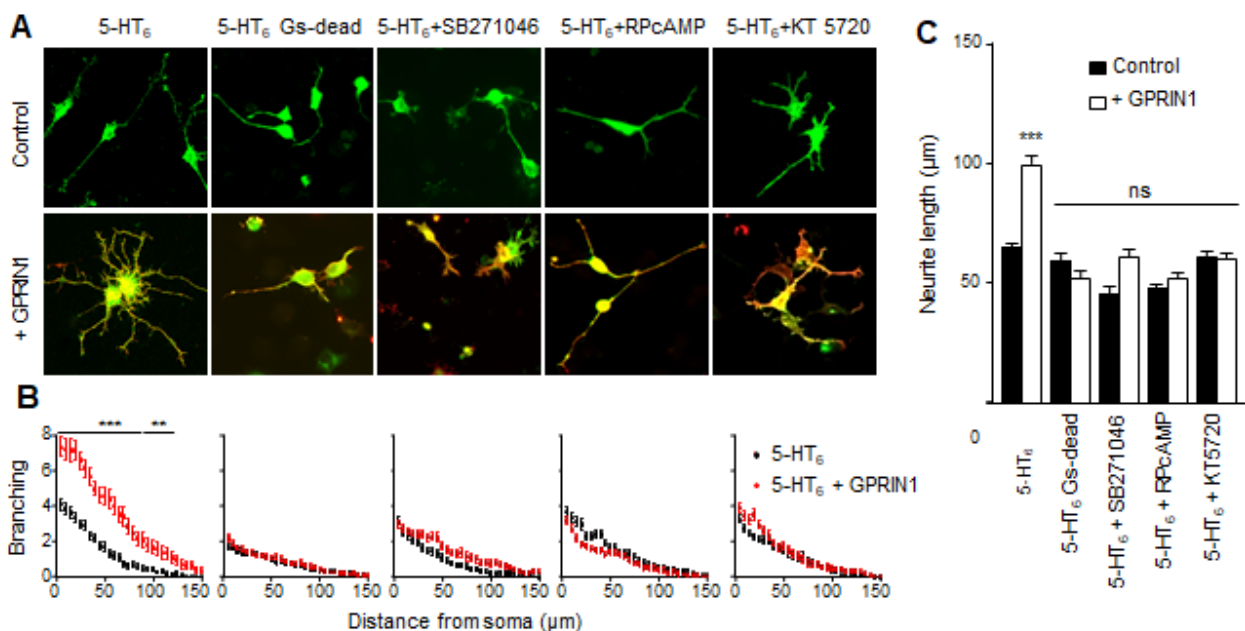
**Figure 31 - le SB271046 inhibe les effets de GPRIN1 sur la pousse neuritique de façon dose dépendante** Les cellules NG 108-15 ont été transfectées avec des plasmies codant pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> sauvage seul ou en combinaison avec GPRIN1. Les cellules ont été traitées 24h après la transfection avec différentes doses d'agoniste inverse, le SB271046 (SB) ou un véhicule (Veh), et fixées 48h après la transfection. GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont été marqués par immunocytochimie avec un anticorps anti GPRIN1 et anti HA respectivement. Les histogrammes montrent les résultats de la quantification de la longueur des neurites en µm à 48h, issus de 3 expériences différentes (n≥300 neurites). Les résultats ont été analysés avec une ANOVA suivie d'un test de Tukey et sont représentés en moyenne ± SEM. \**P* < 0.05 \*\**P* < 0.01 et \*\*\**p*<0.001.

## j. La complexification de l'arborisation dendritique induite par GPRIN1 est dépendante de la PKA dans les cellules NG108-15

Etant donné la forte corrélation entre l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> vis-à-vis de la voie Gs et les effets de GPRIN1 sur la pousse neuritique mesurés 48h après la transfection, nous avons voulu déterminer le rôle de cette voie de signalisation dans la maturation de l'arbre dendritique induite par l'expression de GPRIN1 en utilisant différentes stratégies : expression d'un récepteur 5-HT<sub>6</sub> Gs-dead, traitement des cellules par le RpAMP (analogue non hydrolysable de l'AMPc), ou par le KT5720 (inhibiteur de la PKA). Nous avons démontré que les effets morphologiques de GPRIN1, tant sur la longueur des neurites que la ramification de l'arbre dendritique, sont abolis dans les cellules exprimant récepteur 5-HT<sub>6</sub> Gs-dead ou traitées par le RpAMP ou le KT5720 (Figure 32). Ces résultats suggèrent que GPRIN1, en interagissant avec le récepteur, induit une conformation active de ce dernier capable d'activer la protéine Gs de façon agoniste-indépendante ; l'augmentation de l'AMPc qui en découle

permet le recrutement de la PKA, qui promeut l'élongation et la complexification de l'arborisation dendritique.

Dans ce modèle, il semblerait donc que la succession des étapes de la différenciation neuronale soit contrôlée par l'action séquentielle de voies de signalisations distinctes, constitutivement activées par le récepteur 5-HT<sub>6</sub>. L'activité de Cdk5 permet de déclencher l'initiation rapide (en 24h) de la pousse neuritique. L'activité constitutive Gs du récepteur, augmentée par GPRIN1, induit également l'établissement d'un processus de différenciation neuronale mais dont l'instauration est plus lente et



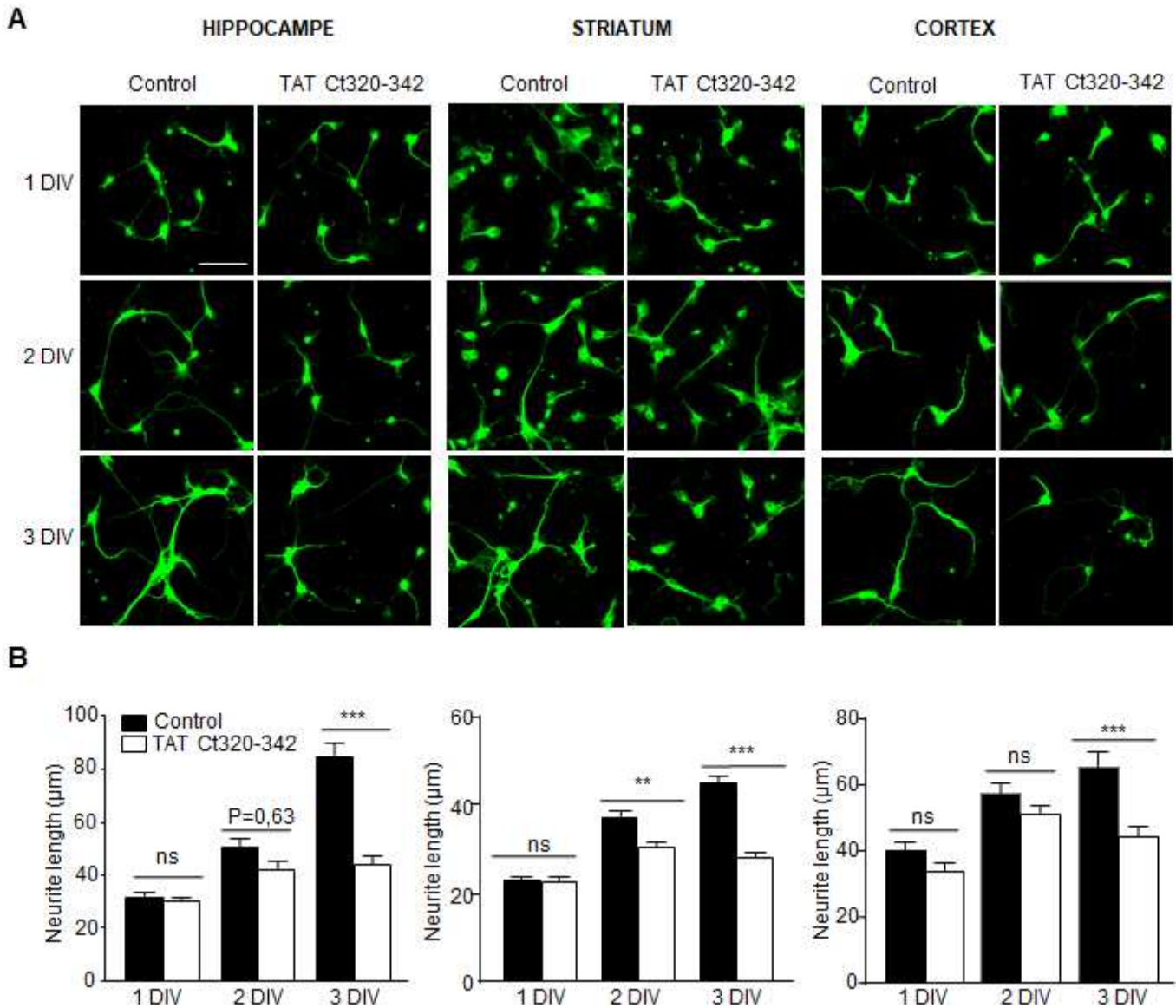
**Figure 32 - La complexification de l'arborisation dendritique induite par GPRIN1 à 48h est dépendant de la PKA dans les cellules NG 108-15**

Les cellules NG 108-15 ont été transfectées avec des plasmides codant pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub> sauvage (5-HT<sub>6</sub>) ou Gsdead seul ou en combinaison avec GPRIN1 et fixées 48h après la transfection. Lorsque cela est indiqué, les cellules transfectées avec le récepteur de sauvage ont été traitées pendant 12h avec du SB271046 (1µM) ou du cAMPS-RP (25µM) ou du KT 5720 (inhibiteur de la PKA, 2µM). GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> ont été marqués par immunocytochimie avec un anticorps anti GPRIN1 et anti HA respectivement. **(A)** Les images montrent des champs représentatifs de trois expériences indépendantes menées sur des cultures différentes. **(B)** Les graphiques représentent le « branching », un indice de ramification (correspondant au nombre d'intersections entre les dendrites et des sphères concentriques successives s'éloignant du soma), en fonction de la distance au soma, en µm à 48h (n=45 cellules/condition). **(C)** L'histogramme montre les résultats de la quantification de la longueur des neurites en µm à 48h (n≥300 neurites/condition). Les résultats ont été analysés avec une ANOVA suivie d'un test de Tukey et sont représentés en moyenne ± SEM. \*P < 0.05 \*\*P < 0.01 et \*\*\*p<0.001. Echelle 50 µm.

n'est pas encore visible en 24h, mais qui est indispensable à l'élongation et à la ramification de l'arborisation dendritique.

## k. L'interaction de GPRIN1 avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> favorise l'extension et la ramification des dendrites dans les neurones en culture primaire

Les résultats décrits jusqu'à présent démontrent, dans un cellulaire modèle utilisé classiquement pour étudier les mécanismes de la différenciation neuronale (les cellules NG108-15) que la morphogenèse de l'arbre dendritique sous le contrôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dépend de son association séquentielle avec deux partenaires protéiques, Cdk5 et GPRIN1, qui permettent l'engagement de deux voies de signalisation distinctes, la voie Cdk5 et la voie Gs/AMPC/PKA. Les études réalisées précédemment par l'équipe avaient permis de démontrer que Cdk5 était de la même façon impliquée dans les étapes précoces de la croissance neuritique induite par le récepteur natif dans des neurones d'hippocampe en culture primaire (Duhr et al. 2014). Nous avons donc étudié l'impact du recrutement de GPRIN1 par le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la différenciation de neurones en culture primaire. Pour cela, nous avons dans un premier temps exposé les neurones de différentes régions cérébrales (striatum, cortex cérébral, hippocampe) au peptide TATCt320-342 à différents temps après l'ensemencement des neurones (i.e. à différents stades de la croissance neuritique et de la différenciation neuronale). Le traitement des neurones avec le peptide TAT Ct320-342 5 h après l'ensemencement n'a aucun effet sur l'émission de neurites observée à 1 DIV, indiquant que l'interaction entre le récepteur et GPRIN1 n'est pas nécessaire pour les stades 1 et 2 de la différenciation des neurones en culture décrits par Dotti et al (Dotti, Sullivan, et Banker 1988) (figure 33). L'exposition des neurones au peptide 2 jours après l'ensemencement (2 DIV), diminue significativement la longueur des neurites par rapport à la condition contrôle, dans les neurones de striatum seulement (figure 33,  $-6,84 \pm 1,22 \mu\text{m}$ ,  $n=430$ ,  $p < 0,0001$  vs. neurones traités par un peptide TAT scrambled). À 3 DIV, on observe une diminution significative de la longueur des neurites des neurones traités avec le peptide TATCt320-342, dans les neurones issus des trois régions cérébrales étudiée (figure 33). L'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et GPRIN1 semble donc devenir fonctionnellement importante pour l'élongation des neurites entre le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> jour de



**Figure 33 - L'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et GRP1N1 est nécessaire pour l'élongation des neurites dans les cultures primaires neuronales.**

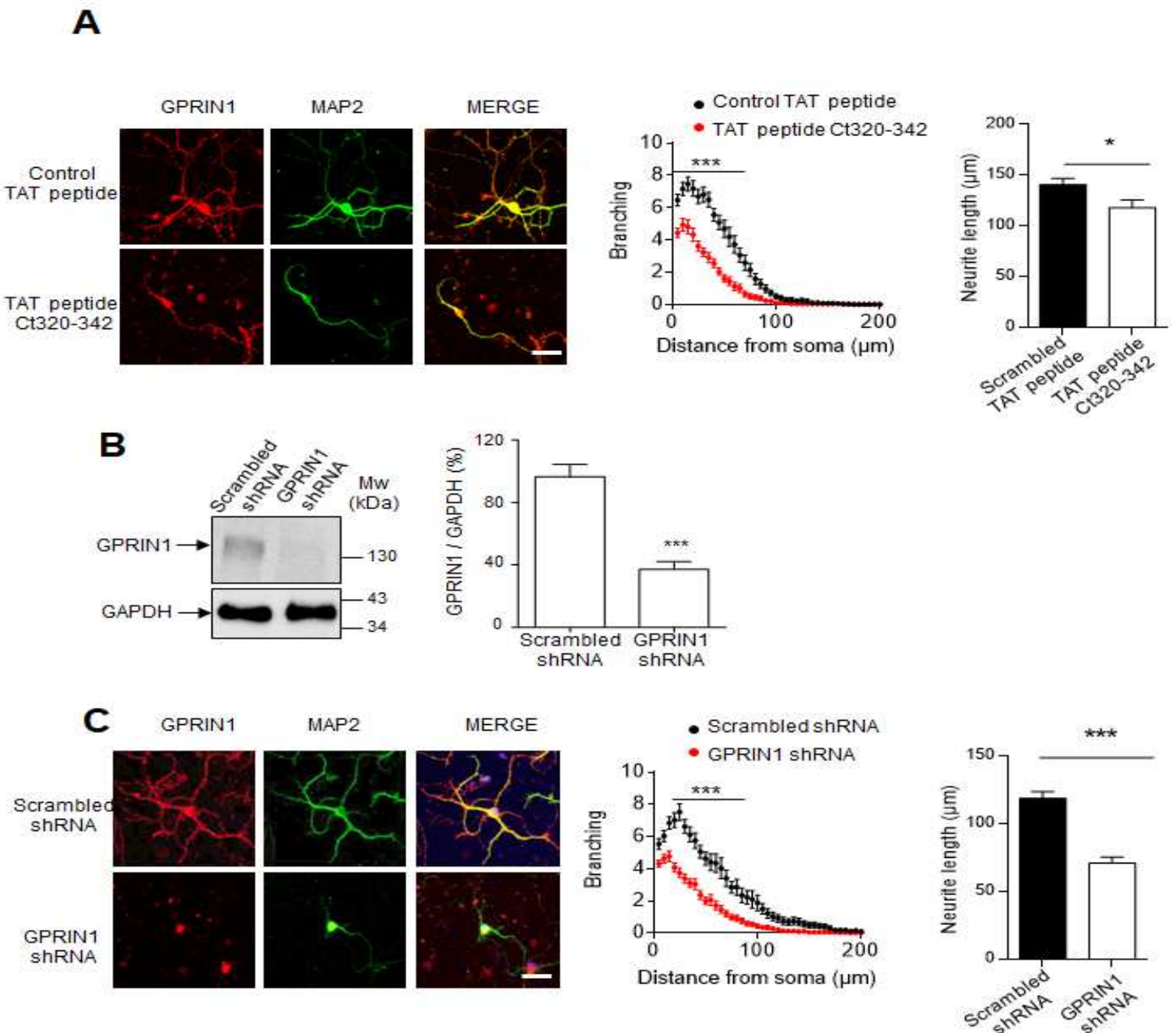
Les neurones en culture issus de striatum, cortex et hippocampe, ont été traités chaque jour soit avec le TAT peptide Ct320-342 qui rompt l'interaction avec GPR1N1 soit avec un TAT peptide « scrambled » comme contrôle. Les lamelles de neurones ont été fixées 1 jour (1DIV), 2 jours (2DIV) ou 3 jours (3DIV) après la mise en culture. Les prolongements ont été marqués par immunocytochimie avec un anticorps primaire anti MAP2 (en vert sur l'image) et leur longueur a été quantifiée avec le logiciel image J. **(A)** Les images montrent des champs représentatifs de trois expériences indépendantes menées sur des cultures différentes. **(B)** Les histogrammes montrent les résultats de la quantification de la longueur des neurites à 1, 2 et 3 DIV pour chacun des types neuronaux testés (n≥120 neurites). Les résultats ont été analysés avec une ANOVA suivie d'un test de Tukey et sont représentés en moyenne ± SEM. \*P < 0.05 \*\*P < 0.01 et \*\*\*P < 0.001. Echelle 50 µm.

culture, correspondant au **stade 3** de la différenciation des neurones *in vitro* décrite par Dotti *et al.* (Dotti, Sullivan, et Banker 1988). Ces données corroborent les résultats obtenus dans les cellules NG108-15 et précisent le stade de différenciation à partir duquel la voie de signalisation dépendante du complexe 5-HT<sub>6</sub>-GPRIN1 entre en action pour promouvoir l'élongation des neurites dans les neurones en culture.

Dans les cellules NG 108-15, nous avons pu mettre en évidence un effet de GPRIN1 sur la ramification de l'arborisation dendritique. Dans les neurones en culture, **l'étape 4** de la différenciation neuronale correspond à la complexification de l'arborisation dendritique, elle débute à 4 DIV et dure 10 jours. Nous avons choisi d'étudier l'implication de l'interaction entre GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la complexification de l'arborisation dendritique dans les neurones de striatum en particulier pour deux raisons : d'une part, il s'agit de la structure dans laquelle le récepteur est le plus exprimé (Gérard *et al.* 1996). D'autre part, ces neurones développent une arborisation plus dense et complexe que les neurones d'hippocampe ou de cortex en culture, facilitant l'étude de l'arbre dendritique.

Nous avons traité les neurones de striatum avec le peptide TATCt320-342, à 4, 7, 9 et 11 DIV avant de les fixer à 13 DIV. On observe que le traitement avec le peptide diminue significativement la complexité et la longueur de l'arborisation dendritique, comparée à des cultures traitées par un peptide TAT scrambled (figure 34A). Afin de vérifier que cet effet est imputable à GPRIN1 et non à un autre partenaire qui interagirait avec le même site du récepteur, nous avons généré un virus codant pour un shRNA ciblant GPRIN1, afin d'éteindre son expression dans les neurones. Nous avons tout d'abord vérifié l'efficacité du shRNA. Sur trois cultures différentes, l'infection des cellules avec le shRNA inhibe fortement l'expression de la protéine GPRIN1 (figure 34B). Nous avons donc ensuite étudié les effets de l'inhibition de l'expression de GPRIN1 sur la différenciation des neurones de striatum à 13 DIV. L'extinction de l'expression de GPRIN1 réduit la complexité et la longueur de l'arborisation dendritique de façon similaire à ce qui est observé dans les cultures traitées par le peptide TATCt320-342 (figure 34C). Il est important de souligner que le temps nécessaire à l'expression du shRNA suite à l'infection, ainsi que le « *turn-over* » de la protéine GPRIN1 ne nous a pas permis de tester les effets de son extinction aux DIV 1, 2 et 3.





**Figure 34- L'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et GRPIN1 est nécessaire pour l'élongation des neurites dans les cultures primaires neuronales.** (A) Les neurones en culture issus de striatum, ont été traités avec le TAT peptide Ct320-342 ou un TAT peptide contrôle, à 4, 7, 9 et 11 DIV avant d'être fixés à 13 DIV). Les neurones fixés ont été marqués par immunocytochimie avec un anticorps primaire anti MAP2 (en vert sur l'image) et un anticorps primaire anti GPRIN1 (en rouge sur l'image). La ramification (n=45 neurones) a été quantifiée via l'analyse de sholl, avec le logiciel SynD et la longueur des neurites avec image J (n≥300 neurites). Les images montrent des champs représentatifs de trois expériences indépendantes menées sur des cultures différentes. Les neurones de striatum en culture ont été infectés à 3 DIV avec un virus contenant soit un shRNA dirigé contre GPRIN1, soit un shRNA « scrambled » comme contrôle. Les neurones ont été fixés ou lysés à 13 DIV. (B) L'extinction de l'expression de GPRIN1 suite à l'infection a été quantifiée par western blot. Les neurones fixés ont été marqués par comme précédemment. (C) Les ramification des neurones (n=45 neurones) et longueur des neurites (n≥300 neurites) ont été quantifiées. Les images montrent des champs représentatifs de trois expériences indépendantes menées sur des cultures différentes. Les résultats sont représentés en moyenne  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  et \*\*\* $p < 0.001$  vs. condition contrôle. Echelle 50  $\mu\text{m}$ .

Collectivement, ces résultats indiquent que l'expression de GPRIN1 et de ce fait son interaction avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> sont nécessaires au bon déroulement des stades 3 et 4 de la différenciation des neurones de striatum en culture, correspondant à l'élongation et à la complexification de l'arborisation dendritique.

## Chapitre II : L'inhibition pharmacologique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> restaure les symptômes primaires dans un modèle murin d'autisme.

Les troubles du comportement social figurent parmi les symptômes les plus handicapants des TSA. À l'heure actuelle il n'existe aucun traitement pharmacologique en clinique permettant d'améliorer ces troubles. Une théorie explicative très étudiée pour expliquer ces troubles est celle du déficit de récompense sociale. Selon cette théorie, un dysfonctionnement précoce du système de récompense sociale et l'altération de la saillance des stimuli sociaux qui en découle, pourrait induire des anomalies du développement sévère qui pourraient expliquerait le phénotype dans sa globalité.

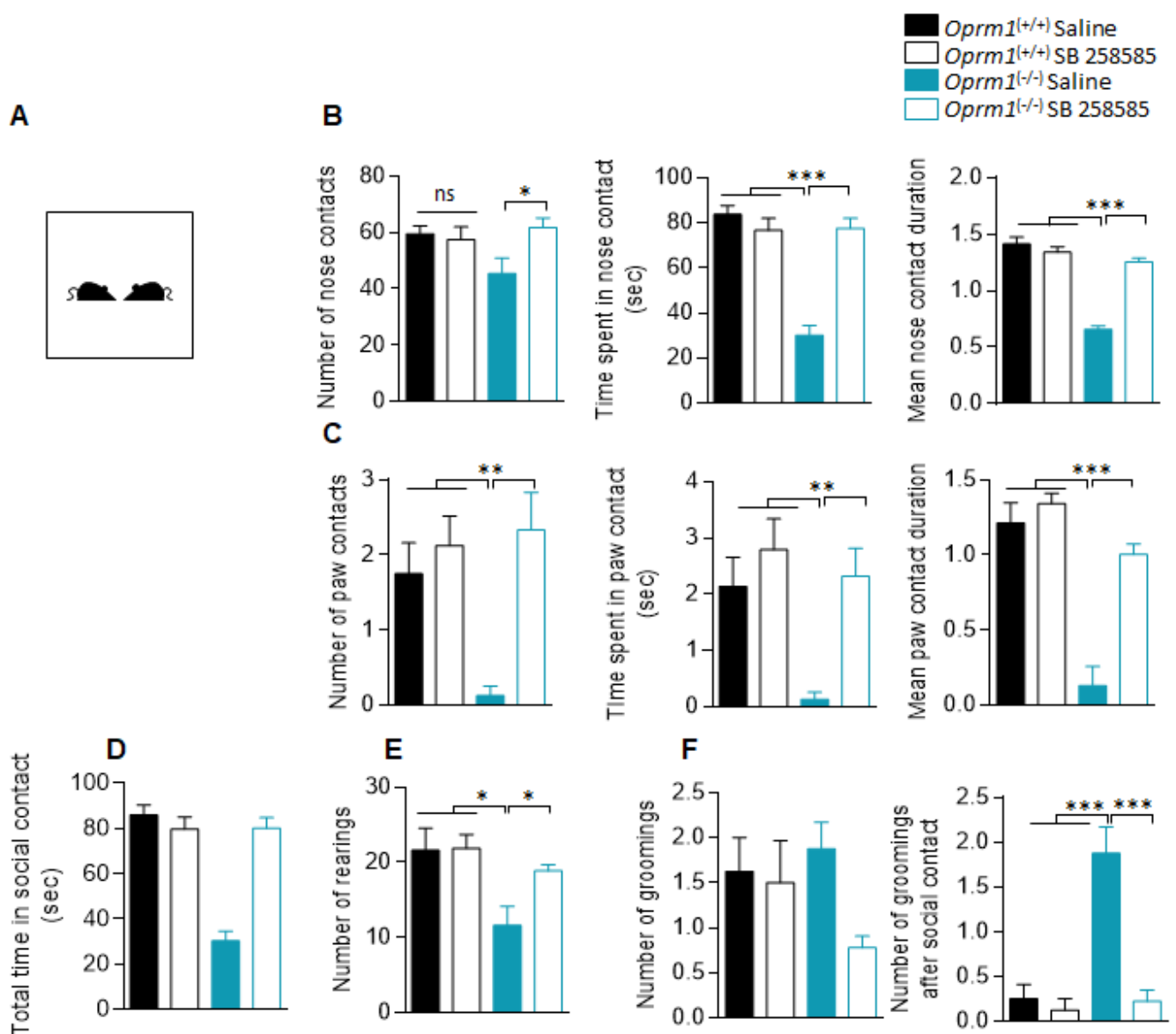
Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est particulièrement exprimé dans le striatum ventral. Dans ce sens, des études de l'équipe de John Neumaier ont démontré son rôle dans l'apprentissage associatif et les effets renforçant de la cocaïne et du sucre. De plus, une étude a trouvé une association d'un variant du récepteur aux TSA. Ces différents éléments font du récepteur 5-HT<sub>6</sub> une cible thérapeutique particulièrement intéressante à étudier dans le contexte du déficit de récompense sociale associé aux TSA.

Sur la base de ces observations, j'ai initié un projet en collaboration avec l'équipe de Julie le Merrer et Jérôme Becker, visant à évaluer les effets de l'inhibition pharmacologique subchronique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans un modèle murin récapitulant de nombreux symptômes des troubles du spectre autistique (TSA) et présentant un déficit de récompense sociale, les souris invalidées pour le récepteur Mu-opioïde (souris *Oprm1<sup>-/-</sup>*). Les souris sauvages ont été utilisées comme contrôles. Nous avons mis en place une succession de tests comportementaux conçue pour évaluer le comportement social, anxieux, moteur et douloureux, ainsi que les stéréotypies motrices et l'inflexibilité cognitive chez ces animaux. Les animaux ont été injectés quotidiennement avec du SB258585 (agoniste inverse du récepteur) à 2,5mg/Kg, ou avec une solution saline (véhicule), pendant une semaine avant l'analyse du comportement afin d'assurer une concentration stable du composé au moment des tests. Les souris ont ensuite été injectées quotidiennement, 30 min avant chaque test.

## a. Le SB258585 améliore le comportement social chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup>

/-

Les troubles du comportement social et de la communication font partie des symptômes primaires des TSA, ils sont requis pour permettre de poser le diagnostic. Nous avons évalué le comportement social de notre cohorte tout d'abord *via* le test d'interaction sociale directe. Dans ce test, deux souris étrangères sont placées dans une arène (« *open field* ») durant 10min, et leur comportement social est évalué. On observe un déficit marqué des paramètres d'interaction sociale chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> traitées par un véhicule comparé aux souris *Oprm1*<sup>+/+</sup> traitées par un véhicule : les animaux mutants font moins de contacts du museau et des pattes, et la durée moyenne de ces contacts est également plus courte se traduisant par une diminution significative du temps passé en contact social. L'inhibition subchronique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> de la sérotonine restaure donc totalement le déficit d'interaction sociale des souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> et ne modifie pas le comportement social chez les souris sauvages (figure 35). On observe par ailleurs que les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> traitées avec le véhicule font significativement moins de redressements (« *rearings* ») que les souris *Oprm1*<sup>+/+</sup>, reflétant une diminution de l'activité exploratoire (figure 35). Le nombre de redressement est significativement supérieur chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> traitées par le SB258585 comparé aux souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> traitées par un véhicule. On observe également une tendance à la diminution des toilettages chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> traitées au SB258585 comparées aux trois autres groupes, ( $F_{(3, 34)} = 2,515$  ;  $p = 0,0748$ ). Enfin, les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline font significativement plus de toilettages à la suite d'un contact social, ce paramètre est normalisé par le traitement des animaux par le SB258585.

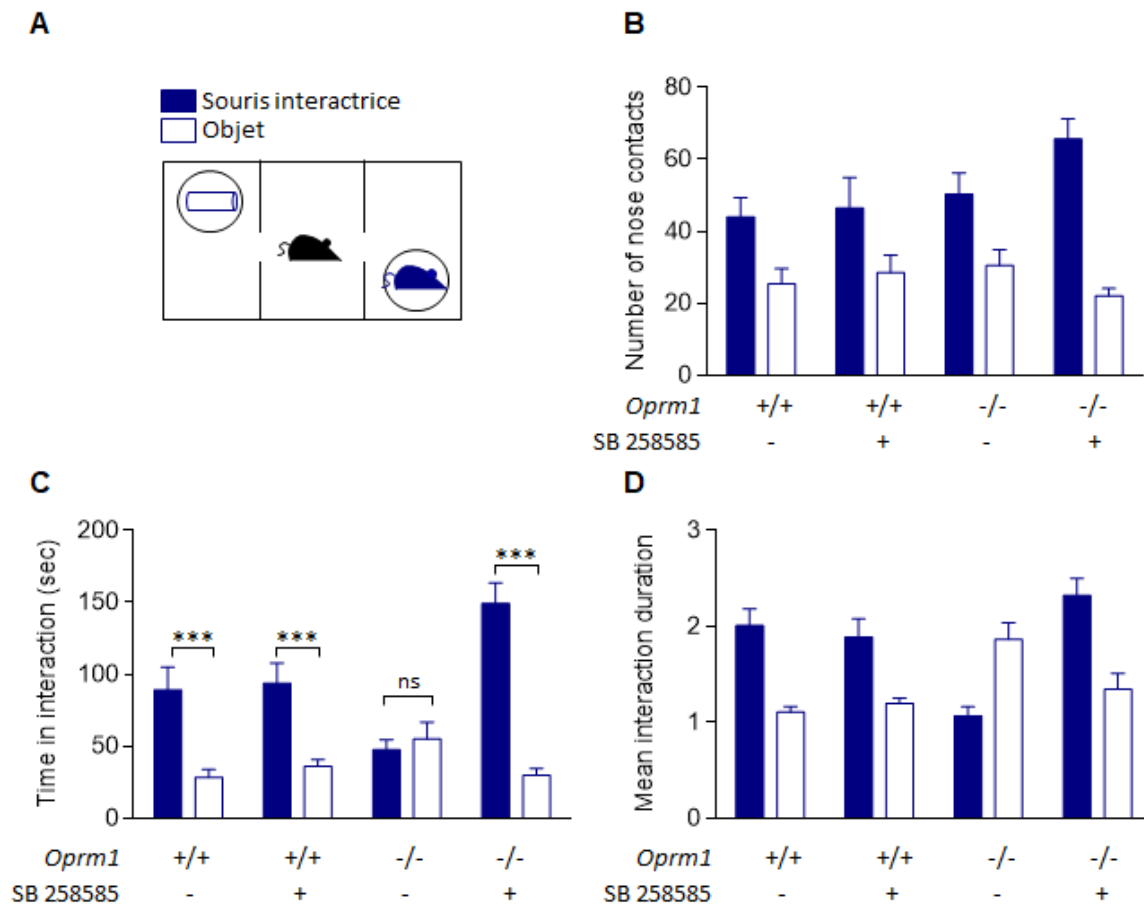


**Figure 35- Le SB258585 améliore le comportement social chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> dans le test d'interaction sociale directe.** Les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> et *Oprm1*<sup>+/+</sup>, injectés de façon subchronique avec le SB258585 antagoniste et agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (2,5mg/Kg) ou une solution saline, ont été soumis à une batterie de tests comportementaux. Dans le test d'interaction sociale directe (représenté schématiquement en (A)), les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline montrent une diminution du nombre, et de la durée des contacts du museau (B) et des pattes (C), se traduisant par une diminution du temps total passé en contact social (D). L'activité exploratoire illustrée par le nombre de redressements (E) est également diminuée, tandis que le toilettage, après contact social, est augmenté dans le groupe *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline comparé aux *Oprm1*<sup>+/+</sup> saline (F). Le SB258585 restaure tout ces paramètres et diminue le nombre de toilettages totaux chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup>, sans modifier le comportement des animaux *Oprm1*<sup>+/+</sup>. Les résultats ont été analysés avec une ANOVA à deux facteurs (génotype et traitement) suivi d'un test de Tukey, et sont représentés en moyenne ± SEM. \*P < 0.05 \*\*P < 0.01 et \*\*\*p < 0.001

Afin d'évaluer l'impact de l'inhibition du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur la sociabilité, nous avons soumis les souris au test des 3 chambres, aussi appelé test de Crawley. Dans ce test, le dispositif est constitué de trois compartiments, un congénère étranger est placé dans une cage grillagée dans un compartiment latéral (nouveau social), et un objet est placé dans une seconde cage grillagée dans un autre compartiment (témoin de nouveauté non sociale). Après la phase de familiarisation à l'environnement vide, le congénère et l'objet sont ajoutés et la souris expérimentale peut interagir librement avec l'un ou l'autre (voir schéma figure 36A). Dans ce test, les souris *Oprm1<sup>+/+</sup>* passent significativement plus de temps à interagir avec le congénère que l'objet, quelque que soit la condition de traitement, signe d'une préférence sociale marquée. A l'opposé, les souris *Oprm1<sup>-/-</sup>* injectées au véhicule, interagissent autant

de temps avec le congénère que l'objet, démontrant une absence de préférence sociale. De même, la durée moyenne de contact est significativement supérieure avec l'objet qu'avec l'interacteur pour les souris *Oprm1<sup>-/-</sup>* injectées au véhicule, alors que l'inverse est observé pour les souris *Oprm1<sup>+/+</sup>* injectées avec le SB258585 ou un véhicule. L'administration de SB258585 chez les souris *Oprm1<sup>-/-</sup>* restaure ce paramètre.

L'inhibition subchronique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> restaure donc la préférence sociale et différents paramètres d'interaction sociale, chez les souris génétiquement déplétées pour le récepteur Mu, sans altérer le comportement social chez les souris sauvages.



**Figure 36 Le SB258585 restaure la préférence sociale chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> dans le test des 3 chambres « Crawley test »**

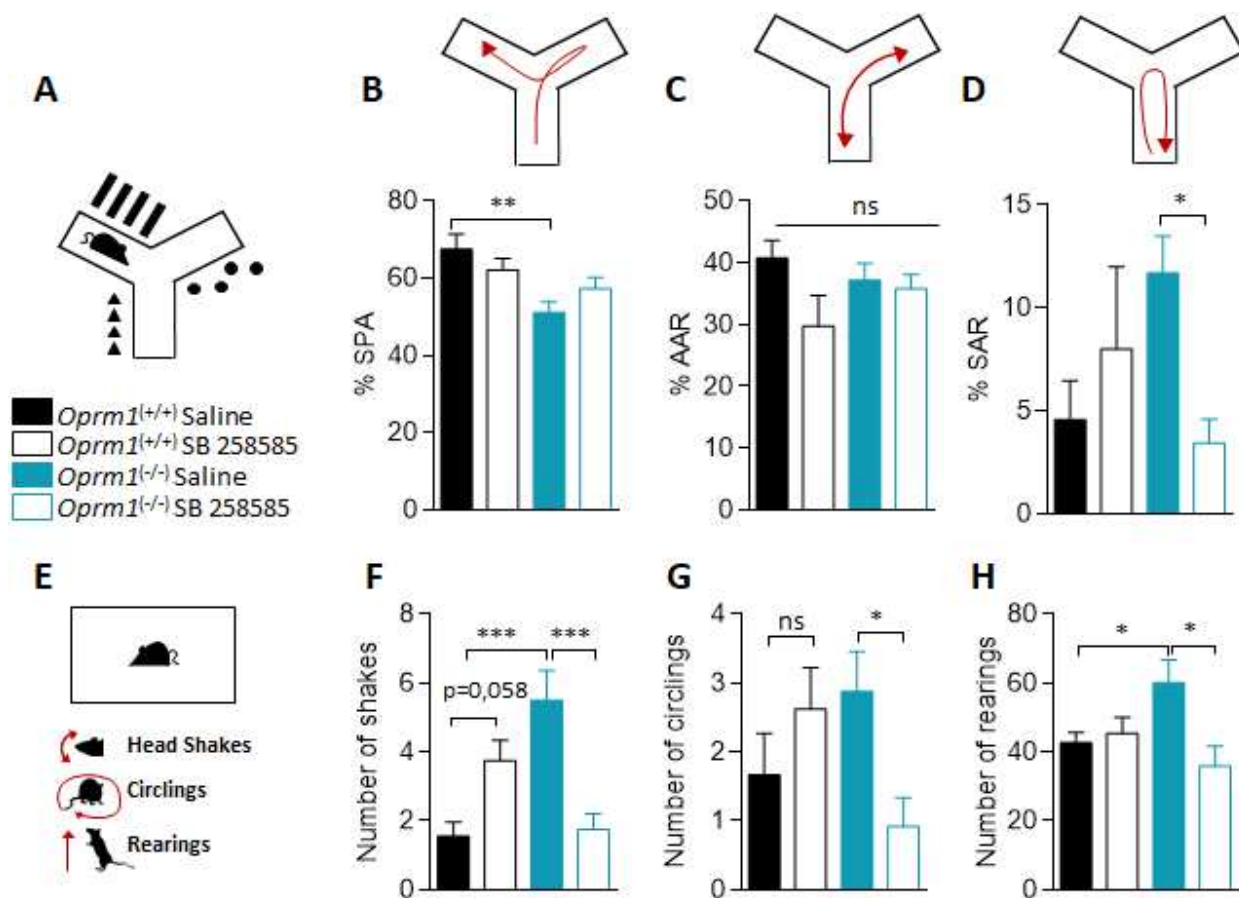
Les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> et *Oprm1*<sup>+/+</sup>, injectés de façon subchronique avec le SB258585 antagoniste et agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (2,5mg/Kg) ou une solution saline, ont été soumis à une batterie de tests comportementaux. Dans le test des trois chambres, (représenté schématiquement en (A)), les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline ne montrent pas de différences du nombre de contacts du museau (B) mais montrent une diminution du temps passé en interaction avec un congénère (C) et une augmentation de la durée moyenne d'interaction avec un objet (D) comparé aux souris *Oprm1*<sup>+/+</sup> salines. Le SB258585 restaure la préférence sociale chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup>, sans modifier le comportement des animaux *Oprm1*<sup>+/+</sup>. Les résultats sont représentés en moyenne ± SEM. \**P* < 0.05 \*\**P* < 0.01 et \*\*\**P* < 0.001

## b. Le SB258585 diminue l'inflexibilité cognitive et les stéréotypies motrices chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup>

Le diagnostic de TSA s'appuie également sur la présence de « comportements, activités et intérêts particuliers ou répétitifs », souvent modélisés chez la souris par des stéréotypies motrices et une inflexibilité cognitive. Afin d'évaluer les effets du traitement sur la flexibilité cognitive, nous avons examiné l'alternance entre les trois bras d'un labyrinthe en Y (schéma figure 37A). Il est important de noter que les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> ne présentent aucun déficit de mémoire de travail ou de mémoire spatiale (Becker et al. 2014). Dans ce contexte, un déficit d'alternance peut être interprété comme un signe d'inflexibilité cognitive. Dans ce test, l'alternance entre 2 bras n'est pas significativement différente entre les groupes (AAR, Figure 37C). En revanche, les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> traitées par le véhicule réalisent significativement moins d'alternances spontanées entre les 3 bras que les souris *Oprm1*<sup>+/+</sup> (SPA, Figure 37B  $F_{(1,34)} = 4,395$   $p < 0,01$ ). Les souris traitées par le SB258585 présentent des valeurs intermédiaires, non significativement différentes entre les groupes, ne permettant pas de conclure pour ce paramètre. Enfin, on observe une augmentation des retours dans un même bras chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup>, témoignant de la présence d'une inflexibilité cognitive, et celle-ci est significativement diminuée par l'injection de SB258585.

Nous avons ensuite examiné les stéréotypies motrices des souris placées individuellement dans des cages d'élevages transparentes (dans des conditions de luminosité non stressantes). Dans ces conditions, les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline font significativement plus de secouements stéréotypés de la tête (head shakes, figure 37F), de déplacements circulaires (circlings, figure 37G) et de redressements (rearing figure 37H) que les souris sauvages. Ces paramètres sont tous restaurés par l'administration subchronique de SB258585 aux souris *Oprm1*<sup>-/-</sup>, qui montrent alors un nombre de stéréotypies similaire à ce qui est observé chez les *Oprm1*<sup>+/+</sup> traitées par un véhicule. On observe une tendance à l'augmentation du nombre de secouements de la tête chez les souris *Oprm1*<sup>+/+</sup> traitées par le SB258585 comparé aux souris *Oprm1*<sup>+/+</sup> injectées avec le véhicule (figure 37F).



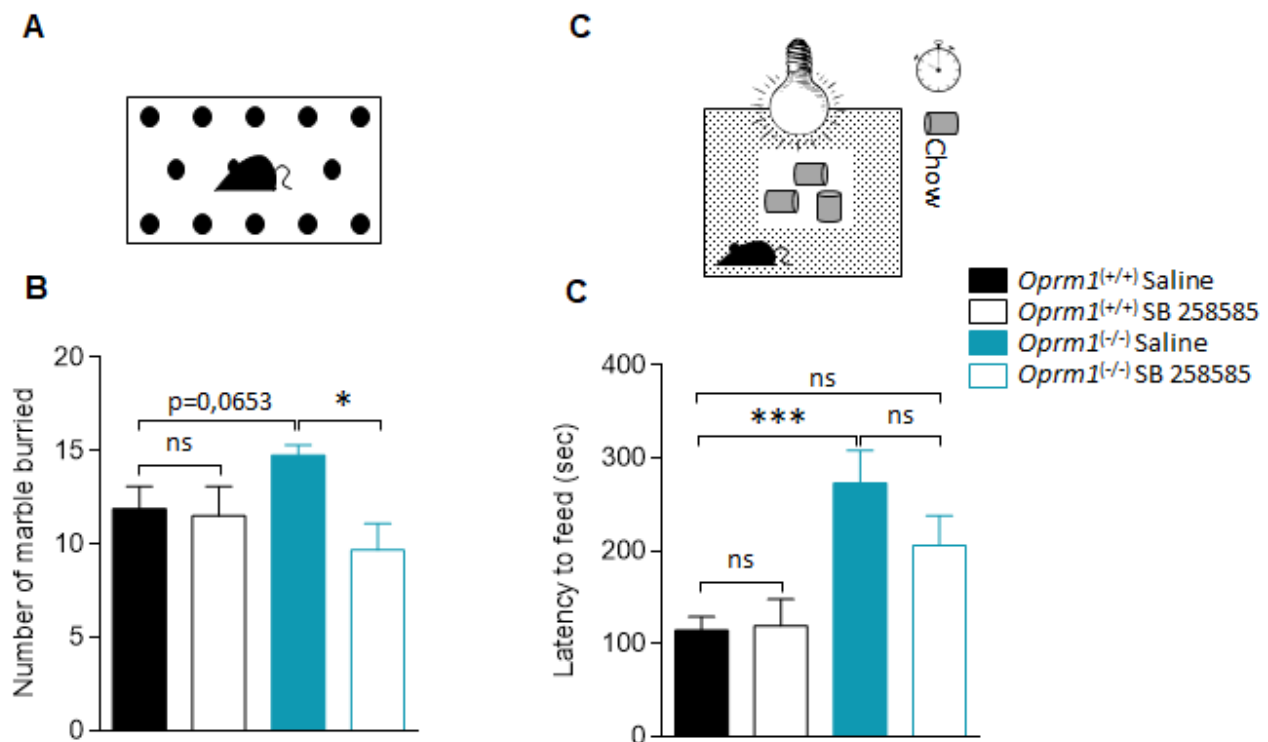


**Figure 37 - Le SB258585 améliore la flexibilité cognitive et diminue les stéréotypies motrices chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup>**

Les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> et *Oprm1*<sup>+/+</sup>, injectés de façon subchronique avec le SB258585 antagoniste et agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (2,5mg/Kg) ou une solution saline ont été soumis à une batterie de tests comportementaux. Dans le test du labyrinthe en Y, (représenté schématiquement en A), les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline font moins d'alternances spontanées (SPA, B), plus d'alternances entre deux bras (AAR, C) et plus de retours dans un même bras (SAR, D), traduisant une augmentation de l'inflexibilité cognitive. L'analyse du comportement en cage d'élevage, (représentée schématiquement en E), révèle une augmentation du nombre de secouements de la tête (shakes, F), de déplacements circulaires (circlings, G) et de redressements (rearings, H) chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> comparé aux *Oprm1*<sup>+/+</sup> saline (F,G,H). Le SB258585 diminue les stéréotypies motrices chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> et les augmente chez les souris *Oprm1*<sup>+/+</sup>. Les résultats ont été analysés avec une ANOVA à deux facteurs (génotype et traitement) suivi d'un test de Tukey, et sont représentés en moyenne ± SEM. \*P < 0.05 \*\*P < 0.01 et \*\*\*P < 0.001.

Nous avons ensuite examiné l'impact du traitement par l'agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur les stéréotypies d'enfouissement dans le test d'enfouissement de billes. Dans ce test, l'animal seul est placé dans une cage d'élevage remplie de sciure, à la surface de laquelle des billes de verre sont disposées selon un pattern défini. La présence des billes provoque une anxiété chez la souris, qui se manifeste par un comportement stéréotypé d'enfouissement (« *burying* »). Le nombre de billes enfouies est considéré comme proportionnel à l'anxiété des animaux. On observe une tendance à l'augmentation du nombre de billes enfouies chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline comparé aux souris *Oprm1*<sup>+/+</sup> saline (Figure 38B p=0,0653). Ce comportement stéréotypé est normalisé chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> traitées par le SB258585.

Les stéréotypies motrices sont connues pour être influencées par le niveau d'anxiété. Nous avons donc évalué l'anxiété des souris en utilisant le test de suppression de l'alimentation par la nouveauté (« *novelty suppressed feeding* »). Les animaux sont privés de nourriture la veille du test. Le jour du test, les souris sont placées individuellement dans une arène très éclairée au centre de laquelle se trouvent des granulés alimentaires. Ce test permet d'évaluer l'anxiété de conflit : la faim et les granulés alimentaires vont susciter des comportements d'approche du centre, la nouveauté de l'environnement et la luminosité, anxiogènes, suscitent un comportement de thigmotactisme : les souris restent en périphérie de l'arène. À motivation égale, assurée par la déprivation alimentaire, le temps que met la souris à se nourrir reflète son niveau d'anxiété. Ainsi, les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> mettent significativement plus de temps à se nourrir que les souris *Oprm1*<sup>+/+</sup> traitées par le véhicule ou le SB258585 (latency to feed, figure 38C). Les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> traitées de façon subchronique avec le SB258585 montrent une latence avant de se nourrir intermédiaire, mais ne diffèrent significativement d'aucun des groupes. De ce fait, les résultats ne permettent pas de conclure sur un effet anxiolytique du SB258585 chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup>.

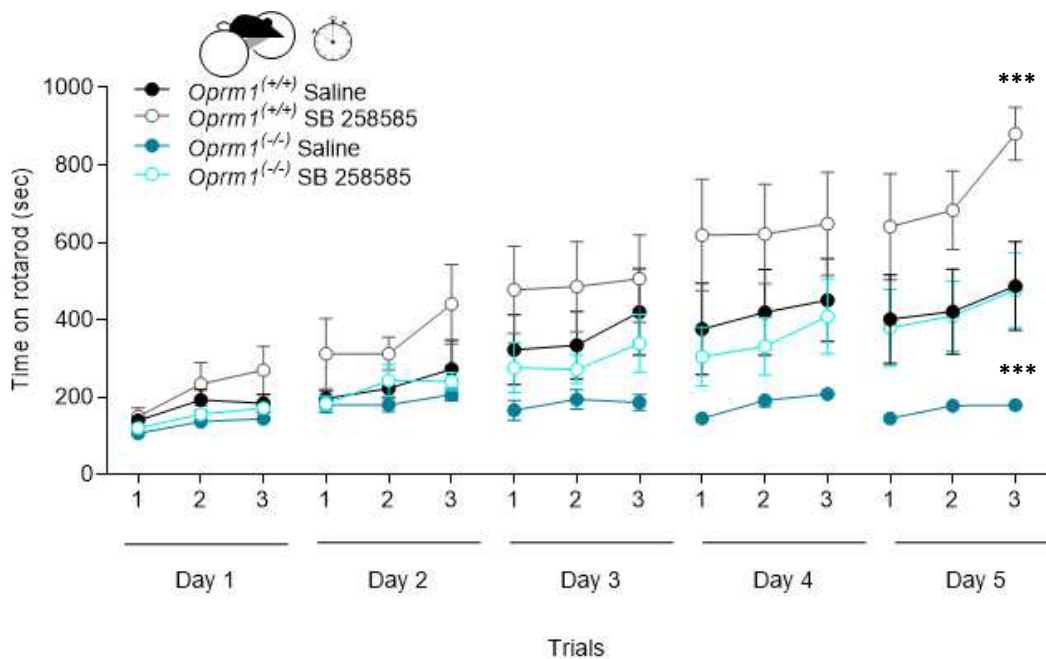


**Figure 38 - Le SB258585 diminue les stéréotypies suscitées par l'anxiété chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> dans le test d'enfouissement de billes**

Les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> et *Oprm1*<sup>+/+</sup>, injectés de façon subchronique avec le SB258585 antagoniste et agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (2,5mg/Kg) ou une solution saline, ont été soumis à une batterie de tests comportementaux. Dans le test de d'enterrement de billes, (représenté schématiquement en A), les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline ont tendance à enterrer plus de billes (p=0,0653) que les souris *Oprm1*<sup>+/+</sup> saline. Le SB258585 diminue significativement le nombre de billes enterrées chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> comparé aux *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline illustrant une diminution des comportements stéréotypés d'enfouissement suscitées par l'anxiété(B. Dans le test de suppression de l'alimentation par la nouveauté (représenté schématiquement en C), les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline mettent plus de temps avant de se nourrir que les souris *Oprm1*<sup>+/+</sup> saline (D), traduisant une augmentation de l'anxiété, le SB258585 n'a d'effet significatif sur ce paramètre sur aucun des deux génotypes. ). Les résultats ont été analysés avec une ANOVA à deux facteurs (génotype et traitement) suivi d'un test de Tukey, et sont représentés en moyenne ± SEM. \*P < 0.05 \*\*P < 0.01 et \*\*\*P<0.001

### c. Le SB258585 restaure l'apprentissage moteur chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> et augmente les performances motrices des souris *Oprm1*<sup>+/+</sup>

Les troubles moteurs font partie des symptômes secondaires les plus fréquemment associés aux TSA. Afin d'évaluer l'impact de l'administration sub-chronique de l'agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur les symptômes moteurs, nous avons soumis nos souris à trois sessions de Rotarod quotidiennes pendant 5 jours. Dans ce test d'apprentissage moteur, les animaux sont placés sur une tige en caoutchouc, dont la rotation accélère de 4 rpm à 40 rpm. Le temps passé sur l'axe rotatif avant la chute de l'animal est quantifié. Lors de la session 1 du premier jour de test, on n'observe aucune différence significative entre les groupes, indiquant que les capacités motrices de base sont similaires dans les quatre groupes. Au fur et à mesure des jours d'entraînement, les souris *Oprm1*<sup>+/+</sup> traitées par le véhicule tiennent de plus en plus longtemps sur le Rotarod, illustrant l'apprentissage moteur (figure 39). À l'opposé, les performances des souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> ne sont pas significativement différentes entre le jour 1 et le jour 5, indiquant un déficit d'apprentissage moteur. La courbe d'apprentissage des souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> traitées par le SB258585 rejoint celle des *Oprm1*<sup>+/+</sup> (traitées par le véhicule), indiquant que l'inhibition du récepteur 5-HT<sub>6</sub> restaure une capacité d'apprentissage moteur chez les souris génétiquement déplétées pour le récepteur Mu (figure 39). Il est important de souligner que les souris *Oprm1*<sup>+/+</sup> traitées au SB258585 montrent des performances significativement supérieures à celles des *Oprm1*<sup>+/+</sup> traitées par un véhicule à partir du 4<sup>ème</sup> jour d'entraînement, indiquant que l'inhibition du récepteur 5-HT<sub>6</sub> favorise l'apprentissage moteur chez les animaux sauvages également (figure 39).



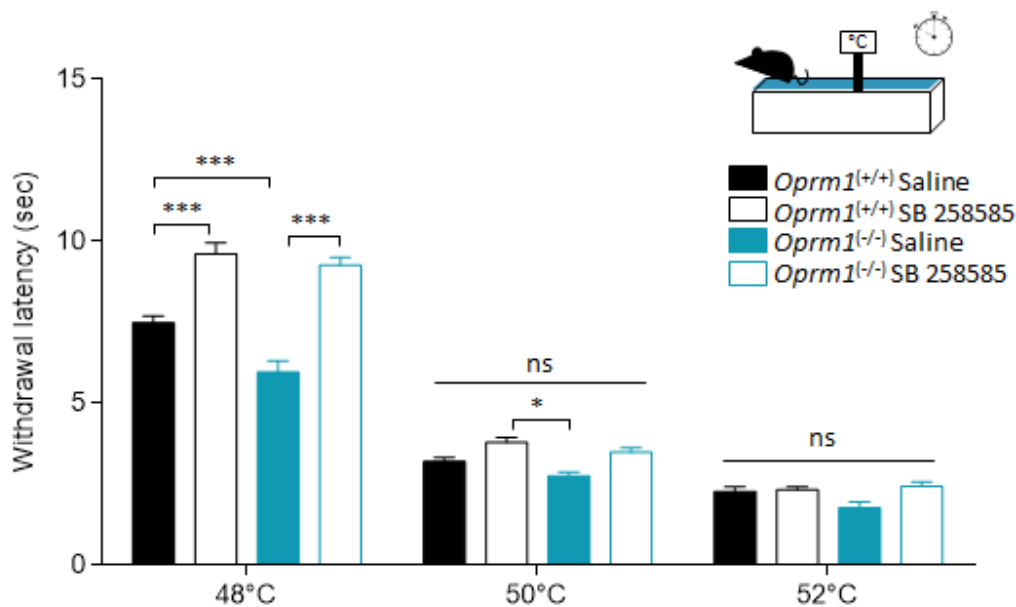
**Figure 39- Le SB258585 restaure l'apprentissage moteur chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> et augmente les performances motrices des souris *Oprm1*<sup>+/+</sup>.**

Les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> et *Oprm1*<sup>+/+</sup>, injectés de façon subchronique avec le SB258585 antagoniste et agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (2,5mg/Kg) ou une solution saline ont été soumis à une batterie de tests comportementaux. Dans ce test d'apprentissage moteur, les animaux sont placés sur un rotarod accélérant de 4rpm à 40rpm pour trois sessions quotidiennes pendant 5 jours. Le graphique illustre pour chaque groupe d'animaux le temps passé sur l'axe rotatif avant de tomber en fonction du jour et de la session d'entraînement. Au jour 1, les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline ont tendance à tomber plus rapidement du rotarod comparé aux *Oprm1*<sup>+/+</sup> saline ( $p=0,0997$ ), montrant la présence d'une légère maladresse motrice. La latence avant de tomber du rotarod n'évolue par en fonction des jours d'entraînement, illustrant un fort déficit d'apprentissage moteur chez les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline. Le SB258585 injectés aux souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> restaure une courbe d'apprentissage similaire à celle des souris *Oprm1*<sup>+/+</sup>salines. Le SB258585 injectés aux souris *Oprm1*<sup>+/+</sup> augmente significativement les performances motrices comparé aux souris *Oprm1*<sup>+/+</sup>salines. Les résultats sont représentés en moyenne  $\pm$  SEM. \*\*\* $p<0.001$  vs. *Oprm1*<sup>+/+</sup>salines.

#### d. Le SB258585 supprime l'allodynie des souris *Oprm1*<sup>-/-</sup>.

L'hypersensibilité aux stimuli sensoriels est également un symptôme commun à de nombreux sujets souffrant de TSA. Nous avons analysé la sensibilité thermique au chaud grâce au test d'immersion de la queue. Dans ce test, la queue des animaux est immergée dans un bain marie dont la température est fixée. La latence avant la survenue du réflexe spinal de retrait de la queue illustre le seuil à partir duquel les fibres nociceptives sont stimulées. Nous avons tout d'abord testé une température de 48°C, qui n'est normalement pas douloureuse, afin d'évaluer l'allodynie thermique au chaud (réaction douloureuse

évoquée par un stimulus normalement indolore). À cette température, on observe une diminution significative de la latence de retrait de la queue chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> traitées par le véhicule, comparé aux souris *Oprm1*<sup>+/+</sup>, montrant la présence d'une allodynie thermique au chaud. L'administration subchronique de SB258585 augmente significativement la latence de retrait chez les animaux sauvages et génétiquement déplétés pour le récepteur Mu, démontrant un effet anti-allodynique global de l'inhibition du récepteur 5-HT<sub>6</sub>. Pour les deux températures douloureuses testées, (50°C et 52°C), si la tendance globale observée est la même, l'analyse de la variance n'est pas significative, ne permettant pas de conclure à la présence d'une hyperalgésie chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> ou à un effet du SB258585.



**Figure 40 - Le SB258585 supprime l'allodynie des souris *Oprm1*<sup>+/+</sup>.**

Les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> et *Oprm1*<sup>+/+</sup>, injectés de façon subchronique avec le SB258585 antagoniste et agoniste inverse du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (2,5mg/Kg) ou une solution saline ont été soumis à une batterie de tests comportementaux. Dans ce test, les animaux sont placés dans un système de contention, et leur queue est immergée dans un bain marie à température fixe. La latence avant la survenue du réflexe de retrait de la queue est chronométrée. L'histogramme illustre cette latence de retrait en secondes, en fonction de la température du bain marie (48°C, 50°C, 52°C). A la température de 48°C, les animaux *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline montrent une diminution de la latence de retrait comparé aux souris *Oprm1*<sup>+/+</sup>salines. La température de 48°C ne stimule pas les fibres nociceptives, la sensibilité accrue des souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> saline est donc le signe d'une allodynie thermique au chaud, celle-ci est normalisée par le SB258585. Les résultats sont représentés en moyenne ± SEM. \**P* < 0.05 \*\**P* < 0.01 et \*\*\**p*<0.001.

---

# Discussion et perspectives

Au cours des dernières années, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> de la sérotonine a émergé comme un acteur central du développement neuronal et de la cognition. Notre équipe a réalisé plusieurs études de protéomique qui ont permis de décrypter son interactome et d'identifier plusieurs partenaires prometteurs du récepteur 5-HT<sub>6</sub>. Ces études ont été le point de départ de la découverte de nouvelles voies de signalisation du récepteur, elles-mêmes impliquées dans différentes fonctions. Notamment, notre équipe a démontré que l'inhibition du récepteur permet de réduire les troubles cognitifs dans des modèles murins de schizophrénie *via* l'inhibition de mTOR prouvant son potentiel thérapeutique dans la pathologie. L'importance de l'interactome du récepteur 5-HT<sub>6</sub> a également été mise en évidence dans différentes étapes clés du neurodéveloppement. En particulier, l'implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la migration des neurones pyramidaux du cortex et l'initiation de la pousse neuritique *via* son interaction constitutive avec la protéine Cdk5 a été démontrée par l'équipe d'Alexandre Dayer en collaboration avec notre équipe. Durant ma thèse, j'ai dans un premier temps démontré le rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans une autre étape de la différenciation neuronale, la complexification de l'arborisation dendritique *via* son interaction séquentielle avec un autre de ses partenaires, GPRIN1. J'ai, dans un second temps, mis en évidence son potentiel thérapeutique pour le traitement des troubles du comportement social et moteur dans un modèle murin de TSA.

## I. L'interaction dynamique entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et ses partenaires protéiques façonne l'architecture de l'arborisation dendritique

### a. Interaction physique entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et GPRIN1 : un acteur clef modulant son activité

En utilisant des lysats de cerveaux de souris 5-HT<sub>6</sub><sup>GFP/GFP</sup> au jour post natal 1 (P1), j'ai tout d'abord démontré que GPRIN1 interagit avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> sous sa forme entière *in vivo*. La première semaine post-natale correspond au 3<sup>ème</sup> trimestre de gestation chez l'Homme (Semple et al., 2013).

Durant cette période, les projections axonales s'étendent sur de longues distances, l'arborisation dendritique se densifie et les connections synaptiques se développent (Semple et al., 2013). Ainsi, à la vue de nos résultats sur l'implication de l'interaction entre le récepteur et GPRIN1 dans la complexification de l'arborisation dendritique *in vitro*, l'observation de la présence de cette interaction à ce stade clef nous donne un argument en faveur de la transposition de notre étude *in vivo*. Il serait néanmoins intéressant de réaliser des immunoprécipitations à différents âges, embryonnaires et post-nataux, jusqu'à l'âge adulte, afin de déterminer si cette interaction est restreinte à une fenêtre temporelle précise du développement ou s'étend jusqu'à l'âge adulte.

## b. GPRIN1 amplifie l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub> vis-à-vis de la voie Gs

La protéine GPRIN1 est connue pour interagir avec deux autres RCPGs : le récepteur Mu des opioïdes et le récepteur  $\alpha 7$  nicotinique (Ge et al. 2009; Nordman et al. 2014; Nordman et Kabbani 2012). Cette interaction avec GPRIN1 régule l'adressage du récepteur Mu dans les radeaux lipidiques et du récepteur  $\alpha 7$  nicotinique dans le cône de croissance. La formation de ces complexes particuliers a d'importantes conséquences sur la signalisation propre à chacun de ces récepteurs. Pour continuer la caractérisation de l'interaction du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec GPRIN1, j'ai donc étudié ses effets sur l'activité Gs du récepteur dans des neuroblastomes NG108-15 et démontré qu'elle augmente l'activation agoniste-indépendante de Gs tout en diminuant l'affinité apparente d'un agoniste inverse pour le récepteur **seulement 48h après la transfection des cellules par des plasmides codant pour le récepteur et GPRIN1**. Cet effet de GPRIN1 ne semble pas lié à une modification de l'adressage du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, aucune modification de son expression totale ou membranaire n'ayant été observée en présence de GPRIN1.

Cette étude apporte un exemple de modulation de l'activation constitutive de la signalisation Gs par un RCPG dépendant de son association physique avec une GIP, GPRIN1. Une étude récente de l'équipe de Séverine Morisset à Orléans en collaboration avec notre équipe, a mis en évidence le rôle d'un autre partenaire, la protéine NF1, dans l'activité constitutive du récepteur. En effet, l'inhibition de l'expression de NF1 par un siRNA entraîne une diminution des taux d'AMPc à la fois dans les cellules NG 108-15 exprimant le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et dans les neurones striataux en culture (Deraredj Nadim et al. 2016b). De même, le niveau d'AMPc dans le cortex préfrontal est diminué chez les souris hétérozygotes



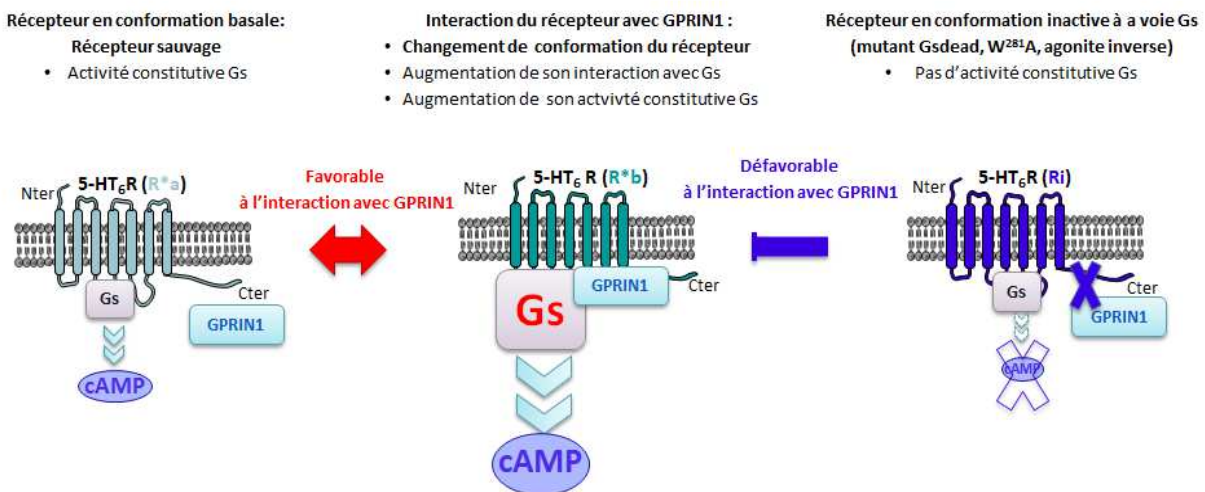
NF1<sup>+/-</sup> par rapport aux souris sauvages et le traitement des animaux par un agoniste inverse du récepteur, le SB 271046, n'a pas d'effet supplémentaire. L'interaction du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec la protéine NF1 paraît donc être cruciale pour son activité constitutive Gs. Il est intéressant de constater que deux partenaires du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, les protéines NF1 et GPRIN1, sont capables d'affecter son activité constitutive. Si l'activité constitutive du récepteur est modulée finement par ses GIPs, on peut supposer qu'elle joue un rôle très important dans la fonction du récepteur. En effet, on trouve peu d'exemples dans la littérature de récepteurs dont l'activité constitutive est d'une ampleur aussi importante que celle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et qui est modulée par un ou plusieurs partenaires. On peut néanmoins citer les récepteurs métabotropiques du glutamate du groupe I (mGluR1a et mGluR5) dont l'activité peut être modulée par la protéine Homer3 (Ango et al., 2001). Contrairement à l'interaction du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec NF1 ou GPRIN1, l'association d'Homer3 avec le domaine C-terminal de mGluR1a ou mGluR5 inhibe l'activité constitutive de ces récepteurs. A l'inverse, l'isoforme Homer1a se comporte comme un régulateur négatif de l'interaction entre mGluR1a ou mGluR5 et Homer3 et favorise ainsi l'activité constitutive de ces récepteurs. On peut souligner que les protéines NF1 et Homer3 semblent se comporter comme des « interrupteurs », activant ou éteignant l'activité constitutive de leurs récepteurs. En revanche, dans ma thèse, j'ai pu décrire GPRIN1 comme un modulateur permettant d'amplifier l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

### c. La conformation du récepteur module son interaction avec ses partenaires et son activité constitutive

En lien avec ces effets sur l'activité constitutive du récepteur, nous avons pu observer une augmentation de la liaison de la protéine Gs au récepteur 5-HT<sub>6</sub> en présence de GPRIN1. Il semblerait donc que l'interaction avec GPRIN1 induise un changement de conformation du récepteur qui favorise le recrutement de la protéine Gs et de fait augmente son activité constitutive. Nous avons par ailleurs constaté que toute mutation ou traitement réduisant l'activité constitutive sur la voie Gs du récepteur 5-HT<sub>6</sub> diminue en miroir son interaction avec GPRIN1. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle l'activation constitutive de la voie Gs par le récepteur correspond à une conformation spécifique de celui-ci (R\*a), plus favorable à son interaction avec GPRIN1. La liaison de GPRIN1 au récepteur semble induire à son tour un changement de conformation de celui-ci (R\*b) responsable de l'augmentation de sa liaison

à la protéine Gs et donc de son activité Gs. Il semble donc exister un dialogue bidirectionnel entre l'état conformationnel du récepteur et l'interaction avec GPRIN1 (figure).

D'autre part, la mutation en alanine du résidu W281, situé au cœur du 3<sup>ème</sup> domaine transmembranaire décroît l'activité constitutive du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, diminue sa liaison avec GPRIN1 et abolit les effets fonctionnels de l'interaction.



**Figure 41- La conformation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> module son interaction avec GPRIN1**

Ce résidu est l'équivalent du résidu W272 retrouvé sur le récepteur 5-HT<sub>4</sub> (Pellissier et al., 2009). Dans une précédente publication, notre équipe a démontré que le récepteur 5-HT<sub>4</sub> était capable d'adopter différentes conformations correspondant à différents niveaux d'activité constitutive et le résidu W272 joue un rôle crucial pour la stabilisation du récepteur dans une conformation active (Pellissier et al., 2009). L'impact de la mutation du W281 du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur les effets de de la GPRIN1, pourrait indiquer que ce résidu joue un rôle pivot d'une part dans le maintien du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans une conformation active (R\*a) et d'autre part dans le changement de conformation du récepteur en présence de GPRIN1 (R\*b).

Enfin, nous avons observé que les 22 résidus proximaux de l'extrémité C-terminale du récepteur sont nécessaires pour le recrutement de GPRIN1 par le récepteur. On peut noter que la protéine NF1 interagit également avec cette séquence (Deraredj Nadim et al. 2016b). Deux protéines modulant

l'activité constitutive du récepteur interagissent donc au niveau de cette même séquence. De plus, la délétion de la totalité du domaine C-terminal (mutant 5-HT<sub>6</sub>ΔCter) abolit l'activité constitutive vis-à-vis de Gs du récepteur alors qu'un mutant tronqué conservant 22 résidus proximaux de l'extrémité C-terminale du récepteur (5-HT<sub>6</sub>Δ342-440) conserve une activité constitutive comparable à celle du récepteur sauvage (données non publiées de l'équipe). Il semblerait donc que la séquence 320-342 du récepteur joue également un rôle central dans la modulation de son activité constitutive *via* le recrutement de partenaires protéiques.

- **NF1 et GPRIN1 : compétition ou synergie ?**

Les protéines NF1 et GPRIN1 interagissent au même niveau de la séquence du récepteur 5-HT<sub>6</sub>. Il serait donc intéressant d'étudier leurs effets mutuels. En effet, la protéine NF1 est exprimée de façon endogène dans les cellules NG 108-15 où elle est nécessaire à l'activation constitutive du récepteur et donc participe à sa conformation précédemment nommée R\*a. Comme nous l'avons discuté, GPRIN1 interagit moins avec un récepteur dépourvu d'activité constitutive. On pourrait donc se demander si NF1 participe au recrutement de GPRIN1 ou si ces interactions sont mutuellement exclusives et que la surexpression de GPRIN1 remplace NF1. Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'examiner, l'effet de l'expression de GPRIN1 dans les cellules NG108-15 sur l'interaction de la protéine NF1 endogène avec le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et l'effet de l'extinction de l'expression de NF1 sur l'interaction entre GPRIN1 et le récepteur. Il serait également intéressant de comparer l'interaction du récepteur avec GPRIN1 dans des lysats de cerveaux de souris sauvages et dans des lysats de cerveaux de souris NF1<sup>+/-</sup> (en croisant les souris 5-HT<sub>6</sub><sup>GFP/GFP</sup> et les souris NF1<sup>+/-</sup> pour créer une lignée 5-HT<sub>6</sub><sup>GFP</sup> ; NF1<sup>+/-</sup>). En effet, si on considère que dans la neurofibromatose de type I, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> est dans une conformation où il présente une activité constitutive Gs diminuée, il est probable qu'il interagisse également moins avec GPRIN1. Cette variation d'interaction avec GPRIN1 pourrait expliquer une partie des troubles neuro-développementaux observés chez les patients souffrant de neurofibromatose de type 1.

#### d. L'élongation et la ramification de l'arborisation dendritique est dépendante de l'activité constitutive Gs du récepteur 5-HT<sub>6</sub> et du recrutement de la PKA dans les cellules NG 108-15

D'un point de vue morphologique, la protéine GPRIN1 est connue pour induire la pousse neuritique dans des lignées cellulaires comme les cellules Neuro2A lorsqu'elle est surexprimée avec une sous unité G $\alpha$  activée. Dans ce contexte, je me suis ensuite intéressée aux effets de GPRIN1 sur la différenciation neuronale engagée par le récepteur dans les cellules NG108-15 et les neurones en culture. J'ai démontré que l'interaction entre GPRIN1 et le récepteur augmente significativement l'élongation et la complexification de l'arborisation dendritique. **Cet effet n'est cependant observé que 48h après la transfection des cellules par des plasmides exprimant les deux partenaires, de façon concomitante avec l'augmentation de l'activité constitutive du récepteur sur la voie Gs.** Pour étudier cette coïncidence temporelle, nous avons exprimé différents récepteurs mutés, en présence ou non de GPRIN1, et mesuré leur impact sur les niveaux de production constitutive d'AMPc, 24h et 48h après la transfection, que nous avons ensuite mis en corrélation avec la longueur moyenne des neurites obtenue pour chaque condition. Rappelons que, dans une étude précédente, notre équipe a mis en évidence que l'expression du récepteur 5-HT<sub>6</sub> permet l'initiation d'un processus de pousse neuritique dans ce même modèle cellulaire de différenciation neuronale, 24h après la transfection et ce processus est indépendant de l'activité Gs du récepteur (Duhr et al., 2014). Confirmant ces résultats, je n'ai pas observé de corrélation entre les niveaux d'activité constitutive sur la voie Gs et la longueur des neurites 24h après la transfection. En revanche, la longueur des neurites devient proportionnelle aux niveaux d'AMPc 48h après la transfection. Cette observation nous a ensuite permis de prouver que l'amplification de l'activation constitutive de la voie Gs par la GPRIN1 induit la complexification de l'arborisation dendritique *via* le recrutement de la PKA. La signalisation AMPc/PKA a été impliquée la pousse neuritique, aussi bien durant le développement que lors de la repousse axonale suite à une lésion (Batty et al., 2017). Les mécanismes par lesquels l'AMPc favorise la croissance neuritique ne sont pas encore pleinement compris. Ce mécanisme semble cependant être dépendant de la phosphorylation de la protéine CREB (« *cAMP-response element binding protein* ») par la PKA. Cette phosphorylation active CREB qui induit la transcription de gènes clefs (Batty et al., 2017; Ma et al., 2014). En particulier, des

études ont montré qu'une fois phosphorylé, CREB augmente la transcription de l'arginase 1, enzyme de synthèse des polyamines et induit ainsi la production de putrescine et de spermidine, connues pour leur rôle dans la survie et la pousse neuritique (Chu et al., 1994). Pour la suite de l'étude de GPRIN1, il serait intéressant d'une part de regarder l'impact d'une surexpression de la protéine sur la phosphorylation de CREB et d'autre part d'inhiber sélectivement les acteurs précédemment cités pour déterminer s'ils jouent un rôle dans la différenciation neuronale induite par le récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

## e. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et la dynamique de son interactome contrôle la succession des étapes de la différenciation neuronale

- **Cdk5 : un acteur influençant du dialogue entre GPRIN1 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub>**

Nous avons par ailleurs observé dans les cellules NG 108-15 que l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et GPRIN1 augmente entre 24h et 48h après la transfection tandis que l'interaction entre le récepteur et Cdk5 diminue en parallèle. Cette dynamique temporelle d'interaction semble être régulée par la phosphorylation du récepteur par Cdk5 de la sérine 350, GPRIN1 interagissant préférentiellement avec la forme non phosphorylée du récepteur. Ainsi, l'interaction du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec Cdk5 d'une part et GPRIN1 d'autre part, semble être séquentielle et mutuellement exclusive. Ce point est particulièrement intéressant, car il s'agit à notre connaissance d'un des premiers exemples d'une régulation temporelle de l'interaction entre un RCPG et plusieurs de ses partenaires. Comme nous l'avons précédemment discuté, l'extrémité C-terminale du récepteur semble jouer un rôle pivot pour que le récepteur adopte une conformation active. On peut supposer que la phosphorylation de la sérine 350 du domaine C-terminal induit un changement de conformation diminuant son interaction avec GPRIN1. Dans ce sens, notons que la mutation de la sérine 350 en aspartate (5-HT<sub>6</sub>S<sup>350</sup>D) abolit l'activité constitutive du récepteur. Ces expériences placent l'état de phosphorylation de la sérine 350 au centre de l'interaction du récepteur avec GPRIN1 et des effets fonctionnels de cette dernière sur l'activité du récepteur contrôlant la morphologie des neurones.

- **L'interaction séquentielle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> avec Cdk5 et GPRIN1 facilite la succession des étapes de la différenciation neuronale.**

J'ai ensuite démontré dans les cellules NG108-15 que la pousse neuritique induite par l'expression du récepteur implique deux voies de signalisation successivement mises en jeu :

1. L'initiation de la pousse neuritique à 24h est dépendante de Cdk5, indépendante de l'activité Gs et non influencée par la GPRIN1.
2. L'élongation et la ramification de l'arborisation devient dépendante de la GPRIN1 et de l'activation constitutive de la voie Gs par le récepteur, et indépendante de l'activité de la Cdk5.

Ainsi, l'inhibition de l'activité de Cdk5 par l'expression d'un mutant dominant négatif ou l'expression d'un mutant du récepteur 5-HT<sub>6</sub> non phosphorylable par Cdk5 (5-HT<sub>6</sub>S<sup>350</sup>A) dans les cellules NG 108-15, inhibe la capacité du récepteur 5-HT<sub>6</sub> à initier la pousse neuritique. En revanche, 48h après la transfection, on observe que les cellules exprimant le mutant dominant négatif de Cdk5 ou le récepteur 5-HT<sub>6</sub>S<sup>350</sup>A ont débuté leur différenciation. Il semblerait donc que l'interaction du récepteur avec la Cdk5 initie une pousse neuritique rapide. En absence d'activité Cdk5, le récepteur 5-HT<sub>6</sub> apparaît capable d'induire une pousse neuritique plus lente et dépendante de son activité constitutive sur la voie Gs. Si cette hypothèse est exacte, un récepteur mutant 5-HT<sub>6</sub>S<sup>350</sup>A/Gsdead devrait être incapable d'induire la différenciation des cellules NG108-15 que ce soit après 24h ou 48h de transfection. On peut par ailleurs se demander pourquoi une voie de signalisation induit la pousse neuritique plus rapidement qu'une autre ? Dans l'étude précédente, l'équipe a démontré que la phosphorylation du récepteur par Cdk5 induit le recrutement de Cdc42, une petite Rho GTPase (Duhr et al., 2014). Cdc42 est un acteur important de l'assemblage et du réarrangement de la dynamique du cytosquelette d'actine. Ainsi, son recrutement par le récepteur peut mener directement à l'excroissance neuritique. À l'opposé, le second mécanisme de pousse neuritique dépendant du récepteur met en jeu la voie Gs/AMPC/PKA. Si notre hypothèse précédente est exacte, l'activation de la PKA pourrait induire la phosphorylation de CREB et mener à l'expression des gènes responsables de la modulation du cytosquelette et de la pousse neuritique. Ce mécanisme implique plusieurs étapes, notamment de transcription et de traduction, expliquant l'émission des protrusions neuritiques plus tardivement.

- **Un rôle de la protéine phosphatase 2A (PP2A) dans la succession des interactions 5-HT<sub>6</sub>-Cdk5 et 5-HT<sub>6</sub>-GPRIN1 ?**

On retrouve également dans l'interactome du récepteur 5-HT<sub>6</sub> la protéine phosphatase 2A (PP2A). La PP2A est exprimée de façon prédominante dans le soma et le cône de croissance (Bordelon et al. 2005). Il a été proposé que la PP2A agit de concert avec la protéine phosphatase 1 (PP1), pour réguler les étapes de la différenciation neuronale. En effet, des études réalisées sur des cultures primaires de neurones ont montré que si la PP1 est importante pour l'initiation de la pousse neuritique, en régulant l'adhésion cellulaire et la mobilité du cytosquelette, la PP2A apparaît affecter les étapes plus tardives de la différenciation en particulier l'extension des neurites et leur ramification (Monroe et Heathcote 2013). Les auteurs ont proposé un modèle selon lequel l'action concertée des phosphatases/kinases et la dynamique temporelle de leur activité pourraient constituer un mécanisme important à l'origine la modulation fine du développement neuronal.

Si l'activité de la PP2A est très large, elle est connue pour déphosphoryler en particulier les cibles de Cdk5 (Veeranna et al., 1995). Une étude de 2007 a par ailleurs démontré, dans les neurones striataux, que la PKA phosphoryle la protéine PP2A, ce qui a pour effet d'augmenter son activité de phosphatase (Ahn et al. 2007). Les observations récentes de notre équipe concernant le rôle de l'interaction entre Cdk5 et le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans l'initiation de la pousse neuritique suggèrent que, dans un premier temps, Cdk5 phosphoryle de façon constitutive le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et induit l'initiation de la pousse neuritique indépendamment de la voie Gs. Par ailleurs, on peut supposer que l'accumulation de l'AMPc due à l'activité constitutive du récepteur permet d'activer graduellement la PKA, menant à l'activation de PP2A et à terme à la déphosphorylation du récepteur. Ainsi, au cours du temps, la forme déphosphorylée du récepteur pourrait devenir prépondérante, favorisant l'interaction de celui-ci avec la GPRIN1.

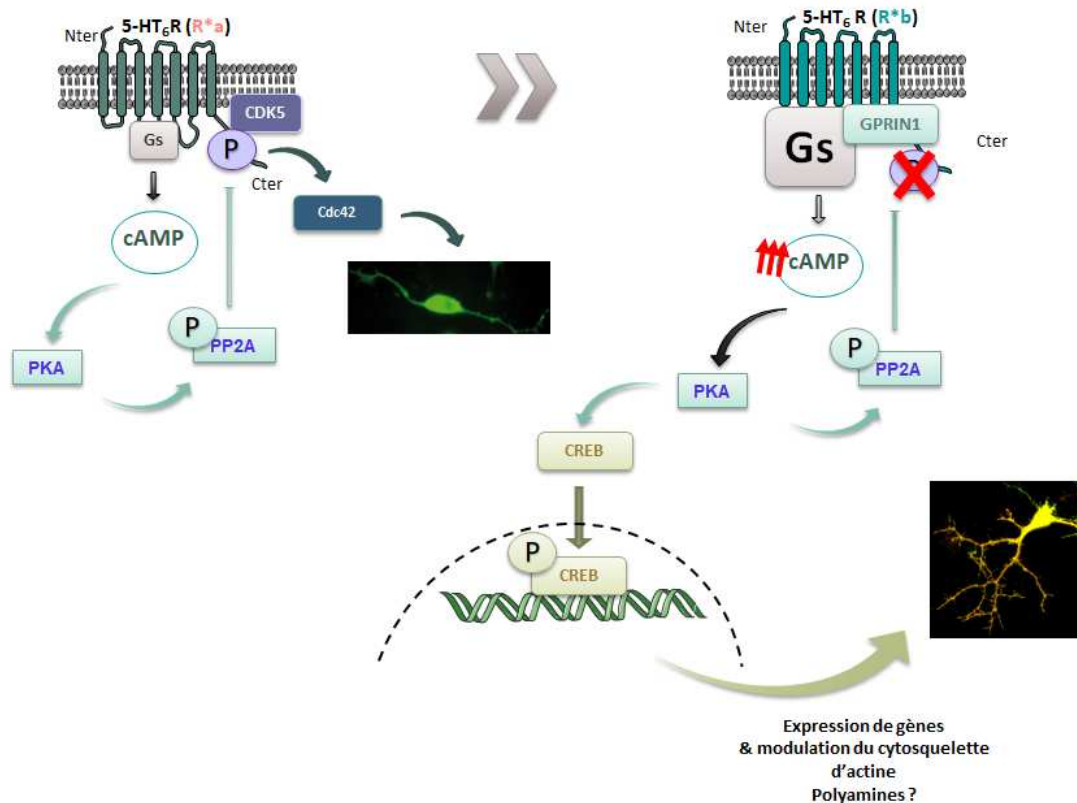


Figure 42- Hypothèse explicative de l'aténance des voies de signalisations 5-HT<sub>6</sub>/Cdk5/Cdc42 et 5-HT<sub>6</sub>/GPRIN1/Gs/PKA

- Rôle du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la succession de la migration et de la différenciation *in vivo* ?

Notre équipe a précédemment démontré que l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et Cdk5 joue un rôle important dans la pousse neuritique précoce des neurones d'hippocampe en culture, correspondant aux stades 1 et 2 de la différenciation neuronale *in vitro* décrits par Dotti *et al.* (Dotti *et al.*, 1988). Durant ma thèse, j'ai pu démontrer dans les cultures primaires de neurones d'hippocampe, de cortex et de striatum, que l'interaction du récepteur avec GPRIN1 n'est pas nécessaire aux étapes 1 et 2 de la différenciation neuronale *in vitro*. En revanche, cette interaction semble nécessaire à l'extension des neurites dans les stades 3 et 4 de la différenciation. Ces observations apportent des arguments en faveur de l'existence d'une dynamique temporelle d'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et ses partenaires dans les neurones, similaire à celle qui est observée dans les cellules NG 108-15. Afin de vérifier l'existence d'une dynamique d'interaction entre les partenaires du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, l'idéal serait de réaliser une étude de



l'interactome du récepteur dans des cultures neuronales à différents stades de la maturation neuronale, en réalisant des expériences de co-immunoprécipitation du récepteur et de ses partenaires (approche GFP-TRAP® à partir de neurones issus de souris 5-HT<sub>6</sub><sup>GFP/GFP</sup>).

La culture primaire de neurones est un modèle intéressant pour étudier la différenciation des neurones, elle ne constitue cependant pas un système intégré. En effet, l'environnement (neurones environnants, glie, molécules de la matrice, facteurs sécrétés...) a une influence majeure sur le développement neuronal. Pour vérifier nos observations dans un modèle plus intégré, nous pourrions réaliser des électroporations *in utero* d'embryons de souris avec différents mutants du récepteur 5-HT<sub>6</sub> ou des shRNA ciblant certains de ses partenaires, et suivre la différenciation spécifiquement des neurones électroporés en fixant les cerveaux des embryons à différents temps. Cette technique nous permettrait également d'examiner le déroulement de la succession entre migration neuronale et différenciation. En effet, il est intéressant de noter que l'interaction entre récepteur et Cdk5 a déjà été démontrée comme étant cruciale pour la migration des neurones pyramidaux du cortex. On peut supposer que, lors de la migration, le récepteur interagit préférentiellement avec Cdk5. Une fois l'aire de destination atteinte, l'interaction du récepteur avec Cdk5 permettrait au neurone d'initier une pousse neuritique rapide et de commencer à établir des connections. On peut supposer que les événements cellulaires qui s'ensuivent, qu'il s'agisse du changement de potentiel membranaire, de l'interaction avec de nouveaux partenaires, ou de la concentration calcique de la cellule, induisent des changements conformationnels du récepteur, favorisant : son activité constitutive vis-vis de la voie Gs, le recrutement de la PKA, et de PP2A et, finalement, son interaction avec la GPRIN1. Ainsi la voie de signalisation 5-HT<sub>6</sub>/Gs/AMPC/PKA prendrait le relais de la voie 5-HT<sub>6</sub>/Cdk5. A l'heure actuelle, on ne sait pas encore comment se succèdent les différentes étapes de la différenciation et quels éléments déclenchent l'arrêt de la migration au profit de l'initiation de la différenciation neuronale. La modulation des voies de signalisation engagées par le récepteur, par des jeux de phosphorylation/déphosphorylation constitue une piste particulièrement prometteuse pour expliquer la succession de ces étapes *in vivo*.

## f. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le développement de l'arborisation dendritique

Bien que l'on ait longtemps considéré que les dendrites transmettaient passivement l'information au soma, de nombreuses études ont par la suite démontré que les dendrites agissent comme des intégrateurs dynamiques de la transmission synaptique (Häusser, Spruston, et Stuart 2000). La transmission du signal au soma est grandement affectée par le schéma de ramification de l'arbre dendritique et les variations de la cytoarchitecture dendritique d'un type neuronal à l'autre ont des conséquences fonctionnelles importantes sur le traitement du message synaptique (Gulledge, Kampa, et Stuart 2005). Les éléments qui déterminent la spécification de l'arbre dendritique d'un type neuronal à l'autre, sont encore loin d'être connus (Copf, 2015). Les différentes études sur le sujet montrent une importance des signaux extracellulaires, de l'expression de gènes spécifiques et l'implication de la PKA (Batty et al., 2017; Copf, 2015).

Durant ma thèse, j'ai observé dans les cultures primaires de neurones que l'inhibition de l'interaction du récepteur avec GPRIN1 grâce à un peptide interférant capable de traverser la membrane plasmique (TATCt320-342) diminue la ramification de l'arborisation dendritique des neurones de striatum à 13 DIV. Le problème majeur de l'utilisation de ce peptide dans les neurones est le risque d'observer des effets qui seraient dus à la rupture de l'interaction avec un autre partenaire recruté par la même région du récepteur que la GPRIN1 comme par exemple NF1. Pour éviter ce problème, l'idéal aurait été d'identifier le domaine de la GPRIN1 qui interagit avec le récepteur et de tester un second peptide interférant visant cette séquence. L'obtention de résultats identiques en ciblant les séquences d'interactions sur le récepteur et sur GPRIN1 nous aurait permis de conclure quant à la spécificité de l'effet. Comme nous l'avons fait pour le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, nous aurions pu exprimer des mutants de la GPRIN1 tronqués et observer leurs effets sur l'interaction. Il nous a cependant été impossible de modifier la séquence de GPRIN1 sans altérer son expression à la membrane. Pour cette raison, nous n'avons pas pu déterminer le site d'interaction du récepteur dans la séquence peptidique de la GPRIN1. Nous avons donc opté pour une autre stratégie, celle d'éteindre l'expression de la protéine GPRIN1 endogène dans les neurones en les infectant avec un virus exprimant un shRNA ciblant ses transcrits. L'obtention d'un résultat similaire

avec le shRNA éteignant l'expression de la GRPIN1 et le TATCt320-342 nous a permis de conclure que l'effet observé est bien spécifique de l'interaction de GPRIN1 avec le récepteur.

L'interaction GPRIN1/5-HT<sub>6</sub> semble donc importante pour la phase de complexification du réseau dendritique et la formation de branchements. On peut supposer qu'*in vivo*, différents partenaires concourent de la même façon à la modulation de l'activité du récepteur en fonction de son expression spatio-temporelle et participent ainsi au façonnage de la morphologie spécifique de chaque type neuronal exprimant le récepteur.

Des études récentes de l'équipe de John Neumaier suggèrent par ailleurs que le récepteur 5-HT<sub>6</sub> exprimé dans le cil primaire modulerait la croissance des dendrites (Brodsky et al. 2017; Lesiak et al. 2018). Dans ce contexte, il serait intéressant de déterminer la localisation subcellulaire de l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et la GPRIN1 endogène dans les neurones afin de déterminer si elle est restreinte au cil primaire ou non.

Nous sommes cependant loin d'avoir mis à jour la totalité des mécanismes par lesquels le récepteur 5-HT<sub>6</sub> module le développement neuronal. En effet, plusieurs partenaires du récepteur connus pour leurs fonctions neuro-développementales ont également été identifiés lors des études d'interatomique réalisées par l'équipe. Etudier plus en détail les interactions entre le récepteur et ses partenaires constitue une stratégie prometteuse pour mettre à jour de nouveaux mécanismes d'action de la signalisation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le développement.

## g. D'autres partenaires prometteurs

- **mTOR**

La protéine mTOR est une sérine/thréonine kinase dont l'activité est étroitement régulée par ses partenaires au sein de complexes protéiques. La protéine mTOR fait partie de deux complexes structurellement et fonctionnellement distincts. Le complexe mTOR I (mTORC1) se compose de mTOR, raptor, mLST8, PRAS40 and DEPTOR. Le complexe mTOR 2 (mTORC2) se compose de rictor, mSIN1, Protor-1, mLST8 et DEPTOR (Lee, 2015). De nombreux autres acteurs intègrent la signalisation en amont ou en aval de mTOR, tel que la NF1, TSC1, PTEN, Vps34 ou encore Rheb.

L'interactome du récepteur 5-HT<sub>6</sub> présente un enrichissement remarquable en protéines appartenant au complexe mTORC1 et à ses voies de signalisation associées.

Le complexe mTORC1 est un régulateur important de nombreuses fonctions cellulaires dont la transcription et la synthèse protéique. De multiples rôles physiologiques lui ont été associés aussi bien à l'âge adulte que durant l'embryogénèse. En particulier, mTOR semble être un acteur crucial de plusieurs étapes du développement du système nerveux. La suppression des résidus responsables de son activité kinase, altère la prolifération des cellules embryonnaires menant au décès des embryons homozygotes pour la mutation (Gangloff et al., 2004; Murakami et al., 2004).

Le complexe mTORC1 apparaît plus particulièrement impliqué dans l'initiation de la différenciation neuronale. En effet, plusieurs études démontrent que mTOR induit l'expression de gènes clefs de la différenciation neuronale. Dans ce sens, l'activité du complexe mTORC1 augmente dans les cellules post-mitotiques qui débutent leur différenciation. De plus, la répression de l'activité de mTORC1 par son inhibiteur endogène, DEPTOR, et par l'inhibition de sa transcription semble nécessaire pour le maintien de la pluripotence des cellules souches neuro-épithéliales (Agrawal et al., 2014; Wang et al., 2013). A l'âge adulte, la stimulation de mTOR serait de la même façon associée à une diminution de la neurogénèse (Magri and Galli, 2013; Mahoney et al., 2016).

Si mTOR semble être une protéine importante pour l'initiation de la différenciation (Easley et al., 2010), elle joue également un rôle critique à chacune des étapes du développement neuronal et la régulation fine de son activité est cruciale pour un développement harmonieux. Son hyperactivation a été notamment associée à des problèmes de migration sévères menant à des expressions neuronales ectopiques et des anomalies de la connectivité (Moon et al., 2015). Des études *in vitro* ont également démontré un rôle central de l'activité de mTORC1 dans la pousse neuritique et la maturation des dendrites (Hsia et al., 2014; Jaworski et al., 2005; Kumar et al., 2005). Ainsi, la complexité dendritique est réduite par un siRNA ciblant la mTOR appliqué à des cultures de neurones d'hippocampe (Jaworski et al., 2005). L'implication de mTORC1 a également été démontrée dans la guidance axonale *via* le contrôle de la transcription de molécules signalétiques clef, comme l'ephrin A, la semaphorin-3 ou la netrin-1. De plus, il a été proposé que le contrôle de la synthèse protéique par mTORC1 pourrait également participer à l'extension de l'axone et des dendrites ainsi qu'à la mobilité du cône de croissance, en influençant la dynamique du cytosquelette d'actine (Takei and Nawa, 2014). Enfin,

l'inhibition de mTOR par la rapamycine diminue le nombre et la longueur des épines dendritiques dans des tranches organotypiques (Kumar et al., 2005; Tavazoie et al., 2005).

Du fait de son rôle majeur dans le développement du système nerveux, des dysfonctionnements du complexe mTORC1 ou des mécanismes cellulaires sous le contrôle de mTOR ont des conséquences sévères qui ont été impliquées dans plusieurs maladies neurodéveloppementales comme la sclérose tubéreuse, le syndrome du X fragile ou le syndrome de Rett. Ces pathologies sont caractérisées par des défauts de migration, des anomalies de positionnement et des altérations de la cytoarchitecture neuronale. Ces atteintes neuro-développementales se traduisent par l'expression d'un grand nombre de symptômes incluant des crises épileptiques, des troubles cognitifs, des troubles du comportement social et un retard mental.

L'ensemble de ces résultats démontre qu'un contrôle précis de l'activité du complexe mTORC1 est essentiel pour une différenciation neuronale harmonieuse. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> pourrait être un élément critique de la régulation de l'activité du complexe mTORC1 durant le développement. En effet, notre équipe a déjà pu mettre en évidence que la modulation pharmacologique du récepteur peut activer ou inhiber la voie mTOR (Meffre et al., 2012). Dans ce contexte, il paraît particulièrement important d'élucider le rôle de l'interaction entre le récepteur 5-HT<sub>6</sub> et les protéines du complexe mTORC1 durant l'embryogénèse.

- **WAVE1**

La protéine WAVE1 (« *(WASP)-family verprolin homologous protein 1* » aussi appelée WASF1 pour « *Wiskott–Aldrich syndrome protein* ») a d'abord été identifiée comme étant le produit d'un gène dont la dysfonction cause le syndrome héréditaire de Wiskott-Aldrich (Blundell et al. 2010). Depuis, cinq autres membres de cette famille ont été identifiés. Tous ont la caractéristique de pouvoir activer le complexe constitué des protéines de nucléation Arp2/3, servant de point de départ à la polymérisation du cytosquelette d'actine (Y. Kim et al. 2006; Zalevsky et al. 2001). La protéine WAVE1 peut également interagir, physiquement et fonctionnellement, avec la protéine Cdc42, une petite GTPase dont l'activité est impliquée dans la pousse neuritique (Miki and Takenawa, 2003). De plus, la protéine WAVE1 est phosphorylée par la Cdk5 et cette phosphorylation inhibe sa capacité à réguler le complexe Arp2/3. Dans des cultures de neurones, la perte de fonction de WAVE1 est corrélée à une diminution du nombre

d'épines dendritiques matures (Y. Kim et al. 2006). La surexpression d'un mutant aspartate, qui mime une phosphorylation constante par la Cdk5, affecte de la même façon la maturation des épines dendritiques alors qu'un mutant alanine (non phosphorylable) restaure une morphologie normale des épines (Y. Kim et al. 2006). Encore une fois, on retrouve une convergence remarquable des effets de différents partenaires physiques et/ou fonctionnels du récepteur 5-HT<sub>6</sub>.

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> semble être réellement au cœur de voies de signalisation interconnectées et hautement impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine. S'il est difficile d'avoir une vue d'ensemble de ces processus, il est fortement probable que le récepteur soit au centre du contrôle de ces dynamiques d'interaction sous-tendant la succession harmonieuse des différentes phases du développement neuronal.

## h. Hyperserotoninergie, troubles du spectre de l'autisme et récepteur 5-HT<sub>6</sub> ?

Le récepteur 5-HT<sub>6</sub> de la sérotonine est donc un acteur central de différentes étapes critiques développement neuronal connues pour être altérées dans certaines maladies psychiatriques telles que les TSA ou la schizophrénie. La question se pose de savoir si des anomalies de la signalisation ou de l'expression du récepteur durant la gestation pourraient induire des défauts neurodéveloppementaux prédisposant à de telles pathologies.

Nous venons de voir que l'activité constitutive du récepteur semble particulièrement importante pour ses fonctions neurodéveloppementales. Il serait donc intéressant, dans un premier temps, d'inhiber cette activité durant le développement en administrant un agoniste inverse du récepteur, pour déterminer si la modulation de l'activité constitutive du récepteur suffit à déclencher des troubles du comportements. Il serait d'autant plus intéressant de réaliser différentes cohortes qui seraient injectées à différents stades du développement. Le récepteur est exprimé chez la souris à partir du jour embryonnaire 11. On pourrait donc imaginer la mise en place de plusieurs protocoles : i) l'injection quotidienne d'un agoniste inverse du récepteur jusqu'à la mise bas, ii) l'injection de l'agoniste inverse durant la première semaine post-natale. Cela permettrait de dissocier la période de migration des

neuroblastes de celle de maturation de l'arborisation dendritique et de synaptogenèse. Nous pourrions, ensuite :

1. Examiner le comportement des souriceaux, en analysant les vocalisations lors de la séparation de la mère afin de déterminer la présence d'un trouble de la communication sociale précoce.
2. Examiner le comportement des animaux adultes grâce à une batterie de tests comportementaux permettant d'évaluer la cognition (mémoire à court et à long terme, mémoire spatiale et flexibilité cognitive), le comportement social, les stéréotypies motrices, le comportement moteur et l'anxiété.
3. Sacrifier et perfuser une partie de la cohorte pour analyser *via* une étude immunohistochimique la présence de défauts de positionnement ou d'anomalies morphologiques des neurones.
4. Sacrifier une seconde partie de la cohorte et prélever les cerveaux (cortex préfrontal, striatum, hippocampe) afin de réaliser des analyses biochimiques des différentes voies de signalisation sous le contrôle du récepteur (mTOR, cAMP, Cdk5).

Si cette première approche donne des résultats, il serait intéressant par la suite de réaliser les mêmes injections subchroniques sur des cohortes de souris 5-HT<sub>6</sub><sup>GFP/GFP</sup> et d'analyser l'interactome du récepteur (dans le striatum, l'hippocampe et le cortex préfrontal) par protéomique. Cela nous permettrait de déterminer si des altérations précoces de la signalisation du récepteur peuvent induire des modifications de son interactome qui perdurent jusqu'à l'âge adulte.

Par ailleurs, parmi les facteurs prédisposant au développement aux troubles psychiatriques d'origine neurodéveloppementale, la sérotonine est souvent désignée comme un élément central. En effet, des perturbations précoces du système sérotoninergique ont été impliquées dans un grand nombre de troubles mentaux (Margoob and Mushtaq, 2011). Outre les variations génétiques, le système sérotoninergique peut être influencé par différents facteurs. Ainsi, de nombreux composés pharmacologiques, comme les antidépresseurs et les antipsychotiques atypiques, modulent directement le système sérotoninergique (« Psychopharmacologie Essentielle 4 Ème Édition » s. d.). Un

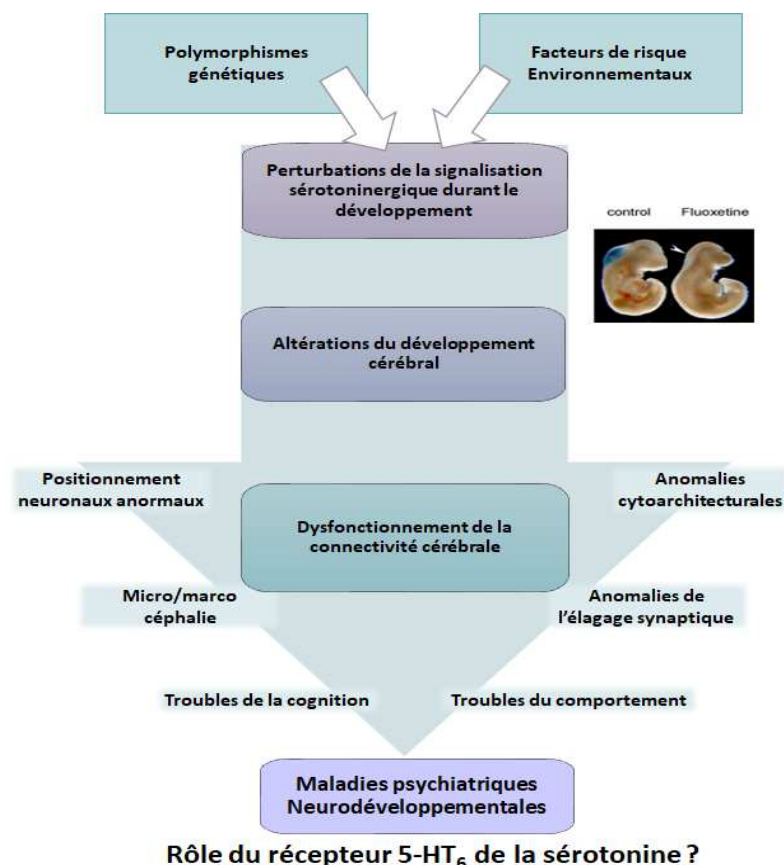
nombre croissant de données indiquent que ces molécules passent la barrière foeto-placentaire et favorisent le développement de malformations congénitales et des troubles psychiatriques (Glover and Clinton, 2016; Singh and Singh, 2017; Terrana et al., 2015). Comme je l'ai évoqué dans l'introduction, l'exposition aux inhibiteurs de la recapture de la sérotonine constitue un facteur de risque majeur pour le développement des TSA (Devlin et al. 2005; Hervás et al. 2014; Huang et Santangelo 2008). De la même façon, les souris qui expriment la forme courte du transporteur de la sérotonine présentent une hypersérotoninergie associée à des troubles du comportement social (Veenstra-VanderWeele et al., 2012).

Comme je l'ai discuté dans l'introduction, l'hypersérotoninergie durant la gestation induit des troubles neurodéveloppementaux importants incluant des anomalies de la prolifération et du positionnement des neuroblastes. En particulier, l'équipe d'Alexandre Dayer a mis en évidence que l'excès de sérotonine altère la migration des neurones pyramidaux et des interneurons du cortex et que ces anomalies de la migration sont dues, au moins en partie, à une dérégulation de l'activité du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (Riccio et al., 2011, 2009). Il a été démontré que les fonctions du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la migration impliquent essentiellement son interaction constitutive (i.e. agoniste indépendante) avec la Cdk5. Cependant, on peut supposer que la concentration en AMPc se doit d'être maintenue dans une fenêtre précise afin d'assurer une migration harmonieuse. Ainsi, une stimulation excessive du récepteur et l'augmentation non-physiologique de la concentration en AMPc qui pourrait en découler pourrait rompre cet équilibre et être à l'origine des troubles de la migration observés. De plus, si on intègre les observations de Riccio et *al.* à notre hypothèse concernant la dynamique d'interaction des partenaires du récepteur, on pourrait supposer que l'excès d'AMPc dû à la sur-stimulation du récepteur active la PKA qui phosphoryle la phosphatase PP2A, qui pourrait déphosphoryler le récepteur et rompre son interaction avec la Cdk5 et ainsi participer à l'altération de la migration. Bien entendu ces hypothèses restent à vérifier, mais il serait néanmoins intéressant de se pencher sur l'implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les troubles du comportement social observés chez les souris dont la mère a été traitée aux inhibiteurs de la recapture de la sérotonine durant la gestation (Kiryanova et al., 2013). Pour étudier cette hypothèse, nous pourrions :



1. Comparer les effets de l'exposition prénatale aux inhibiteurs de la recapture de sérotonine à ceux d'un agoniste spécifique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> sur le comportement et les anomalies du développement.
2. Co-traiter les mères gestantes avec des inhibiteurs de la recapture de sérotonine et un antagoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub> pour déterminer si l'inhibition concomitante du récepteur suffit ou non à restaurer les troubles neurodéveloppementaux et comportementaux causés par l'hypersérotoninergie prénatale.
3. De la même façon que pour les études proposées précédemment, nous pourrions ensuite utiliser les souris 5-HT<sub>6</sub><sup>GFP/GFP</sup> afin d'analyser l'interactome du récepteur dans les différentes conditions expérimentales.

Notons que ces projets avant de pouvoir être développés nécessitent de s'assurer que les composés utilisés passent la barrière foeto-placentaire.



**Figure 43 - Théorie sur l'implication de la sérotonine et du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la genèse des maladies psychiatriques d'origine neurodéveloppementales**

## II. Potentiel thérapeutique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le traitement des TSA

Les TSA regroupent un ensemble de maladies psychiatriques d'origine neuro-développementale caractérisées par des déficits du comportement social et de la communication et la présence de comportements retreints et stéréotypés. A l'heure actuelle, aucun des traitements pharmacologiques disponibles en clinique ne soulage efficacement les difficultés sociales chez les patients atteints de TSA. Il y a donc un besoin urgent de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans cette seconde partie de ma thèse, je me suis intéressée aux effets comportementaux de l'inhibition pharmacologique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> à l'âge adulte dans un modèle préclinique de TSA. J'ai pu mettre en évidence le potentiel thérapeutique d'un antagoniste (et agoniste inverse) du récepteur 5-HT<sub>6</sub> de la sérotonine, le SB258585, pour améliorer l'interaction sociale, les stéréotypies et d'autres symptômes liés à l'autisme. En effet, le traitement subchronique des souris génétiquement déplétées pour le récepteur Mu des opioïdes avec le SB258585 a permis de corriger plusieurs déficits comportementaux chez ces animaux, en particulier restaurer différents paramètres d'interaction sociale, la préférence sociale, l'apprentissage moteur et atténuer certaines stéréotypies motrices. Les résultats obtenus ont cependant été plus mitigés concernant l'inflexibilité cognitive et l'anxiété. Le traitement a par ailleurs fait apparaître des stéréotypies motrices et augmenté l'inflexibilité cognitive des animaux sauvages indiquant un effet délétère sur ces comportements de l'inhibition du récepteur chez des animaux sains.

### a. Le récepteur 5-HT<sub>6</sub>, un rôle dans la récompense ?

On peut noter que les effets les plus forts de l'inhibition du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans ce modèle sont observés sur les comportements sociaux et moteurs. Le récepteur Mu est un acteur central du système de récompense, son invalidation génétique chez la souris induisant notamment un déficit de récompense sociale similaire à ce qui est observé en clinique chez les sujets souffrant de TSA. En effet, l'équipe de Julie le Merrer et Jérôme Becker a démontré un déficit de l'expression du gène *C-FOS* induit par une interaction sociale dans le Nac, chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> comparé aux souris sauvages (Becker et al., 2014). Ce résultat démontre un déficit d'activation du Nac, noyau au cœur du système de

récompense sociale chez ces souris suite à l'exposition à des stimuli sociaux. Si l'implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans la récompense a été peu étudiée, les travaux de l'équipe de John Neumaier démontrent néanmoins que la surexpression du récepteur dans le striatum diminue la récompense associée aux stimuli naturels (sucrose) et aux drogues d'abus (cocaïne) (Brotsky et al. 2016; Eskenazi et Neumaier 2011b). Ainsi, la signalisation associée au récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans le striatum semble avoir un rôle inhibiteur de la récompense. On peut donc supposer que l'inhibition pharmacologique du récepteur augmente la récompense aux stimuli naturels dont fait partie l'interaction sociale. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la restauration du comportement social et de la préférence sociale chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> suite à l'injection subchronique de SB258585. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer si l'expression de *C-FOS* dans le Nac est également restaurée après contact social chez ces animaux. Cela nous permettrait réellement de conclure si l'inhibition du récepteur 5-HT<sub>6</sub> restaure l'activation du système de récompense suite à l'exposition à des stimuli sociaux (i.e. la récompense sociale) chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup>.

Par ailleurs, nous avons observé que les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> expriment un déficit d'apprentissage moteur très marqué dans le test du Rotarod. Un déficit de coordination motrice dans le test du «*catwalk*», qui analyse la marche, a déjà été observée chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> (Becker et al., 2014). Cependant, dans la première session de Rotarod, on n'observe pas de différence significative entre les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> et sauvages injectées avec une solution saline. Il est donc peu probable que ce déficit de coordination motrice puisse expliquer à lui seul le défaut d'apprentissage moteur. L'inhibition subchronique du récepteur 5-HT<sub>6</sub> restaure une capacité d'apprentissage moteur chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> identique à celle des souris sauvages injectées avec une solution saline. De plus, chez les souris sauvages, le SB258585 augmente significativement les performances d'apprentissage moteur. Dans le test du Rotarod, les souris sont entraînées à courir sur une tige rotative, activité qui s'apparente à un exercice physique. L'exercice physique est une activité naturellement récompensante, aussi bien chez les rongeurs que chez l'humain, activant le système méso-cortico-limbique et la sécrétion de dopamine et d'endorphine (Cheval et al., 2018; Greenwood et al., 2011). La composante récompensante est très importante pour l'apprentissage moteur (Leisman et al., 2014). On peut ainsi supposer que, comme pour le comportement social, l'inhibition du récepteur 5-HT<sub>6</sub> restaure les propriétés récompensantes de

l'activité physique chez les souris *Oprm1*<sup>-/-</sup> et augmente la récompense chez les souris sauvages expliquant l'augmentation du temps passé sur le rotarod.

## b. Généralisation à d'autres modèles de TSA ?

Ces données préliminaires, bien que prometteuses, nécessitent une étude plus approfondie afin de déterminer les mécanismes par lesquels le récepteur restaure le comportement social.

D'une part, il faudrait de reproduire cette expérience en utilisant un autre modèle d'autisme pour vérifier que les effets observés ne sont pas spécifiques du modèle *Oprm1*<sup>-/-</sup>. Il est important de souligner que les protéines NF1 et GPRIN1 sont des partenaires communs aux deux récepteurs (Mu et 5-HT<sub>6</sub>). On ne peut donc pas exclure la présence d'une interaction physique (et fonctionnelle) entre ces récepteurs qui, rappelons-le, sont tous deux exprimés dans le striatum. Cette question mériterait d'être explorée mais dépasse cependant le propos de la présente étude.

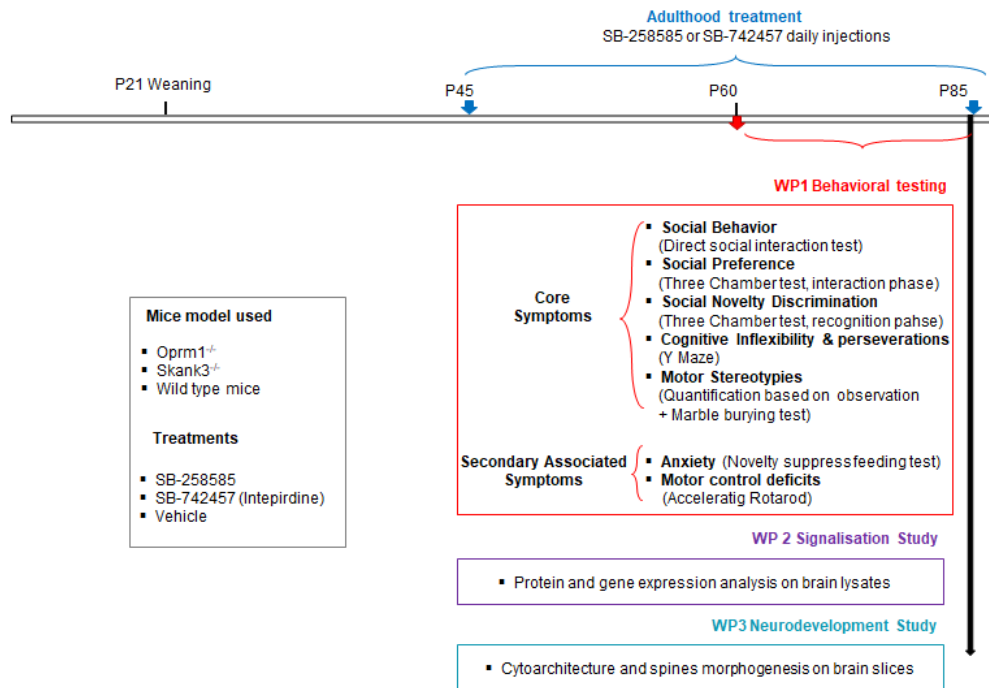
Afin de reproduire nos résultats, il serait intéressant d'utiliser un autre modèle neuro-développemental de TSA comme les souris *Shank3*<sup>-/-</sup>. Shank3, (« *SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3* ») est une protéine d'échafaudage multi domaines exprimée au niveau post-synaptique et reliant les récepteurs membranaires au cytosquelette d'actine. Son rôle a été démontré dans différents processus neurodéveloppementaux et de plasticité comme la formation des synapses et la maturation des épines dendritiques. De nombreuses mutations du gène *SHANK3* ont été associées aux TSA (Li et al., 2012; Uchino and Waga, 2013). Corroborant ces observations, les souris *Shank3*<sup>-/-</sup> présentent des troubles du comportement cohérents avec un phénotype autistique (déficits de sociabilité, toilettes stéréotypés et automutilation) (Peça et al., 2011). De plus, plusieurs études ont mis en évidence des anomalies des synapses dans le striatum et de la connectivité cortio-striatale chez ces souris (Jaramillo et al., 2017; Peça et al., 2011). Une étude récente a également démontré que la protéine Shank3 est cruciale pour la maturation du circuit de récompense sociale (Bariselli et al., 2016). Dans ce contexte, il serait particulièrement pertinent d'étudier les effets de l'inhibition subchronique du récepteur sur les troubles comportementaux des souris *Shank3*<sup>-/-</sup>.

### c. Quels mécanismes moléculaires sous-tendent les effets comportementaux du SB258585 ?

Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'associer ces études comportementales à des analyses moléculaires (signalisation dépendant du récepteur 5-HT<sub>6</sub>, expression de gènes, impliqués dans le complexe de signalisation du récepteur ou dans l'étiopathologie de l'autisme) et morphologiques (arborisation et épines dendritiques) dans différentes régions du cerveau jouant un rôle clef dans la symptomatologie autistique. Ces analyses permettraient de mieux comprendre les mécanismes de signalisation et de plasticité mis en jeu par l'inhibition subchronique du récepteur et d'identifier les mécanismes sous-tendant son rôle dans les TSA.

### d. Un pas vers la clinique : tester l'intépidine

Nos résultats suggèrent que l'inhibition du récepteur 5-HT<sub>6</sub> constitue une piste thérapeutique prometteuse pour le traitement des déficits sociaux dans les TSA. Il serait donc intéressant de compléter nos données par l'analyse des effets de l'intépidine, un autre antagoniste du récepteur 5-HT<sub>6</sub> développé par Axovant, qui est arrivé jusqu'en phase 3 de développement clinique pour le traitement des troubles cognitifs dans la maladie d'Alzheimer et qui est toujours en phase 3 d'étude clinique pour le traitement des déficits cognitifs dans les démences de type Parkinson. Ce travail permettrait d'explorer une piste innovante dans le domaine de la pharmacothérapie des TSA, qui pourrait trouver des applications à court terme grâce au repositionnement dans le domaine de l'autisme d'antagonistes du récepteur 5-HT<sub>6</sub> déjà dans des phases avancées d'études cliniques.



**Figure 44- Déroulement du projet d'étude de l'implication du récepteur 5-HT<sub>6</sub> dans les TSA.** Les souris WT ou Oprm1<sup>-/-</sup> ou Skank3<sup>-/-</sup> seront traitées avec SB258585 ou du SB742457 (1 ou 2,5 mg / kg) ou avec un véhicule au début de la période postnatale (PND1-PND16) ou à l'âge adulte (PND45- PND85, soit 15 jours avant le début des tests comportementaux). Une batterie de tests comportementaux évaluant les symptômes primaires et secondaires des TSA sera effectuée entre PND60-PND85 (WP1). Afin d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents aux effets comportementaux des traitements, la signalisation du récepteur 5-HT<sub>6</sub> (voies mTOR et Cdk5), l'expression génique (WP2) et la morphologie de l'arbre et des épines dendritique (WP3) seront examinés immédiatement à la fin des traitements.

# Bibliographie

- Abraham, R., R. Nirogi, A. Shinde, et V. S. Benade. 2015. « Therapeutic Potential of 5-HT6 Antagonist SB399885 in Traumatic Stress Disorder ». *Drug Research* 65 (8): 442-45. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1390418>.
- Abramson, R. K., H. H. Wright, R. Carpenter, W. Brennan, O. Lumpuy, E. Cole, et S. R. Young. 1989. « Elevated Blood Serotonin in Autistic Probands and Their First-Degree Relatives ». *Journal of Autism and Developmental Disorders* 19 (3): 397-407.
- Agrawal, Pooja, Joseph Reynolds, Shereen Chew, Deepak A. Lamba, et Robert E. Hughes. 2014. « DEPTOR Is a Stemness Factor That Regulates Pluripotency of Embryonic Stem Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (46): 31818-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.565838>.
- Ahn, Jung-Hyuck, Thomas McAvoy, Sergey V. Rakhilin, Akinori Nishi, Paul Greengard, et Angus C. Nairn. 2007. « Protein Kinase A Activates Protein Phosphatase 2A by Phosphorylation of the B56delta Subunit ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (8): 2979-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611532104>.
- Alvares, Gail A., Daniel S. Quintana, et Andrew J. O. Whitehouse. 2017. « Beyond the Hype and Hope: Critical Considerations for Intranasal Oxytocin Research in Autism Spectrum Disorder ». *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research* 10 (1): 25-41. <https://doi.org/10.1002/aur.1692>.
- Alves, Stephen E., Elena Hoskin, Susan J. Lee, Wayne G. Brake, Deveroux Ferguson, Victoria Luine, Patrick B. Allen, Paul Greengard, et Bruce S. McEwen. 2002. « Serotonin Mediates CA1 Spine Density but Is Not Crucial for Ovarian Steroid Regulation of Synaptic Plasticity in the Adult Rat Dorsal Hippocampus ». *Synapse (New York, N.Y.)* 45 (2): 143-51. <https://doi.org/10.1002/syn.10093>.
- Ango, F., L. Prézeau, T. Muller, J. C. Tu, B. Xiao, P. F. Worley, J. P. Pin, J. Bockaert, et L. Fagni. 2001. « Agonist-Independent Activation of Metabotropic Glutamate Receptors by the Intracellular Protein Homer ». *Nature* 411 (6840): 962-65. <https://doi.org/10.1038/35082096>.
- Anrep, G. V., A. Blalock, et Adli Samaan. 1934. « The Effect of Muscular Contraction upon the Blood Flow in the Skeletal Muscle ». *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 114 (788): 223-45.
- Antypa, Niki, Alessandro Serretti, et Dan Rujescu. 2013. « Serotonergic Genes and Suicide: A Systematic Review ». *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 23 (10): 1125-42. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.03.013>.
- Arnt, Jorn, Benny Bang-Andersen, Ben Grayson, Franklin P. Bymaster, Michael P. Cohen, Neil W. DeLapp, Bruno Giethlen, et al. 2010. « Lu AE58054, a 5-HT6 Antagonist, Reverses Cognitive Impairment Induced by Subchronic Phencyclidine in a Novel Object Recognition Test in Rats ». *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 13 (8): 1021-33. <https://doi.org/10.1017/S1461145710000659>.
- Bariselli, Sebastiano, Stamatina Tzanoulinou, Christelle Glangetas, Clément Prévost-Solié, Luca Pucci, Joanna Viguié, Paola Bezzi, et al. 2016. « SHANK3 Controls Maturation of Social Reward Circuits in the VTA ». *Nature Neuroscience* 19 (7): 926-34. <https://doi.org/10.1038/nn.4319>.
- Barr, Christina S., Melanie L. Schwandt, Stephen G. Lindell, J. Dee Higley, Dario Maestripieri, David Goldman, Stephen J. Suomi, et Markus Heilig. 2008. « Variation at the Mu-Opioid Receptor Gene (OPRM1) Influences Attachment Behavior in Infant Primates ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (13): 5277-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710225105>.
- Batty, Nicholas J., Keith K. Fenrich, et Karim Fouad. 2017. « The Role of CAMP and Its Downstream Targets in Neurite Growth in the Adult Nervous System ». *Neuroscience Letters* 652 (juin): 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.033>.
- Becker, Jérôme A. J., Daniel Clesse, Coralie Spiegelhalter, Yannick Schwab, Julie Le Merrer, et Brigitte L. Kieffer. 2014. « Autistic-like Syndrome in Mu Opioid Receptor Null Mice Is Relieved by Facilitated mGluR4 Activity ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39 (9): 2049-60. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.59>.
- Becker, Jérôme A. J., Brigitte L. Kieffer, et Julie Le Merrer. 2017. « Differential Behavioral and Molecular Alterations upon Protracted Abstinence from Cocaine versus Morphine, Nicotine, THC and Alcohol ». *Addiction Biology* 22 (5): 1205-17. <https://doi.org/10.1111/adb.12405>.

- Beffert, Uwe, Edwin J. Weeber, Gerardo Morfini, Jane Ko, Scott T. Brady, Li-Huei Tsai, J. David Sweatt, et Joachim Herz. 2004. « Reelin and Cyclin-Dependent Kinase 5-Dependent Signals Cooperate in Regulating Neuronal Migration and Synaptic Transmission ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (8): 1897-1906. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4084-03.2004>.
- Bengel, D., D. L. Murphy, A. M. Andrews, C. H. Wichems, D. Feltner, A. Heils, R. Mössner, H. Westphal, et K. P. Lesch. 1998. « Altered Brain Serotonin Homeostasis and Locomotor Insensitivity to 3, 4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in Serotonin Transporter-Deficient Mice ». *Molecular Pharmacology* 53 (4): 649-55.
- Bijata, Monika, Josephine Labus, Daria Guseva, Michał Stawarski, Malte Butzlaff, Joanna Dzwonek, Jenny Schneeberg, et al. 2017. « Synaptic Remodeling Depends on Signaling between Serotonin Receptors and the Extracellular Matrix ». *Cell Reports* 19 (9): 1767-82. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.023>.
- Blundell, Michael P., Austen Worth, Gerben Bouma, et Adrian J. Thrasher. 2010. « The Wiskott-Aldrich Syndrome: The Actin Cytoskeleton and Immune Cell Function ». *Disease markers* 29 (3-4): 157-75. <https://doi.org/10.3233/DMA-2010-0735>.
- Bockaert, Joël, Aline Dumuis, Laurent Fagni, et Philippe Marin. 2004. « GPCR-GIP Networks: A First Step in the Discovery of New Therapeutic Drugs? » *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 7 (5): 649-57.
- Bockaert, Joël, Laurent Fagni, Aline Dumuis, et Philippe Marin. 2004. « GPCR Interacting Proteins (GIP) ». *Pharmacology & Therapeutics* 103 (3): 203-21. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.06.004>.
- Bockaert, Joël, et Philippe Marin. 2015. « MTOR in Brain Physiology and Pathologies ». *Physiological Reviews* 95 (4): 1157-87. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2014>.
- Boess, F. G., F. J. Monsma, C. Carolo, V. Meyer, A. Rudler, C. Zwingelstein, et A. J. Sleight. 1997. « Functional and Radioligand Binding Characterization of Rat 5-HT<sub>6</sub> Receptors Stably Expressed in HEK293 Cells ». *Neuropharmacology* 36 (4-5): 713-20.
- Boess, F. G., C. Riemer, M. Bös, J. Bentley, A. Bourson, et A. J. Sleight. 1998. « The 5-Hydroxytryptamine<sub>6</sub> Receptor-Selective Radioligand [<sup>3</sup>H]Ro 63-0563 Labels 5-Hydroxytryptamine Receptor Binding Sites in Rat and Porcine Striatum ». *Molecular Pharmacology* 54 (3): 577-83.
- Bonnin, Alexandre, Nick Goeden, Kevin Chen, Melissa L. Wilson, Jennifer King, Jean C. Shih, Randy D. Blakely, Evan S. Deneris, et Pat Levitt. 2011. « A Transient Placental Source of Serotonin for the Fetal Forebrain ». *Nature* 472 (7343): 347-50. <https://doi.org/10.1038/nature09972>.
- Bordelon, Jill R., Yoland Smith, Angus C. Nairn, Roger J. Colbran, Paul Greengard, et E. Chris Muly. 2005. « Differential Localization of Protein Phosphatase-1alpha, Beta and Gamma1 Isoforms in Primate Prefrontal Cortex ». *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 15 (12): 1928-37. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhi070>.
- Bortolato, Marco, Sean C. Godar, Loai Alzghoul, Junlin Zhang, Ryan D. Darling, Kimberly L. Simpson, Valentina Bini, et al. 2013. « Monoamine Oxidase A and A/B Knockout Mice Display Autistic-like Features ». *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 16 (4): 869-88. <https://doi.org/10.1017/S1461145712000715>.
- Brailov, I., M. Bancila, M. J. Brisorgueil, M. C. Miquel, M. Hamon, et D. Vergé. 2000. « Localization of 5-HT<sub>6</sub> Receptors at the Plasma Membrane of Neuronal Cilia in the Rat Brain ». *Brain Research* 872 (1-2): 271-75.
- Brodsky, Matthew, Alec W. Gibson, Denis Smirnov, Sunila G. Nair, et John F. Neumaier. 2016. « Striatal 5-HT<sub>6</sub> Receptors Regulate Cocaine Reinforcement in a Pathway-Selective Manner ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 41 (9): 2377-87. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.45>.
- Brodsky, Matthew, Adam J. Lesiak, Alex Croicu, Nathalie Cohenca, Jane M. Sullivan, et John F. Neumaier. 2017. « 5-HT<sub>6</sub> Receptor Blockade Regulates Primary Cilia Morphology in Striatal Neurons ». *Brain Research*, janvier. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.01.010>.
- Bruin, N. M. W. J. de, M. van Drimmelen, M. Kops, J. van Elk, M. Middelveld-van de Wetering, et I. Schwienbacher. 2013. « Effects of Risperidone, Clozapine and the 5-HT<sub>6</sub> Antagonist GSK-742457 on PCP-Induced Deficits in Reversal Learning in the Two-Lever Operant Task in Male Sprague Dawley Rats ». *Behavioural Brain Research* 244 (mai): 15-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.01.035>.
- Bruin, N. M. W. J. de, A. van Loevezijn, K. M. Wicke, M. de Haan, J. Venhorst, J. H. M. Lange, L. de Groote, et al. 2016. « The Selective 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonist SLV Has Putative Cognitive- and Social Interaction Enhancing Properties in Rodent Models of Cognitive Impairment ». *Neurobiology of Learning and Memory* 133 (juin): 100-117. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.020>.
- Burkett, James P., Lauren L. Spiegel, Kiyoshi Inoue, Anne Z. Murphy, et Larry J. Young. 2011. « Activation of  $\mu$ -Opioid Receptors in the Dorsal Striatum Is Necessary for Adult Social Attachment in Monogamous Prairie Voles ».



- Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 36 (11): 2200-2210. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.117>.
- Butler, M. G., M. J. Dasouki, X.-P. Zhou, Z. Talebizadeh, M. Brown, T. N. Takahashi, J. H. Miles, et al. 2005. « Subset of Individuals with Autism Spectrum Disorders and Extreme Macrocephaly Associated with Germline PTEN Tumour Suppressor Gene Mutations ». *Journal of Medical Genetics* 42 (4): 318-21. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.024646>.
- Calcagnetti, D. J., et M. D. Schechter. 1992. « Place Conditioning Reveals the Rewarding Aspect of Social Interaction in Juvenile Rats ». *Physiology & Behavior* 51 (4): 667-72.
- Carden, S. E., G. A. Barr, et M. A. Hofer. 1991. « Differential Effects of Specific Opioid Receptor Agonists on Rat Pup Isolation Calls ». *Brain Research. Developmental Brain Research* 62 (1): 17-22.
- Carr, Gregory V., Lee E. Schechter, et Irwin Lucki. 2011. « Antidepressant and Anxiolytic Effects of Selective 5-HT<sub>6</sub> Receptor Agonists in Rats ». *Psychopharmacology* 213 (2-3): 499-507. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1798-7>.
- Carrel, Damien, Yangzhou Du, Daniel Komlos, Norell M. Hadzimichalis, Munjin Kwon, Bo Wang, Linda M. Brzustowicz, et Bonnie L. Firestein. 2009. « NOS1AP Regulates Dendrite Patterning of Hippocampal Neurons through a Carboxypeptidase E-Mediated Pathway ». *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (25): 8248. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5287-08.2009>.
- Charnay, Yves, et Lucienne Léger. 2010. « Brain Serotonergic Circuitries ». *Dialogues in Clinical Neuroscience* 12 (4): 471-87.
- Chen, Fenghua, Kristian Gaarn du Jardin, Jessica A. Waller, Connie Sanchez, Jens R. Nyengaard, et Gregers Wegener. 2016. « Vortioxetine Promotes Early Changes in Dendritic Morphology Compared to Fluoxetine in Rat Hippocampus ». *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 26 (2): 234-45. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.12.018>.
- Chen, L. T., A. G. Gilman, et T. Kozasa. 1999. « A Candidate Target for G Protein Action in Brain ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (38): 26931-38.
- Cheng, Aiwu, Anna L. Scott, Bruce Ladenheim, Kevin Chen, Xin Ouyang, Justin D. Lathia, Mohamed Mughal, Jean Lud Cadet, Mark P. Mattson, et Jean C. Shih. 2010. « Monoamine Oxidases Regulate Telencephalic Neural Progenitors in Late Embryonic and Early Postnatal Development ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (32): 10752-62. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2037-10.2010>.
- Cheval, Boris, Rémi Radel, Jason L. Neva, Lara A. Boyd, Stephan P. Swinnen, David Sander, et Matthieu P. Boisgontier. 2018. « Behavioral and Neural Evidence of the Rewarding Value of Exercise Behaviors: A Systematic Review ». *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, mars. <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0898-0>.
- Chevallier, Coralie, Gregor Kohls, Vanessa Troiani, Edward S. Brodtkin, et Robert T. Schultz. 2012. « The Social Motivation Theory of Autism ». *Trends in Cognitive Sciences* 16 (4): 231-39. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2012.02.007>.
- Cho, In Hee, Hee Jeong Yoo, Mira Park, Young Sik Lee, et Soon Ae Kim. 2007. « Family-Based Association Study of 5-HTTLPR and the 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Gene Polymorphisms with Autism Spectrum Disorder in Korean Trios ». *Brain Research* 1139 (mars): 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.002>.
- Chu, P. J., H. Saito, et K. Abe. 1994. « Polyamines Promote Neurite Elongation of Cultured Rat Hippocampal Neurons ». *Neuroscience Research* 19 (2): 155-60.
- Codony, Xavier, Javier Burgueño, Maria Javier Ramírez, et José Miguel Vela. 2010. « 5-HT<sub>6</sub> Receptor Signal Transduction Second Messenger Systems ». *International Review of Neurobiology* 94: 89-110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384976-2.00004-6>.
- Contreras-Vallejos, Erick, Elías Utreras, Daniel A. Bórquez, Michaela Prochazkova, Anita Terse, Howard Jaffe, Andrea Toledo, et al. 2014. « Searching for Novel Cdk5 Substrates in Brain by Comparative Phosphoproteomics of Wild Type and Cdk5<sup>-/-</sup> Mice ». *PLoS One* 9 (3): e90363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090363>.
- Cook, E. H., R. Courchesne, C. Lord, N. J. Cox, S. Yan, A. Lincoln, R. Haas, E. Courchesne, et B. L. Leventhal. 1997. « Evidence of Linkage between the Serotonin Transporter and Autistic Disorder ». *Molecular Psychiatry* 2 (3): 247-50.
- Cook, E. H., B. L. Leventhal, W. Heller, J. Metz, M. Wainwright, et D. X. Freedman. 1990. « Autistic Children and Their First-Degree Relatives: Relationships between Serotonin and Norepinephrine Levels and Intelligence ». *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 2 (3): 268-74. <https://doi.org/10.1176/jnp.2.3.268>.
- Copf, Tijana. 2015. « Importance of Gene Dosage in Controlling Dendritic Arbor Formation during Development ». *The European Journal of Neuroscience* 42 (6): 2234-49. <https://doi.org/10.1111/ejn.13002>.
- Côté, Francine, Cécile Fligny, Elisa Bayard, Jean-Marie Launay, Michael D. Gershon, Jacques Mallet, et Guilain Vodjdani. 2007. « Maternal Serotonin Is Crucial for Murine Embryonic Development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (1): 329-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606722104>.

- Courchesne, Eric, Peter R. Mouton, Michael E. Calhoun, Katerina Semendeferi, Clelia Ahrens-Barbeau, Melodie J. Hallet, Cynthia Carter Barnes, et Karen Pierce. 2011. « Neuron Number and Size in Prefrontal Cortex of Children with Autism ». *JAMA* 306 (18): 2001-10. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1638>.
- Courchesne, Eric, Karen Pierce, Cynthia M. Schumann, Elizabeth Redcay, Joseph A. Buckwalter, Daniel P. Kennedy, et John Morgan. 2007. « Mapping Early Brain Development in Autism ». *Neuron* 56 (2): 399-413. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.016>.
- Coutinho, A. M., G. Oliveira, T. Morgadinho, C. Fesel, T. R. Macedo, C. Bento, C. Marques, et al. 2004. « Variants of the Serotonin Transporter Gene (SLC6A4) Significantly Contribute to Hyperserotonemia in Autism ». *Molecular Psychiatry* 9 (3): 264-71. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001409>.
- Cowan, W. M., J. W. Fawcett, D. D. O'Leary, et B. B. Stanfield. 1984. « Regressive Events in Neurogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 225 (4668): 1258-65.
- Da Silva Costa-Aze, Virginie, Anne Quiedeville, Michel Boulouard, et François Dauphin. 2012. « 5-HT6 Receptor Blockade Differentially Affects Scopolamine-Induced Deficits of Working Memory, Recognition Memory and Aversive Learning in Mice ». *Psychopharmacology* 222 (1): 99-115. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2627-3>.
- Dahlstroem, A., K. Fuxe, L. Olson, et U. Ungerstedt. 1964. « ASCENDING SYSTEMS OF CATECHOLAMINE NEURONS FROM THE LOWER BRAIN STEM ». *Acta Physiologica Scandinavica* 62 (décembre): 485-86. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1964.tb10446.x>.
- Dawson, L A, H Q Nguyen, et P Li. 2000. « In vivo effects of the 5-HT6 antagonist SB-271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate ». *British Journal of Pharmacology* 130 (1): 23-26. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703288>.
- Dayer, Alexandre G., Moritz Jacobshagen, Séverine Chaumont-Dubel, et Philippe Marin. 2015. « 5-HT6 Receptor: A New Player Controlling the Development of Neural Circuits ». *ACS Chemical Neuroscience* 6 (7): 951-60. <https://doi.org/10.1021/cn500326z>.
- Del'Guidice, Thomas, Francis Lemay, Morgane Lemasson, Jean Levasseur-Moreau, Stella Manta, Adeline Etievant, Guy Escoffier, François Y. Doré, François S. Roman, et Jean-Martin Beaulieu. 2014. « Stimulation of 5-HT2C Receptors Improves Cognitive Deficits Induced by Human Tryptophan Hydroxylase 2 Loss of Function Mutation ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39 (5): 1125-34. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.313>.
- Deneris, Evan, et Patricia Gaspar. 2017. « Serotonin Neuron Development: Shaping Molecular and Structural Identities ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, octobre. <https://doi.org/10.1002/wdev.301>.
- Deraredj Nadim, Wissem, Séverine Chaumont-Dubel, Fahima Madouri, Laetitia Cobret, Marie-Ludivine De Tazua, Pawel Zajdel, Hélène Bénédetti, Philippe Marin, et Séverine Morisset-Lopez. 2016a. « Physical Interaction between Neurofibromin and Serotonin 5-HT6 Receptor Promotes Receptor Constitutive Activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (43): 12310-15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600914113>.
- . 2016b. « Physical Interaction between Neurofibromin and Serotonin 5-HT6 Receptor Promotes Receptor Constitutive Activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (43): 12310-15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600914113>.
- Devlin, B., E. H. Cook, H. Coon, G. Dawson, E. L. Grigorenko, W. McMahon, N. Minshew, et al. 2005. « Autism and the Serotonin Transporter: The Long and Short of It ». *Molecular Psychiatry* 10 (12): 1110-16. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001724>.
- Dölen, Gül. 2015. « Autism: Oxytocin, Serotonin, and Social Reward ». *Social Neuroscience* 10 (5): 450-65. <https://doi.org/10.1080/17470919.2015.1087875>.
- Dölen, Gül, Ayeh Darvishzadeh, Kee Wui Huang, et Robert C. Malenka. 2013. « Social reward requires coordinated activity of accumbens oxytocin and 5HT ». *Nature* 501 (7466): 179-84. <https://doi.org/10.1038/nature12518>.
- Dotti, C. G., C. A. Sullivan, et G. A. Banker. 1988. « The Establishment of Polarity by Hippocampal Neurons in Culture ». *Journal of Neuroscience* 8 (4): 1454-68.
- Duhr, Fanny, Paul Délérès, Fabrice Raynaud, Martial Séveno, Séverine Morisset-Lopez, Clotilde Mannoury la Cour, Mark J. Millan, Joël Bockaert, Philippe Marin, et Séverine Chaumont-Dubel. 2014. « Cdk5 Induces Constitutive Activation of 5-HT6 Receptors to Promote Neurite Growth ». *Nature Chemical Biology* 10 (7): 590-97. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1547>.
- Durig, J., et J. P. Hornung. 2000. « Neonatal Serotonin Depletion Affects Developing and Mature Mouse Cortical Neurons ». *Neuroreport* 11 (4): 833-37.

- Easley, Charles A., Ahmi Ben-Yehudah, Carrie J. Redinger, Stacie L. Oliver, Sandra T. Varum, Vonya M. Eisinger, Diane L. Carlisle, Peter J. Donovan, et Gerald P. Schatten. 2010. « MTOR-Mediated Activation of P70 S6K Induces Differentiation of Pluripotent Human Embryonic Stem Cells ». *Cellular Reprogramming* 12 (3): 263-73. <https://doi.org/10.1089/cell.2010.0011>.
- East, Simon Z., Philip W. J. Burnet, Ronald A. Leslie, Jennifer C. Roberts, et Paul J. Harrison. 2002. « 5-HT6 Receptor Binding Sites in Schizophrenia and Following Antipsychotic Drug Administration: Autoradiographic Studies with [<sup>125</sup>I]SB-258585 ». *Synapse (New York, N.Y.)* 45 (3): 191-99. <https://doi.org/10.1002/syn.10097>.
- Eaton, Jennifer L., Laura Roache, Khanhbao N. Nguyen, Bruce S. Cushing, Emma Troyer, Eros Papademetriou, et Mary Ann Raghanti. 2012. « Organizational Effects of Oxytocin on Serotonin Innervation ». *Developmental Psychobiology* 54 (1): 92-97. <https://doi.org/10.1002/dev.20566>.
- Ecker, Christine. 2017. « The Neuroanatomy of Autism Spectrum Disorder: An Overview of Structural Neuroimaging Findings and Their Translatability to the Clinical Setting ». *Autism: The International Journal of Research and Practice* 21 (1): 18-28. <https://doi.org/10.1177/1362361315627136>.
- Eskenazi, Daniel, et John F. Neumaier. 2011a. « Increased Expression of the 5-HT6 Receptor by Viral Mediated Gene Transfer into Posterior but Not Anterior Dorsomedial Striatum Interferes with Acquisition of a Discrete Action-Outcome Task ». *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)* 25 (7): 944-51. <https://doi.org/10.1177/0269881110388330>.
- . 2011b. « Increased Expression of the 5-HT6 Receptor by Viral Mediated Gene Transfer into Posterior but Not Anterior Dorsomedial Striatum Interferes with Acquisition of a Discrete Action-Outcome Task ». *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)* 25 (7): 944-51. <https://doi.org/10.1177/0269881110388330>.
- Ferguson, Susan M., Ellen S. Mitchell, et John F. Neumaier. 2008. « Increased Expression of 5-HT6 Receptors in the Nucleus Accumbens Blocks the Rewarding but Not Psychomotor Activating Properties of Cocaine ». *Biological Psychiatry* 63 (2): 207-13. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.02.018>.
- Feria-Velasco, Alfredo, Alma Rosa del Angel, et Ignacio Gonzalez-Burgos. 2002. « Modification of Dendritic Development ». *Progress in Brain Research* 136: 135-43.
- Fisas, Angels, Xavier Codony, Gonzalo Romero, Alberto Dordal, Jesus Giraldo, Ramon Mercé, Jörg Holenz, David Heal, Helmut Buschmann, et Petrus Johan Pauwels. 2006. « Chronic 5-HT6 receptor modulation by E-6837 induces hypophagia and sustained weight loss in diet-induced obese rats ». *British Journal of Pharmacology* 148 (7): 973-83. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706807>.
- Fischer, Adrian G., et Markus Ullsperger. 2017. « An Update on the Role of Serotonin and Its Interplay with Dopamine for Reward ». *Frontiers in Human Neuroscience* 11: 484. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00484>.
- Fletcher, T. L., et G. A. Banker. 1989. « The Establishment of Polarity by Hippocampal Neurons: The Relationship between the Stage of a Cell's Development in Situ and Its Subsequent Development in Culture ». *Developmental Biology* 136 (2): 446-54.
- Fone, Kevin C. F., et M. Veronica Porkess. 2008. « Behavioural and Neurochemical Effects of Post-Weaning Social Isolation in Rodents-Relevance to Developmental Neuropsychiatric Disorders ». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32 (6): 1087-1102. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.003>.
- Forrest, Marc P., Euan Parnell, et Peter Penzes. 2018. « Dendritic Structural Plasticity and Neuropsychiatric Disease ». *Nature Reviews. Neuroscience* 19 (4): 215-34. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.16>.
- Frazer, S., K. Otomo, et A. Dayer. 2015. « Early-Life Serotonin Dysregulation Affects the Migration and Positioning of Cortical Interneuron Subtypes ». *Translational Psychiatry* 5 (septembre): e644. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.147>.
- Fricke, Ashwana D., Carl Rios, Lakshmi A. Devi, et Ivone Gomes. 2005. « Serotonin Receptor Activation Leads to Neurite Outgrowth and Neuronal Survival ». *Brain Research. Molecular Brain Research* 138 (2): 228-35. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.04.016>.
- Frith, Chris. 2003. « What Do Imaging Studies Tell Us about the Neural Basis of Autism? » *Novartis Foundation Symposium* 251: 149-66; discussion 166-176, 281-97.
- . 2004. « Is Autism a Disconnection Disorder? » *The Lancet. Neurology* 3 (10): 577. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00875-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00875-0).
- Fullerton, Terence, Brendon Binneman, William David, Marielle Delnomdedieu, James Kupiec, Peter Lockwood, Jessica Mancuso, Jeffrey Miceli, et Joanne Bell. 2018. « A Phase 2 clinical trial of PF-05212377 (SAM-760) in subjects with mild to moderate Alzheimer's disease with existing neuropsychiatric symptoms on a stable daily dose of donepezil ». *Alzheimer's Research & Therapy* 10 (avril). <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0368-9>.

- Gaddum, J. H., et Z. P. Picarelli. 1957. « TWO KINDS OF TRYPTAMINE RECEPTOR ». *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 12 (3): 323-28. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1957.tb00142.x>.
- Gadow, Kenneth D., Carla J. DeVincent, Victoria I. Siegal, Doreen M. Olvet, Saniya Kibria, Sarah F. Kirsch, et Eli Hatchwell. 2013. « Allele-Specific Associations of 5-HTTLPR/Rs25531 with ADHD and Autism Spectrum Disorder ». *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 40 (janvier): 292-97. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.10.019>.
- Gangloff, Yann-Gaël, Matthias Mueller, Stephen G. Dann, Petr Svoboda, Melanie Sticker, Jean-Francois Spetz, Sung Hee Um, et al. 2004. « Disruption of the Mouse MTOR Gene Leads to Early Postimplantation Lethality and Prohibits Embryonic Stem Cell Development ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (21): 9508-16. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9508-9516.2004>.
- Garg, Shruti, Jonathan Green, Kathy Leadbitter, Richard Emsley, Annukka Lehtonen, D. Gareth Evans, et Susan M. Huson. 2013. « Neurofibromatosis Type 1 and Autism Spectrum Disorder ». *Pediatrics* 132 (6): e1642-48. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-1868>.
- Ge, Xin, Yu Qiu, Horace H. Loh, et Ping-Yee Law. 2009. « GRIN1 Regulates Micro-Opioid Receptor Activities by Tethering the Receptor and G Protein in the Lipid Raft ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (52): 36521-34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024109>.
- Gemmel, Mary, Eszter Bögi, Christina Ragan, Mariah Hazlett, Michal Dubovicky, Daniel L. van den Hove, Tim F. Oberlander, Thierry D. Charlier, et Jodi L. Pawluski. 2017. « Perinatal Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Medication (SSRI) Effects on Social Behaviors, Neurodevelopment and the Epigenome ». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, mai. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.023>.
- « Gene: Htr6 (ENSMUSG00000028747) - Summary - Mus musculus - Ensembl genome browser 92 ». s. d. Consulté le 14 avril 2018. [http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Gene/Summary?g=ENSMUSG00000028747;r=4:139061108-139075570](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?g=ENSMUSG00000028747;r=4:139061108-139075570).
- Gérard, C., M. P. Martres, K. Lefèvre, M. C. Miquel, D. Vergé, L. Lanfumey, E. Doucet, M. Hamon, et S. el Mestikawy. 1997. « Immuno-Localization of Serotonin 5-HT6 Receptor-like Material in the Rat Central Nervous System ». *Brain Research* 746 (1-2): 207-19.
- Gérard, C., S. el Mestikawy, C. Lebrand, J. Adrien, M. Ruat, E. Traiffort, M. Hamon, et M. P. Martres. 1996. « Quantitative RT-PCR Distribution of Serotonin 5-HT6 Receptor MRNA in the Central Nervous System of Control or 5,7-Dihydroxytryptamine-Treated Rats ». *Synapse (New York, N.Y.)* 23 (3): 164-73. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199607\)23:3<164::AID-SYN5>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199607)23:3<164::AID-SYN5>3.0.CO;2-6).
- Gerhardt, C. C., et H. van Heerikhuizen. 1997. « Functional Characteristics of Heterologously Expressed 5-HT Receptors ». *European Journal of Pharmacology* 334 (1): 1-23.
- Gilles, Christian, et Stéphane Ertlé. 2000. « Pharmacological models in Alzheimer's disease research ». *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2 (3): 247-55.
- Glausier, Jill R., et David A. Lewis. 2013. « Dendritic Spine Pathology in Schizophrenia ». *Neuroscience* 251 (octobre): 90-107. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.044>.
- Glover, Matthew E., et Sarah M. Clinton. 2016. « Of Rodents and Humans: A Comparative Review of the Neurobehavioral Effects of Early Life SSRI Exposure in Preclinical and Clinical Research ». *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 51 (juin): 50-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.04.008>.
- Goldberg, J. I., L. R. Mills, et S. B. Kater. 1991. « Novel Effects of Serotonin on Neurite Outgrowth in Neurons Cultured from Embryos of *Helisoma Trivolvis* ». *Journal of Neurobiology* 22 (2): 182-94. <https://doi.org/10.1002/neu.480220208>.
- González-Burgos, I., A. R. del Angel-Meza, G. Barajas-López, et A. Feria-Velasco. 1996. « Tryptophan Restriction Causes Long-Term Plastic Changes in Corticofrontal Pyramidal Neurons ». *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 14 (5): 673-79.
- González-Maeso, Javier, Rosalind L. Ang, Tony Yuen, Pokman Chan, Noelia V. Weisstaub, Juan F. López-Giménez, Mingming Zhou, et al. 2008. « Identification of a Serotonin/Glutamate Receptor Complex Implicated in Psychosis ». *Nature* 452 (7183): 93-97. <https://doi.org/10.1038/nature06612>.
- Göthert, Manfred. 2013. « Serotonin Discovery and Stepwise Disclosure of 5-HT Receptor Complexity over Four Decades. Part I. General Background and Discovery of Serotonin as a Basis for 5-HT Receptor Identification ». *Pharmacological Reports: PR* 65 (4): 771-86.

- Gould, E. 1999. « Serotonin and Hippocampal Neurogenesis ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 21 (2 Suppl): 46S-51S. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00045-7).
- Gravias, Andreas, Judit Laszy, Malgorzata Pietraszek, Katalin Sághy, Jens Nagel, Caroline Chambon, Nico Wegener, Barbara Valastro, Wojciech Danysz, et István Gyertyán. 2011. « Effects of 5-HT6 Antagonists, Ro-4368554 and SB-258585, in Tests Used for the Detection of Cognitive Enhancement and Antipsychotic-like Activity ». *Behavioural Pharmacology* 22 (2): 122-35. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e328343d804>.
- Greenwood, Benjamin N., Teresa E. Foley, Tony V. Le, Paul V. Strong, Alice B. Loughridge, Heidi E. W. Day, et Monika Fleshner. 2011. « Long-Term Voluntary Wheel Running Is Rewarding and Produces Plasticity in the Mesolimbic Reward Pathway ». *Behavioural Brain Research* 217 (2): 354-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.005>.
- Grimaldi, B., A. Bonnin, M. P. Fillion, M. Ruat, E. Traiffort, et G. Fillion. 1998. « Characterization of 5-HT6 Receptor and Expression of 5-HT6 mRNA in the Rat Brain during Ontogenetic Development ». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 357 (4): 393-400.
- Guadiana, Sarah M., Susan Semple-Rowland, Daniel Daroszewski, Irina Madorsky, Joshua J. Breunig, Kirk Mykytyn, et Matthew R. Sarkisian. 2013. « Arborization of Dendrites by Developing Neocortical Neurons Is Dependent on Primary Cilia and Type 3 Adenylyl Cyclase ». *The Journal of Neuroscience* 33 (6): 2626-38. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2906-12.2013>.
- Gulledge, Allan T., Björn M. Kampa, et Greg J. Stuart. 2005. « Synaptic Integration in Dendritic Trees ». *Journal of Neurobiology* 64 (1): 75-90. <https://doi.org/10.1002/neu.20144>.
- Hamon, M., E. Doucet, K. Lefèvre, M. C. Miquel, L. Lanfumey, R. Insausti, D. Frechilla, J. Del Rio, et D. Vergé. 1999. « Antibodies and Antisense Oligonucleotide for Probing the Distribution and Putative Functions of Central 5-HT6 Receptors ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 21 (2 Suppl): 68S-76S. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00044-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00044-5).
- Hannon, Jason, et Daniel Hoyer. 2008. « Molecular Biology of 5-HT Receptors ». *Behavioural Brain Research* 195 (1): 198-213. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.020>.
- Hatcher, Paula D., Verity J. Brown, David S. Tait, Simon Bate, Philip Overend, Jim J. Hagan, et Declan N. C. Jones. 2005. « 5-HT6 Receptor Antagonists Improve Performance in an Attentional Set Shifting Task in Rats ». *Psychopharmacology* 181 (2): 253-59. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2261-z>.
- Hatten, M. E. 1993. « The Role of Migration in Central Nervous System Neuronal Development ». *Current Opinion in Neurobiology* 3 (1): 38-44.
- Häusser, M., N. Spruston, et G. J. Stuart. 2000. « Diversity and Dynamics of Dendritic Signaling ». *Science (New York, N.Y.)* 290 (5492): 739-44.
- Heal, D. J., S. L. Smith, A. Fisas, X. Codony, et H. Buschmann. 2008. « Selective 5-HT6 receptor ligands: Progress in the development of a novel pharmacological approach to the treatment of obesity and related metabolic disorders ». *Pharmacology & Therapeutics* 117 (2): 207-31. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.08.006>.
- Heal, David, Jane Gosden, et Sharon Smith. 2011. « The 5-HT6 Receptor as a Target for Developing Novel Antiobesity Drugs ». In *International Review of Neurobiology*, édité par Franco Borsini, 96:73-109. Pharmacology of 5-HT6 Receptors, Part II. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385902-0.00004-8>.
- Herrick, Kjartan F., Arne Mørk, Nelly Richard, Christoffer Bundgaard, Jesper F. Bastlund, et Inge E. M. de Jong. 2016. « The 5-HT6 Receptor Antagonist Idalopirdine Potentiates the Effects of Acetylcholinesterase Inhibition on Neuronal Network Oscillations and Extracellular Acetylcholine Levels in the Rat Dorsal Hippocampus ». *Neuropharmacology* 107 (août): 351-63. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.043>.
- Hervás, Amaia, Claudio Toma, Patricia Romarís, Marta Ribasés, Marta Salgado, Mònica Bayes, Noemí Balmaña, et al. 2014. « The Involvement of Serotonin Polymorphisms in Autistic Spectrum Symptomatology ». *Psychiatric Genetics* 24 (4): 158-63. <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000034>.
- Hirano, Kazufumi, Thomas M. Piers, Kirsten L. Searle, Neil D. Miller, A. Richard Rutter, et Paul F. Chapman. 2009. « Procognitive 5-HT6 Antagonists in the Rat Forced Swimming Test: Potential Therapeutic Utility in Mood Disorders Associated with Alzheimer's Disease ». *Life Sciences* 84 (15-16): 558-62. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.01.019>.
- Hirst, W. D., J. A. Minton, S. M. Bromidge, S. F. Moss, A. J. Latter, G. Riley, C. Routledge, D. N. Middlemiss, et G. W. Price. 2000. « Characterization of [(125)I]-SB-258585 Binding to Human Recombinant and Native 5-HT(6) Receptors in Rat, Pig and Human Brain Tissue ». *British Journal of Pharmacology* 130 (7): 1597-1605. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703458>.

- Hirst, Warren D., Bjarke Abrahamsen, Frank E. Blaney, Andrew R. Calver, Lucia Aloj, Gary W. Price, et Andrew D. Medhurst. 2003. « Differences in the Central Nervous System Distribution and Pharmacology of the Mouse 5-Hydroxytryptamine-6 Receptor Compared with Rat and Human Receptors Investigated by Radioligand Binding, Site-Directed Mutagenesis, and Molecular Modeling ». *Molecular Pharmacology* 64 (6): 1295-1308. <https://doi.org/10.1124/mol.64.6.1295>.
- Homberg, Judith R., Sharon M. Kolk, et Dirk Schubert. 2013. « Editorial Perspective of the Research Topic “Deciphering Serotonin’s Role in Neurodevelopment” ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 212. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00212>.
- Hornung, Jean-Pierre. 2003. « The Human Raphe Nuclei and the Serotonergic System ». *Journal of Chemical Neuroanatomy* 26 (4): 331-43.
- Hsia, Hung-En, Rohit Kumar, Rossella Luca, Michiko Takeda, Julien Courchet, Jonathan Nakashima, Shumin Wu, et al. 2014. « Ubiquitin E3 Ligase Nedd4-1 Acts as a Downstream Target of PI3K/PTEN-MTORC1 Signaling to Promote Neurite Growth ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (36): 13205-10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400737111>.
- Hsu, D. T., B. J. Sanford, K. K. Meyers, T. M. Love, K. E. Hazlett, H. Wang, L. Ni, et al. 2013. « Response of the  $\mu$ -Opioid System to Social Rejection and Acceptance ». *Molecular Psychiatry* 18 (11): 1211-17. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.96>.
- Hu, Lili, Bingjie Wang, et Yan Zhang. 2017. « Serotonin 5-HT<sub>6</sub> Receptors Affect Cognition in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease by Regulating Cilia Function ». *Alzheimer’s Research & Therapy* 9 (1): 76. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0304-4>.
- Huang, Christine H., et Susan L. Santangelo. 2008. « Autism and Serotonin Transporter Gene Polymorphisms: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 147B (6): 903-13. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30720>.
- Huerta-Rivas, A., G. Pérez-García, C. González-Espinosa, et A. Meneses. 2010. « Time-Course of 5-HT<sub>6</sub> Receptor mRNA Expression during Memory Consolidation and Amnesia ». *Neurobiology of Learning and Memory* 93 (1): 99-110. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.08.009>.
- Hutsler, Jeffrey J., et Hong Zhang. 2010. « Increased Dendritic Spine Densities on Cortical Projection Neurons in Autism Spectrum Disorders ». *Brain Research* 1309 (janvier): 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.120>.
- Hwangpo, Tracy Anh, J. Dedrick Jordan, Prem K. Premririt, Gomathi Jayaraman, Jonathan D. Licht, Ravi Iyengar, et Susana R. Neves. 2012. « G Protein-Regulated Inducer of Neurite Outgrowth (GRIN) Modulates Sprouty Protein Repression of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Activation by Growth Factor Stimulation ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (17): 13674-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.320705>.
- Idris, Nagi, Jo Neill, Ben Grayson, Benny Bang-Andersen, Louise M. Witten, Lise Tøttrup Brennum, et Jørn Arnt. 2010. « Sertindole Improves Sub-Chronic PCP-Induced Reversal Learning and Episodic Memory Deficits in Rodents: Involvement of 5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Mechanisms ». *Psychopharmacology* 208 (1): 23-36. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1702-5>.
- Iida, Naoyuki, et Tohru Kozasa. 2004. « Identification and Biochemical Analysis of GRIN1 and GRIN2 ». *Methods in Enzymology* 390: 475-83. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)90029-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)90029-8).
- Jacobs, B. L., H. van Praag, et F. H. Gage. 2000. « Adult Brain Neurogenesis and Psychiatry: A Novel Theory of Depression ». *Molecular Psychiatry* 5 (3): 262-69.
- Jacobshagen, Moritz, Mathieu Niquille, Séverine Chaumont-Dubel, Philippe Marin, et Alexandre Dayer. 2014. « The Serotonin 6 Receptor Controls Neuronal Migration during Corticogenesis via a Ligand-Independent Cdk5-Dependent Mechanism ». *Development (Cambridge, England)* 141 (17): 3370-77. <https://doi.org/10.1242/dev.108043>.
- Janusonis, Skirmantas, Vicko Gluncic, et Pasko Rakic. 2004. « Early Serotonergic Projections to Cajal-Retzius Cells: Relevance for Cortical Development ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (7): 1652-59. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4651-03.2004>.
- Jaramillo, Thomas C., Haley E. Speed, Zhong Xuan, Jeremy M. Reimers, Christine Ochoa Escamilla, Travis P. Weaver, Shunan Liu, Irina Filonova, et Craig M. Powell. 2017. « Novel Shank3 Mutant Exhibits Behaviors with Face Validity for Autism and Altered Striatal and Hippocampal Function ». *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research* 10 (1): 42-65. <https://doi.org/10.1002/aur.1664>.
- Jastrzębska-Więsek, Magdalena, Agata Siwek, Anna Partyka, Bernadeta Szewczyk, Magdalena Sowa-Kućma, Anna Wasik, Marcin Kołaczkowski, et Anna Wesółowska. 2015. « Antidepressant-like Activity of EMD 386088, a 5-HT<sub>6</sub> Receptor

- Partial Agonist, Following Systemic Acute and Chronic Administration to Rats ». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 388 (10): 1079-88. <https://doi.org/10.1007/s00210-015-1141-2>.
- Jaworski, Jacek, Samantha Spangler, Daniel P. Seeburg, Casper C. Hoogenraad, et Morgan Sheng. 2005. « Control of Dendritic Arborization by the Phosphoinositide-3'-Kinase-Akt-Mammalian Target of Rapamycin Pathway ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (49): 11300-312. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2270-05.2005>.
- Jenkins, Trisha A., Jason C. D. Nguyen, Kate E. Polglaze, et Paul P. Bertrand. 2016. « Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis ». *Nutrients* 8 (1). <https://doi.org/10.3390/nu8010056>.
- Jiménez-Treviño, Luis, Pilar Alejandra Saiz, Maria Paz García-Portilla, Hilario Blasco-Fontecilla, Vladimir Carli, Miriam Iosue, Isabelle Jausse, et al. 2017. « 5-HTTLPR-Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Gene Interactions and Early Adverse Life Events Effect on Impulsivity in Suicide Attempters ». *The World Journal of Biological Psychiatry: The Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, octobre, 1-13. <https://doi.org/10.1080/15622975.2017.1376112>.
- Jones, CA, DJG Watson, et KCF Fone. 2011. « Animal models of schizophrenia ». *British Journal of Pharmacology* 164 (4): 1162-94. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x>.
- Kane, Michael J., Mariana Angoa-Peréz, Denise I. Briggs, Catherine E. Sykes, Dina M. Francescutti, David R. Rosenberg, et Donald M. Kuhn. 2012. « Mice Genetically Depleted of Brain Serotonin Display Social Impairments, Communication Deficits and Repetitive Behaviors: Possible Relevance to Autism ». *PloS One* 7 (11): e48975. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048975>.
- Karila, Delphine, Thomas Freret, Valentine Bouet, Michel Boulouard, Patrick Dallemagne, et Christophe Rochais. 2015. « Therapeutic Potential of 5-HT6 Receptor Agonists ». *Journal of Medicinal Chemistry* 58 (20): 7901-12. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00179>.
- Katsuyama, Yu, et Toshio Terashima. 2009. « Developmental Anatomy of Reeler Mutant Mouse ». *Development, Growth & Differentiation* 51 (3): 271-86. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01102.x>.
- Kaushik, Gaurav, et Konstantinos S. Zarbalis. 2016. « Prenatal Neurogenesis in Autism Spectrum Disorders ». *Frontiers in Chemistry* 4: 12. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00012>.
- Kim, Soon-Hee, Dong Hyuk Kim, Kang Ho Lee, Sun-Kyoung Im, Eun-Mi Hur, Kwang Chul Chung, et Hyewhon Rhim. 2014. « Direct Interaction and Functional Coupling between Human 5-HT6 Receptor and the Light Chain 1 Subunit of the Microtubule-Associated Protein 1B (MAP1B-LC1) ». *PloS One* 9 (3): e91402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091402>.
- Kim, Yong, Jee Young Sung, Ilaria Ceglia, Ko-Woon Lee, Jung-Hyuck Ahn, Jonathan M. Halford, Amie M. Kim, et al. 2006. « Phosphorylation of WAVE1 Regulates Actin Polymerization and Dendritic Spine Morphology ». *Nature* 442 (7104): 814-17. <https://doi.org/10.1038/nature04976>.
- King, Madeleine V., Charles A. Marsden, et Kevin C. F. Fone. 2008. « A Role for the 5-HT(1A), 5-HT4 and 5-HT6 Receptors in Learning and Memory ». *Trends in Pharmacological Sciences* 29 (9): 482-92.
- Kinsey, A. M., A. Wainwright, R. Heavens, D. J. Sirinathsinghji, et K. R. Oliver. 2001. « Distribution of 5-Ht(5A), 5-Ht(5B), 5-Ht(6) and 5-HT(7) Receptor MRNAs in the Rat Brain ». *Brain Research. Molecular Brain Research* 88 (1-2): 194-98.
- Kiryanova, Veronika, Brendan B. McAllister, et Richard H. Dyck. 2013. « Long-Term Outcomes of Developmental Exposure to Fluoxetine: A Review of the Animal Literature ». *Developmental Neuroscience* 35 (6): 437-39. <https://doi.org/10.1159/000355709>.
- Kishi, Taro, Yasuhisa Fukuo, Tomo Okochi, Kunihiro Kawashima, Tsuyoshi Kitajima, Toshiya Inada, Norio Ozaki, et al. 2012. « Serotonin 6 Receptor Gene and Schizophrenia: Case-Control Study and Meta-Analysis ». *Human Psychopharmacology* 27 (1): 63-69.
- Kishi, Taro, Yasuhisa Fukuo, Tomo Okochi, Tsuyoshi Kitajima, Kunihiro Kawashima, Hiroshi Naitoh, Hiroshi Ujike, et al. 2011. « Serotonin 6 Receptor Gene Is Associated with Methamphetamine-Induced Psychosis in a Japanese Population ». *Drug and Alcohol Dependence* 113 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2010.06.021>.
- Ko, Meng-Ching, Lukas Jyuhn-Hsiarn Lee, Yang Li, et Li-Jen Lee. 2014. « Long-Term Consequences of Neonatal Fluoxetine Exposure in Adult Rats ». *Developmental Neurobiology* 74 (10): 1038-51. <https://doi.org/10.1002/dneu.22185>.
- Kohen, R., L. A. Fashingbauer, D. E. Heidmann, C. R. Guthrie, et M. W. Hamblin. 2001. « Cloning of the Mouse 5-HT6 Serotonin Receptor and Mutagenesis Studies of the Third Cytoplasmic Loop ». *Brain Research. Molecular Brain Research* 90 (2): 110-17.

- Kohls, Gregor, Martin Schulte-Rüther, Barbara Nehrkorn, Kristin Müller, Gereon R. Fink, Inge Kamp-Becker, Beate Herpertz-Dahlmann, Robert T. Schultz, et Kerstin Konrad. 2013. « Reward System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders ». *Social Cognitive and Affective Neuroscience* 8 (5): 565-72. <https://doi.org/10.1093/scan/nss033>.
- Kornack, D. R., et P. Rakic. 1995. « Radial and Horizontal Deployment of Clonally Related Cells in the Primate Neocortex: Relationship to Distinct Mitotic Lineages ». *Neuron* 15 (2): 311-21.
- Kotańska, Magdalena, Klaudia Lustyk, Adam Bucki, Monika Marcinkowska, Joanna Śniecikowska, et Marcin Kończakowski. 2018. « Idalopirdine, a Selective 5-HT6receptor Antagonist, Reduces Food Intake and Body Weight in a Model of Excessive Eating ». *Metabolic Brain Disease*, janvier. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0175-1>.
- Kumar, Vikas, Ming-Xiang Zhang, Michael W. Swank, Jeannette Kunz, et Gang-Yi Wu. 2005. « Regulation of Dendritic Morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-MTOR and Ras-MAPK Signaling Pathways ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (49): 11288-99. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2284-05.2005>.
- Kuperman, S., J. H. Beeghly, T. L. Burns, et L. Y. Tsai. 1985. « Serotonin Relationships of Autistic Probands and Their First-Degree Relatives ». *Journal of the American Academy of Child Psychiatry* 24 (2): 186-90.
- Kuteykin-Teplyakov, Konstantin, et Rafael Maldonado. 2014. « Looking for Prosocial Genes: ITRAQ Analysis of Proteins Involved in MDMA-Induced Sociability in Mice ». *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 24 (11): 1773-83. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.08.007>.
- Lacroix, Laurent P., Lee A. Dawson, Jim J. Hagan, et Christian A. Hebdreder. 2004. « 5-HT6 Receptor Antagonist SB-271046 Enhances Extracellular Levels of Monoamines in the Rat Medial Prefrontal Cortex ». *Synapse (New York, N.Y.)* 51 (2): 158-64. <https://doi.org/10.1002/syn.10288>.
- Lakatosova, Silvia, et Daniela Ostatnikova. 2012. « Reelin and Its Complex Involvement in Brain Development and Function ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (9): 1501-4. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.002>.
- Lane, Hsien-Yuan, Cheng-Chieh Lin, Chiung-Hsien Huang, Yue-Cune Chang, Shih-Kuan Hsu, et Wen-Ho Chang. 2004. « Risperidone Response and 5-HT6 Receptor Gene Variance: Genetic Association Analysis with Adjustment for Nongenetic Confounders ». *Schizophrenia Research* 67 (1): 63-70.
- Lauder, J. M., et H. Krebs. 1978. « Serotonin as a Differentiation Signal in Early Neurogenesis ». *Developmental Neuroscience* 1 (1): 15-30. <https://doi.org/10.1159/000112549>.
- Lauder, J. M., J. A. Wallace, et H. Krebs. 1981. « Roles for Serotonin in Neuroembryogenesis ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 133: 477-506.
- Le Merrer, Julie, Jérôme A. J. Becker, Katia Befort, et Brigitte L. Kieffer. 2009. « Reward Processing by the Opioid System in the Brain ». *Physiological Reviews* 89 (4): 1379-1412. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2009>.
- Leboyer, M., A. Philippe, M. Bouvard, M. Guillaud-Bataille, D. Bondoux, F. Tabuteau, J. Feingold, M. C. Mouren-Simeoni, et J. M. Launay. 1999. « Whole Blood Serotonin and Plasma Beta-Endorphin in Autistic Probands and Their First-Degree Relatives ». *Biological Psychiatry* 45 (2): 158-63.
- Lee, Da Yong. 2015. « Roles of MTOR Signaling in Brain Development ». *Experimental Neurobiology* 24 (3): 177-85. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.3.177>.
- Lefevre, Arthur, Raphaëlle Mottolese, Jérôme Redouté, Nicolas Costes, Didier Le Bars, Marie-Maude Geoffray, Marion Leboyer, et Angela Sirigu. 2017. « Oxytocin Fails to Recruit Serotonergic Neurotransmission in the Autistic Brain ». *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, octobre, 1-10. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx272>.
- Leisman, Gerry, Orit Braun-Benjamin, et Robert Melillo. 2014. « Cognitive-Motor Interactions of the Basal Ganglia in Development ». *Frontiers in Systems Neuroscience* 8: 16. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00016>.
- Lesiak, Atom J., Matthew Brodsky, Nathalie Cohenca, Alexandra G. Croicu, et John F. Neumaier. 2018. « Restoration of Physiological Expression of 5-HT6 into the Primary Cilia of Null Mutant Neurons Lengthens Both Primary Cilia and Dendrites ». *Molecular Pharmacology*, avril. <https://doi.org/10.1124/mol.117.111583>.
- Leventhal, B. L., E. H. Cook, M. Morford, A. Ravitz, et D. X. Freedman. 1990. « Relationships of Whole Blood Serotonin and Plasma Norepinephrine within Families ». *Journal of Autism and Developmental Disorders* 20 (4): 499-511.
- Li, Dongyun, Hans-Otto Karnath, et Xiu Xu. 2017. « Candidate Biomarkers in Children with Autism Spectrum Disorder: A Review of MRI Studies ». *Neuroscience Bulletin* 33 (2): 219-37. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0118-1>.
- Li, Xiaohong, Hua Zou, et W. Ted Brown. 2012. « Genes Associated with Autism Spectrum Disorder ». *Brain Research Bulletin* 88 (6): 543-52. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.05.017>.



- Li, Zhu, Mei Huang, Adam J. Prus, Jin Dai, et Herbert Y. Meltzer. 2007. « 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonist SB-399885 Potentiates Haloperidol and Risperidone-Induced Dopamine Efflux in the Medial Prefrontal Cortex or Hippocampus ». *Brain Research* 1134 (1): 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.11.060>.
- Lieske, V., C. A. Bennett-Clarke, et R. W. Rhoades. 1999. « Effects of Serotonin on Neurite Outgrowth from Thalamic Neurons in Vitro ». *Neuroscience* 90 (3): 967-74.
- Lindseth, Glenda, Brian Helland, et Julie Caspers. 2015. « The Effects of Dietary Tryptophan on Affective Disorders ». *Archives of psychiatric nursing* 29 (2): 102-7. <https://doi.org/10.1016/j.apnu.2014.11.008>.
- Linstead, E., D. R. Dixon, E. Hong, C. O. Burns, R. French, M. N. Novack, et D. Granpeesheh. 2017. « An Evaluation of the Effects of Intensity and Duration on Outcomes across Treatment Domains for Children with Autism Spectrum Disorder ». *Translational Psychiatry* 7 (9): e1234. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.207>.
- Liu, J. P., et J. M. Lauder. 1991. « Serotonin and Nialamide Differentially Regulate Survival and Growth of Cultured Serotonin and Catecholamine Neurons ». *Brain Research. Developmental Brain Research* 62 (2): 297-305.
- Loseth, Guro E., Dan-Mikael Ellingsen, et Siri Leknes. 2014. « State-Dependent  $\mu$ -Opioid Modulation of Social Motivation ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8: 430. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00430>.
- Lotto, B., L. Upton, D. J. Price, et P. Gaspar. 1999. « Serotonin Receptor Activation Enhances Neurite Outgrowth of Thalamic Neurons in Rodents ». *Neuroscience Letters* 269 (2): 87-90.
- Ma, Thong C., Angel Barco, Rajiv R. Ratan, et Dianna E. Willis. 2014. « CAMP-Responsive Element-Binding Protein (CREB) and CAMP Co-Regulate Activator Protein 1 (AP1)-Dependent Regeneration-Associated Gene Expression and Neurite Growth ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (47): 32914-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.582460>.
- Magdalon, Juliana, Sandra M. Sánchez-Sánchez, Karina Griesi-Oliveira, et Andréa L. Sertié. 2017. « Dysfunctional mTORC1 Signaling: A Convergent Mechanism between Syndromic and Nonsyndromic Forms of Autism Spectrum Disorder? ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030659>.
- Magri, Laura, et Rossella Galli. 2013. « MTOR Signaling in Neural Stem Cells: From Basic Biology to Disease ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 70 (16): 2887-98. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1196-x>.
- Mahoney, Colleen, David M. Feliciano, Angélique Bordey, et Nathaniel W. Hartman. 2016. « Switching on MTORC1 Induces Neurogenesis but Not Proliferation in Neural Stem Cells of Young Mice ». *Neuroscience Letters* 614 (février): 112-18. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.042>.
- Marazziti, Donatella, Stefano Baroni, Andrea Pirone, Gino Giannaccini, Laura Betti, Lara Schmid, Elena Vatteroni, et al. 2012. « Distribution of Serotonin Receptor of Type 6 (5-HT<sub>6</sub>) in Human Brain Post-Mortem. A Pharmacology, Autoradiography and Immunohistochemistry Study ». *Neurochemical Research* 37 (5): 920-27. <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0684-y>.
- Marazziti, Donatella, Stefano Baroni, Andrea Pirone, Gino Giannaccini, Laura Betti, Giovanna Testa, Lara Schmid, et al. 2013. « Serotonin Receptor of Type 6 (5-HT<sub>6</sub>) in Human Prefrontal Cortex and Hippocampus Post-Mortem: An Immunohistochemical and Immunofluorescence Study ». *Neurochemistry International* 62 (2): 182-88. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.11.013>.
- Margoob, Mushtaq A., et Dhuha Mushtaq. 2011. « Serotonin Transporter Gene Polymorphism and Psychiatric Disorders: Is There a Link? ». *Indian Journal of Psychiatry* 53 (4): 289-99. <https://doi.org/10.4103/0019-5545.91901>.
- Marin, Philippe, Carine Becamel, Aline Dumuis, et Joel Bockaert. 2012. « 5-HT Receptor-Associated Protein Networks: New Targets for Drug Discovery in Psychiatric Disorders? ». *Current Drug Targets* 13 (1): 28-52.
- Marsden, Charles A., Madeleine V. King, et Kevin C. F. Fone. 2011. « Influence of Social Isolation in the Rat on Serotonergic Function and Memory--Relevance to Models of Schizophrenia and the Role of 5-HT<sub>6</sub> Receptors ». *Neuropharmacology* 61 (3): 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.03.003>.
- Martin, Melissa M., Yan Liu, et Zuoxin Wang. 2012. « Developmental Exposure to a Serotonin Agonist Produces Subsequent Behavioral and Neurochemical Changes in the Adult Male Prairie Vole ». *Physiology & Behavior* 105 (2): 529-35. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.09.015>.
- Masellis, M., V. S. Basile, H. Y. Meltzer, J. A. Lieberman, S. Sevy, D. A. Goldman, M. W. Hamblin, F. M. Macciardi, et J. L. Kennedy. 2001. « Lack of Association between the T-->C 267 Serotonin 5-HT<sub>6</sub> Receptor Gene (HTR6) Polymorphism and Prediction of Response to Clozapine in Schizophrenia ». *Schizophrenia Research* 47 (1): 49-58.
- Masi, Anne, Marilena M. DeMayo, Nicholas Glozier, et Adam J. Guastella. 2017. « An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options ». *Neuroscience Bulletin* 33 (2): 183-93. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0100-y>.
- Masuh, Ikuo, Yasumasa Mototani, Yoshinori Sahara, Junko Asami, Shun Nakamura, Tohru Kozasa, et Takayoshi Inoue. 2008. « Dynamic Expression Patterns of G Protein-Regulated Inducer of Neurite Outgrowth 1 (GRIN1) and Its Colocalization

- with Galphao Implicate Significant Roles of Galphao-GRIN1 Signaling in Nervous System ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 237 (9): 2415-29. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21686>.
- Maurice, Pascal, Jean-Luc Guillaume, Abla Benleulmi-Chaachoua, Avais M. Daulat, Maud Kamal, et Ralf Jockers. 2011. « GPCR-Interacting Proteins, Major Players of GPCR Function ». *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)* 62: 349-80. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385952-5.00001-4>.
- McCauley, J. L., L. M. Olson, M. Dowd, T. Amin, A. Steele, R. D. Blakely, S. E. Folstein, J. L. Haines, et J. S. Sutcliffe. 2004. « Linkage and Association Analysis at the Serotonin Transporter (SLC6A4) Locus in a Rigid-Compulsive Subset of Autism ». *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 127B (1): 104-12. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.20151>.
- McKinney, Jeffrey, Per M. Knappskog, et Jan Haavik. 2005. « Different Properties of the Central and Peripheral Forms of Human Tryptophan Hydroxylase ». *Journal of Neurochemistry* 92 (2): 311-20. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02850.x>.
- McManus, Matthew F., Ilya M. Nasrallah, Pallavi P. Gopal, William S. Baek, et Jeffrey A. Golden. 2004. « Axon Mediated Interneuron Migration ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 63 (9): 932-41.
- McNamara, Ilan M., Alice W. Borella, Lynn A. Bialowas, et Patricia M. Whitaker-Azmitia. 2008. « Further Studies in the Developmental Hyperserotonemia Model (DHS) of Autism: Social, Behavioral and Peptide Changes ». *Brain Research* 1189 (janvier): 203-14. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.10.063>.
- Meffre, Julie, Séverine Chaumont-Dubel, Clotilde Mannoury la Cour, Florence Loiseau, David J. G. Watson, Anne Dekeyne, Martial Séveno, et al. 2012. « 5-HT(6) Receptor Recruitment of MTOR as a Mechanism for Perturbed Cognition in Schizophrenia ». *EMBO Molecular Medicine* 4 (10): 1043-56. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201410>.
- Menegola, Elena, Maria Luisa Broccia, Francesca Di Renzo, Valentina Massa, et Erminio Giavini. 2004. « Effects of Excess and Deprivation of Serotonin on in Vitro Neuronal Differentiation ». *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 40 (1-2): 52-56. [https://doi.org/10.1290/1543-706X\(2004\)40<52:EOEADO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1543-706X(2004)40<52:EOEADO>2.0.CO;2).
- Miki, Hiroaki, et Tadaomi Takenawa. 2003. « Regulation of Actin Dynamics by WASP Family Proteins ». *Journal of Biochemistry* 134 (3): 309-13.
- Millan, Mark J., Annie Andrieux, George Bartzokis, Kristin Cadenhead, Paola Dazzan, Paolo Fusar-Poli, Jürgen Gallinat, et al. 2016. « Altering the Course of Schizophrenia: Progress and Perspectives ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 15 (7): 485-515. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.28>.
- Mitchell, Ellen S., et John F. Neumaier. 2008. « 5-HT6 Receptor Antagonist Reversal of Emotional Learning and Prepulse Inhibition Deficits Induced by Apomorphine or Scopolamine ». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 88 (3): 291-98. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.08.015>.
- Mitchell, Ellen S., Timothy Sexton, et John F. Neumaier. 2007. « Increased Expression of 5-HT6 Receptors in the Rat Dorsomedial Striatum Impairs Instrumental Learning ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32 (7): 1520-30. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301284>.
- Mohler, Eric G., Phillip M. Baker, Kimberly S. Gannon, Simon S. Jones, Sharon Shacham, John A. Sweeney, et Michael E. Ragozzino. 2012. « The effects of PRX-07034, a novel 5-HT6 antagonist, on cognitive flexibility and working memory in rats ». *Psychopharmacology* 220 (4): 687-96. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2518-7>.
- Moles, Anna, Brigitte L. Kieffer, et Francesca R. D'Amato. 2004. « Deficit in Attachment Behavior in Mice Lacking the Mu-Opioid Receptor Gene ». *Science (New York, N.Y.)* 304 (5679): 1983-86. <https://doi.org/10.1126/science.1095943>.
- Monk, C. S., S. J. Webb, et C. A. Nelson. 2001. « Prenatal Neurobiological Development: Molecular Mechanisms and Anatomical Change ». *Developmental Neuropsychology* 19 (2): 211-36. [https://doi.org/10.1207/S15326942DN1902\\_5](https://doi.org/10.1207/S15326942DN1902_5).
- Monroe, Jerry D., et R. David Heathcote. 2013. « Protein Phosphatases Regulate the Growth of Developing Neurites ». *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 31 (4): 250-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.01.005>.
- Monsma, F. J., Y. Shen, R. P. Ward, M. W. Hamblin, et D. R. Sibley. 1993. « Cloning and Expression of a Novel Serotonin Receptor with High Affinity for Tricyclic Psychotropic Drugs ». *Molecular Pharmacology* 43 (3): 320-27.
- Moon, Uk Yeol, Jun Young Park, Raehee Park, Jennifer Y. Cho, Lucinda J. Hughes, James McKenna, Laura Goetzl, et al. 2015. « Impaired Reelin-Dab1 Signaling Contributes to Neuronal Migration Deficits of Tuberous Sclerosis Complex ». *Cell Reports* 12 (6): 965-78. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.013>.

- Mørk, Arne, Rasmus Vinther Russell, Inge E. M. de Jong, et Gennady Smagin. 2017. « Effects of the 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonist Idalopirdine on Extracellular Levels of Monoamines, Glutamate and Acetylcholine in the Rat Medial Prefrontal Cortex ». *European Journal of Pharmacology* 799 (mars): 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.02.010>.
- Mosienko, Valentina, Daniel Beis, Natalia Alenina, et Markus Wöhr. 2015. « Reduced Isolation-Induced Pup Ultrasonic Communication in Mouse Pups Lacking Brain Serotonin ». *Molecular Autism* 6: 13. <https://doi.org/10.1186/s13229-015-0003-6>.
- Mottolèse, Raphaëlle, Jérôme Redouté, Nicolas Costes, Didier Le Bars, et Angela Sirigu. 2014. « Switching Brain Serotonin with Oxytocin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (23): 8637-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319810111>.
- Mountcastle, Vernon B. 2003. « Introduction. Computation in Cortical Columns ». *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 13 (1): 2-4.
- Moy, S. S., J. J. Nadler, N. B. Young, R. J. Nonneman, A. W. Grossman, D. L. Murphy, A. J. D'Ercole, J. N. Crawley, T. R. Magnuson, et J. M. Lauder. 2009. « Social Approach in Genetically Engineered Mouse Lines Relevant to Autism ». *Genes, Brain, and Behavior* 8 (2): 129-42. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2008.00452.x>.
- Muller, C. L., A. M. J. Anacker, et J. Veenstra-VanderWeele. 2016. « The Serotonin System in Autism Spectrum Disorder: From Biomarker to Animal Models ». *Neuroscience* 321 (mai): 24-41. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.11.010>.
- Murakami, Mirei, Tomoko Ichisaka, Mitsuyo Maeda, Noriko Oshiro, Kenta Hara, Frank Edenhofer, Hiroshi Kiyama, Kazuyoshi Yonezawa, et Shinya Yamanaka. 2004. « MTOR Is Essential for Growth and Proliferation in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (15): 6710-18. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.15.6710-6718.2004>.
- Murphy, Dennis L., et Klaus-Peter Lesch. 2008. « Targeting the Murine Serotonin Transporter: Insights into Human Neurobiology ». *Nature Reviews. Neuroscience* 9 (2): 85-96. <https://doi.org/10.1038/nrn2284>.
- Nakata, Hiroko, et Tooru Kozasa. 2005. « Functional Characterization of Galphao Signaling through G Protein-Regulated Inducer of Neurite Outgrowth 1 ». *Molecular Pharmacology* 67 (3): 695-702. <https://doi.org/10.1124/mol.104.003913>.
- Nikiforuk, Agnieszka, Tomasz Kos, et Anna Wesołowska. 2011. « The 5-HT<sub>6</sub> Receptor Agonist EMD 386088 Produces Antidepressant and Anxiolytic Effects in Rats after Intrahippocampal Administration ». *Psychopharmacology* 217 (3): 411-18. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2297-1>.
- Nordman, Jacob C., et Nadine Kabbani. 2012. « An Interaction between A7 Nicotinic Receptors and a G-Protein Pathway Complex Regulates Neurite Growth in Neural Cells ». *Journal of Cell Science* 125 (Pt 22): 5502-13. <https://doi.org/10.1242/jcs.110379>.
- Nordman, Jacob C., Wiktor S. Phillips, Nathan Kodama, Sarah G. Clark, Christopher A. Del Negro, et Nadine Kabbani. 2014. « Axon Targeting of the Alpha 7 Nicotinic Receptor in Developing Hippocampal Neurons by Gpr1 Regulates Growth ». *Journal of Neurochemistry* 129 (4): 649-62. <https://doi.org/10.1111/jnc.12641>.
- Noto, Bettina, Friederike Klempin, Natalia Alenina, Michael Bader, Heidrun Fink, et Svenja E. Sander. 2016. « Increased Adult Neurogenesis in Mice with a Permanent Overexpression of the Postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> Receptor ». *Neuroscience Letters* 633: 246-51. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.09.051>.
- Ohmori, O., T. Shinkai, H. Hori, et J. Nakamura. 2001. « Novel Polymorphism in the 5'-Upstream Region of the Human 5-HT<sub>6</sub> Receptor Gene and Schizophrenia ». *Neuroscience Letters* 310 (1): 17-20.
- Ohshima, Toshio, et Katsuhiko Mikoshiba. 2002. « Reelin Signaling and Cdk5 in the Control of Neuronal Positioning ». *Molecular Neurobiology* 26 (2-3): 153-66. <https://doi.org/10.1385/MN:26:2-3:153>.
- Ohshima, Toshio, Hiromi Suzuki, Toshifumi Morimura, Masaharu Ogawa, et Katsuhiko Mikoshiba. 2007. « Modulation of Reelin Signaling by Cyclin-Dependent Kinase 5 ». *Brain Research* 1140 (avril): 84-95. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.121>.
- O'Rourke, N. A., M. E. Dailey, S. J. Smith, et S. K. McConnell. 1992. « Diverse Migratory Pathways in the Developing Cerebral Cortex ». *Science (New York, N.Y.)* 258 (5080): 299-302.
- Page, Irvine H., et Arvid Carlsson. 1970. « Serotonin ». In *Control Mechanisms in the Nervous System*, 251-62. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7163-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7163-6_11).
- Paizanis, Eleni, Michel Hamon, et Laurence Lanfumey. 2007. « Hippocampal Neurogenesis, Depressive Disorders, and Antidepressant Therapy ». *Neural Plasticity* 2007: 73754. <https://doi.org/10.1155/2007/73754>.
- Panksepp, J. B., et G. P. Lahvis. 2007. « Social Reward among Juvenile Mice ». *Genes, Brain, and Behavior* 6 (7): 661-71. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00295.x>.

- Peça, João, Cátia Feliciano, Jonathan T. Ting, Wenting Wang, Michael F. Wells, Talaïgnair N. Venkatraman, Christopher D. Lascola, Zhanyan Fu, et Guoping Feng. 2011. « Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction ». *Nature* 472 (7344): 437-42. <https://doi.org/10.1038/nature09965>.
- Pechnick, Robert N., Svetlana Zonis, Kolja Wawrowsky, Rosemarie Cosgayon, Catherine Farrokhi, Liliana Lacayo, et Vera Chesnokova. 2011. « Antidepressants Stimulate Hippocampal Neurogenesis by Inhibiting P21 Expression in the Subgranular Zone of the Hippocampus ». *PLoS One* 6 (11): e27290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027290>.
- Pellissier, Lucie P., Jorge Gandía, Thibaut Laboute, Jérôme A. J. Becker, et Julie Le Merrer. 2017. «  $\mu$  Opioid Receptor, Social Behaviour and Autism Spectrum Disorder: Reward Matters ». *British Journal of Pharmacology*, avril. <https://doi.org/10.1111/bph.13808>.
- Pellissier, Lucie P., Jessica Sallander, Mercedes Campillo, Florence Gaven, Emilie Queffeuilou, Marion Pillot, Aline Dumuis, Sylvie Claeysen, Joël Bockaert, et Leonardo Pardo. 2009. « Conformational Toggle Switches Implicated in Basal Constitutive and Agonist-Induced Activated States of 5-Hydroxytryptamine-4 Receptors ». *Molecular Pharmacology* 75 (4): 982-90. <https://doi.org/10.1124/mol.108.053686>.
- Peroutka, S. J., et S. H. Snyder. 1979. « Multiple Serotonin Receptors: Differential Binding of [3H]5-Hydroxytryptamine, [3H]Lysergic Acid Diethylamide and [3H]Spiroperidol ». *Molecular Pharmacology* 16 (3): 687-99.
- Persico, Antonio M., Giovanni Di Pino, et Pat Levitt. 2006. « Multiple Receptors Mediate the Trophic Effects of Serotonin on Ventroposterior Thalamic Neurons in Vitro ». *Brain Research* 1095 (1): 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.04.006>.
- Phillips, Mary, et Lucas Pozzo-Miller. 2015. « Dendritic spine dysgenesis in Autism Related Disorders ». *Neuroscience letters* 601 (août): 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.011>.
- Pollak Dorocic, Iskra, Daniel Fürth, Yang Xuan, Yvonne Johansson, Laura Pozzi, Gilad Silberberg, Marie Carlén, et Konstantinos Meletis. 2014. « A Whole-Brain Atlas of Inputs to Serotonergic Neurons of the Dorsal and Median Raphe Nuclei ». *Neuron* 83 (3): 663-78. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.002>.
- Polleux, F., et William Snider. 2010. « Initiating and Growing an Axon ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (4): a001925. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001925>.
- « Psychopharmacologie Essentielle 4 Ème Édition ». s.d. Consulté le 26 avril 2018. <http://www.livres-medicaux.com/psychopharmacologie-essentielle-3-ed.html>.
- Purohit, Anil, Carol Smith, Katharine Herrick-Davis, et Milt Teitler. 2005. « Stable Expression of Constitutively Activated Mutant H5HT6 and H5HT7 Serotonin Receptors: Inverse Agonist Activity of Antipsychotic Drugs ». *Psychopharmacology* 179 (2): 461-69. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-2057-6>.
- Qiao, Hui, Ming-Xing Li, Chang Xu, Hui-Bin Chen, Shu-Cheng An, et Xin-Ming Ma. 2016. « Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models ». *Neural Plasticity* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8056370>.
- Rahikainen, Anna-Liina, Salla Majaharju, Jari Haukka, Jukka U. Palo, et Antti Sajantila. 2017. « Serotonergic 5HTTLPR/Rs25531 s-Allele Homozygosity Associates with Violent Suicides in Male Citalopram Users ». *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 174 (7): 691-700. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32553>.
- Rakic, P. 1978. « Neuronal Migration and Contact Guidance in the Primate Telencephalon ». *Postgraduate Medical Journal* 54 Suppl 1: 25-40.
- Reich, M, P Lenoir, J Malvy, A Perrot, et D Sauvage. 1997. « Sclérose tubéreuse de Bourneville et autisme ». *Archives de Pédiatrie* 4 (2): 170-75. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(97\)86165-9](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(97)86165-9).
- Reichow, Brian, Erin E. Barton, Brian A. Boyd, et Kara Hume. 2012. « Early Intensive Behavioral Intervention (EIBI) for Young Children with Autism Spectrum Disorders (ASD) ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 10 (octobre): CD009260. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009260.pub2>.
- Reiner, Orly, Eyal Karzbrun, Aditya Kshirsagar, et Kozo Kaibuchi. 2016. « Regulation of Neuronal Migration, an Emerging Topic in Autism Spectrum Disorders ». *Journal of Neurochemistry* 136 (3): 440-56. <https://doi.org/10.1111/jnc.13403>.
- Riccio, O., M. Jacobshagen, B. Golding, L. Vutskits, D. Jabaudon, J. P. Hornung, et A. G. Dayer. 2011. « Excess of Serotonin Affects Neocortical Pyramidal Neuron Migration ». *Translational Psychiatry* 1 (octobre): e47. <https://doi.org/10.1038/tp.2011.49>.
- Riccio, O., G. Potter, C. Walzer, P. Vallet, G. Szabó, L. Vutskits, J. Z. Kiss, et A. G. Dayer. 2009. « Excess of Serotonin Affects Embryonic Interneuron Migration through Activation of the Serotonin Receptor 6 ». *Molecular Psychiatry* 14 (3): 280-90. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.89>.
- Riemer, Claus, Edilio Borroni, Bernard Levet-Trafit, James R. Martin, Sonia Poli, Richard H. P. Porter, et Michael Bös. 2003. « Influence of the 5-HT6 Receptor on Acetylcholine Release in the Cortex: Pharmacological Characterization of 4-(2-

- Bromo-6-Pyrrolidin-1-Ylpyridine-4-Sulfonyl)Phenylamine, a Potent and Selective 5-HT6 Receptor Antagonist ». *Journal of Medicinal Chemistry* 46 (7): 1273-76. <https://doi.org/10.1021/jm021085c>.
- Rojas, Paulina S., David Neira, Mauricio Muñoz, Sergio Lavandero, et Jenny L. Fiedler. 2014. « Serotonin (5-HT) Regulates Neurite Outgrowth through 5-HT1A and 5-HT7 Receptors in Cultured Hippocampal Neurons ». *Journal of Neuroscience Research* 92 (8): 1000-1009. <https://doi.org/10.1002/jnr.23390>.
- Romero, Gonzalo, Marta Pujol, Pilar Pérez, Helmut Buschmann, et Petrus J. Pauwels. 2007. « Whole Spectrum Analysis of Ligand Efficacy at Constitutively Active Human Wild-Type and S267K 5-HT6 Receptors in HEK-293F Cells ». *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 55 (2): 144-50. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.04.007>.
- Ruat, M., E. Traiffort, J. M. Arrang, J. Tardivel-Lacombe, J. Diaz, R. Leurs, et J. C. Schwartz. 1993. « A Novel Rat Serotonin (5-HT6) Receptor: Molecular Cloning, Localization and Stimulation of CAMP Accumulation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 193 (1): 268-76.
- Ruhé, H. G., N. S. Mason, et A. H. Schene. 2007. « Mood Is Indirectly Related to Serotonin, Norepinephrine and Dopamine Levels in Humans: A Meta-Analysis of Monoamine Depletion Studies ». *Molecular Psychiatry* 12 (4): 331-59. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001949>.
- Ryu, Jae Ryun, Caroline Jeeyeon Hong, Joo Yeon Kim, Eun-Kyoung Kim, Woong Sun, et Seong-Woon Yu. 2016. « Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain ». *Molecular Brain* 9 (avril). <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0224-4>.
- Sarnat, Harvey B., et Laura Flores-Sarnat. 2002. « Role of Cajal-Retzius and Subplate Neurons in Cerebral Cortical Development ». *Seminars in Pediatric Neurology* 9 (4): 302-8.
- Schmitz, Sabine K., J. J. Johannes Hjorth, Raoul M. S. Joemai, Rick Wijntjes, Susanne Eijgenraam, Petra de Bruijn, Christina Georgiou, et al. 2011. « Automated analysis of neuronal morphology, synapse number and synaptic recruitment ». *Journal of Neuroscience Methods* 195 (2): 185-93. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.12.011>.
- Schubert, Dirk. 2014. *Deciphering Serotonin's Role in Neurodevelopment*. Frontiers E-books.
- Scott-Van Zeeland, Ashley A., Mirella Dapretto, Dara G. Ghahremani, Russell A. Poldrack, et Susan Y. Bookheimer. 2010. « Reward Processing in Autism ». *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research* 3 (2): 53-67. <https://doi.org/10.1002/aur.122>.
- Sebben, M., H. Ansanay, J. Bockaert, et A. Dumuis. 1994. « 5-HT6 Receptors Positively Coupled to Adenylyl Cyclase in Striatal Neurons in Culture ». *Neuroreport* 5 (18): 2553-57.
- Seidman, Larry J., et Allan F. Mirsky. 2017. « Evolving Notions of Schizophrenia as a Developmental Neurocognitive Disorder ». *Journal of the International Neuropsychological Society: JINS* 23 (9-10): 881-92. <https://doi.org/10.1017/S1355617717001114>.
- Semple, Bridgette D., Klas Blomgren, Kayleen Gimlin, Donna M. Ferriero, et Linda J. Noble-Haeusslein. 2013. « Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species ». *Progress in neurobiology* 0: 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>.
- Severin, E. S., et A. D. Kondratyev. 1988. « Regulation of Differentiation of PC12 Cells by Nerve Growth Factor ». *Advances in Enzyme Regulation* 27: 357-70.
- Shackelford, Terry J., et Francois X. Claret. 2010. « JAB1/CSN5: A New Player in Cell Cycle Control and Cancer ». *Cell Division* 5 (octobre): 26. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-5-26>.
- Sharma, Ali, Charles A. Hoeffler, Yukihiko Takayasu, Takahiro Miyawaki, Sean M. McBride, Eric Klann, et R. Suzanne Zukin. 2010. « Dysregulation of MTOR Signaling in Fragile X Syndrome ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (2): 694-702. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3696-09.2010>.
- Shinkai, T., O. Ohmori, H. Kojima, T. Terao, T. Suzuki, et K. Abe. 1999. « Association Study of the 5-HT6 Receptor Gene in Schizophrenia ». *American Journal of Medical Genetics* 88 (2): 120-22.
- Sikich, L., J. M. Hickok, et R. D. Todd. 1990. « 5-HT1A Receptors Control Neurite Branching during Development ». *Brain Research. Developmental Brain Research* 56 (2): 269-74.
- Singh, K. P., et Manoj Kr Singh. 2017. « In Utero Exposure to Atypical Antipsychotic Drug, Risperidone: Effects on Fetal Neurotoxicity in Hippocampal Region and Cognitive Impairment in Rat Offspring ». *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 75 (avril): 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.12.006>.
- Soergel, David G., Ruth Ann Subach, Nancy Burnham, Michael W. Lark, Ian E. James, Brian M. Sadler, Franck Skobieranda, Jonathan D. Violin, et Lynn R. Webster. 2014. « Biased Agonism of the  $\mu$ -Opioid Receptor by TRV130 Increases Analgesia and Reduces on-Target Adverse Effects versus Morphine: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study in Healthy Volunteers ». *Pain* 155 (9): 1829-35. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.06.011>.

- Soriano, Eduardo, et José Antonio Del Río. 2005. « The Cells of Cajal-Retzius: Still a Mystery One Century After ». *Neuron* 46 (3): 389-94. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.019>.
- Speranza, Luisa, Josephine Labus, Floriana Volpicelli, Daria Guseva, Enza Lacivita, Marcello Leopoldo, Gian Carlo Bellenchi, et al. 2017. « Serotonin 5-HT7 Receptor Increases the Density of Dendritic Spines and Facilitates Synaptogenesis in Forebrain Neurons ». *Journal of Neurochemistry* 141 (5): 647-61. <https://doi.org/10.1111/jnc.13962>.
- Spohn, Stephanie N., et Gary M. Mawe. 2017. « Non-Conventional Features of Peripheral Serotonin Signalling - the Gut and Beyond ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, mai. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.51>.
- Stawarski, Michal, Marzena Stefaniuk, et Jakub Wlodarczyk. 2014. « Matrix Metalloproteinase-9 Involvement in the Structural Plasticity of Dendritic Spines ». *Frontiers in Neuroanatomy* 8: 68. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00068>.
- Stiles, Travis L., Michael S. Kapiloff, et Jeffrey L. Goldberg. 2014. « The Role of Soluble Adenylyl Cyclase in Neurite Outgrowth ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1842 (12 Pt B): 2561-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.012>.
- Suárez-Santiago, José E., Alfredo Briones-Aranda, Judith Espinosa-Raya, et Ofir Picazo. 2017. « Agonist E-6837 and Antagonist SB-271046 of 5-HT6 Receptors Both Reverse the Depressive-like Effect Induced in Mice by Subchronic Ketamine Administration ». *Behavioural Pharmacology* 28 (7): 582-85. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000327>.
- Sugden, David. 2003. « Comparison of Circadian Expression of Tryptophan Hydroxylase Isoform MRNAs in the Rat Pineal Gland Using Real-Time PCR ». *Journal of Neurochemistry* 86 (5): 1308-11.
- Supèr, H., J. A. Del Río, A. Martínez, P. Pérez-Sust, et E. Soriano. 2000. « Disruption of Neuronal Migration and Radial Glia in the Developing Cerebral Cortex Following Ablation of Cajal-Retzius Cells ». *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 10 (6): 602-13.
- Sutcliffe, James S., Ryan J. Delahanty, Harish C. Prasad, Jacob L. McCauley, Qiao Han, Lan Jiang, Chun Li, Susan E. Folstein, et Randy D. Blakely. 2005. « Allelic Heterogeneity at the Serotonin Transporter Locus (SLC6A4) Confers Susceptibility to Autism and Rigid-Compulsive Behaviors ». *American Journal of Human Genetics* 77 (2): 265-79. <https://doi.org/10.1086/432648>.
- Svenningsson, Per, Eleni T. Tzavara, Hongshi Qi, Robert Carruthers, Jeffrey M. Witkin, George G. Nomikos, et Paul Greengard. 2007. « Biochemical and Behavioral Evidence for Antidepressant-like Effects of 5-HT6 Receptor Stimulation ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (15): 4201-9. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3110-06.2007>.
- Sylvia, Louisa G., Amy T. Peters, Thilo Deckersbach, et Andrew A. Nierenberg. 2013. « Nutrient-Based Therapies for Bipolar Disorder: A Systematic Review ». *Psychotherapy and Psychosomatics* 82 (1): 10-19. <https://doi.org/10.1159/000341309>.
- Takei, Nobuyuki, et Hiroyuki Nawa. 2014. « mTOR Signaling and Its Roles in Normal and Abnormal Brain Development ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7: 28. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00028>.
- Tassone, Annalisa, Graziella Madeo, Tommaso Schirinzi, Daniela Vita, Francesca Puglisi, Giulia Ponterio, Franco Borsini, Antonio Pisani, et Paola Bonsi. 2011. « Activation of 5-HT6 Receptors Inhibits Corticostriatal Glutamatergic Transmission ». *Neuropharmacology* 61 (4): 632-37. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.05.004>.
- Tavazoie, Sohail F., Veronica A. Alvarez, Dennis A. Ridenour, David J. Kwiatkowski, et Bernardo L. Sabatini. 2005. « Regulation of Neuronal Morphology and Function by the Tumor Suppressors Tsc1 and Tsc2 ». *Nature Neuroscience* 8 (12): 1727-34. <https://doi.org/10.1038/nn1566>.
- Terrana, Nathan, Gideon Koren, Jacklyn Pivovarov, Fatma Etwel, et Irena Nulman. 2015. « Pregnancy Outcomes Following In Utero Exposure to Second-Generation Antipsychotics: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of Clinical Psychopharmacology* 35 (5): 559-65. <https://doi.org/10.1097/JCP.0000000000000391>.
- Thomas, Gareth M., Gavin R. Rumbaugh, Dana B. Harrar, et Richard L. Huganir. 2005. « Ribosomal S6 Kinase 2 Interacts with and Phosphorylates PDZ Domain-Containing Proteins and Regulates AMPA Receptor Transmission ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (42): 15006-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507476102>.
- Thomas, Michael S. C., Rachael Davis, Annette Karmiloff-Smith, Victoria C. P. Knowland, et Tony Charman. 2016. « The Over-Pruning Hypothesis of Autism ». *Developmental Science* 19 (2): 284-305. <https://doi.org/10.1111/desc.12303>.
- Thompson, M. R., P. D. Callaghan, G. E. Hunt, J. L. Cornish, et I. S. McGregor. 2007. « A Role for Oxytocin and 5-HT(1A) Receptors in the Prosocial Effects of 3,4 Methylendioxyamphetamine ("ecstasy") ». *Neuroscience* 146 (2): 509-14. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.032>.
- Trakhtenberg, Ephraim F., et Jeffrey L. Goldberg. 2012. « The Role of Serotonin in Axon and Dendrite Growth ». *International Review of Neurobiology* 106: 105-26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407178-0.00005-3>.

- Trezza, Viviana, Patrizia Campolongo, et Louk J. M. J. Vanderschuren. 2011. « Evaluating the Rewarding Nature of Social Interactions in Laboratory Animals ». *Developmental Cognitive Neuroscience* 1 (4): 444-58. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2011.05.007>.
- Tsai, L. H., I. Delalle, V. S. Caviness, T. Chae, et E. Harlow. 1994. « P35 Is a Neural-Specific Regulatory Subunit of Cyclin-Dependent Kinase 5 ». *Nature* 371 (6496): 419-23. <https://doi.org/10.1038/371419a0>.
- Tsai, S. J., H. J. Chiu, Y. C. Wang, et C. J. Hong. 1999. « Association Study of Serotonin-6 Receptor Variant (C267T) with Schizophrenia and Aggressive Behavior ». *Neuroscience Letters* 271 (2): 135-37.
- Tsutsui-Kimura, Iku, Yu Ohmura, Takayuki Yoshida, et Mitsuhiro Yoshioka. 2017. « Milnacipran Affects Mouse Impulsive, Aggressive, and Depressive-like Behaviors in a Distinct Dose-Dependent Manner ». *Journal of Pharmacological Sciences* 134 (3): 181-89. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.06.004>.
- Turlejski, K. 1996. « Evolutionary Ancient Roles of Serotonin: Long-Lasting Regulation of Activity and Development ». *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 56 (2): 619-36.
- Uchino, Shigeo, et Chikako Waga. 2013. « SHANK3 as an Autism Spectrum Disorder-Associated Gene ». *Brain & Development* 35 (2): 106-10. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2012.05.013>.
- Upton, Neil, Tsu Tshen Chuang, Ann J. Hunter, et David J. Virley. 2008. « 5-HT6 receptor antagonists as novel cognitive enhancing agents for Alzheimer's disease ». *Neurotherapeutics* 5 (3): 458-69. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2008.05.008>.
- Valderrama, Jorge, et Regina Miranda. 2017. « Early Life Stress Predicts Negative Urgency through Brooding, Depending on 5-HTTLPR Genotype: A Pilot Study with 6-Month Follow-up Examining Suicide Ideation ». *Psychiatry Research* 258 (décembre): 481-87. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2017.08.092>.
- Van Der Kooy, D., H. C. Fibiger, et A. G. Phillips. 1978. « An Analysis of Dorsal and Median Raphe Self-Stimulation: Effects of Parachlorophenylalanine ». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 8 (4): 441-45.
- Veenstra-VanderWeele, Jeremy, Christopher L. Muller, Hideki Iwamoto, Jennifer E. Sauer, W. Anthony Owens, Charisma R. Shah, Jordan Cohen, et al. 2012. « Autism Gene Variant Causes Hyperserotonemia, Serotonin Receptor Hypersensitivity, Social Impairment and Repetitive Behavior ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (14): 5469-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112345109>.
- Veeranna, null, K. T. Shetty, W. T. Link, H. Jaffe, J. Wang, et H. C. Pant. 1995. « Neuronal Cyclin-Dependent Kinase-5 Phosphorylation Sites in Neurofilament Protein (NF-H) Are Dephosphorylated by Protein Phosphatase 2A ». *Journal of Neurochemistry* 64 (6): 2681-90.
- Velasquez, Juan C., Nick Goeden, et Alexandre Bonnin. 2013. « Placental Serotonin: Implications for the Developmental Effects of SSRIs and Maternal Depression ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 47. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00047>.
- Vichier-Guerre, Cecilia, Margaret Parker, Yael Pomerantz, Richard H. Finnell, et Robert M. Cabrera. 2017. « Impact of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors on Neural Crest Stem Cell Formation ». *Toxicology Letters* 281 (novembre): 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.08.012>.
- Vitalis, Tania, Mark S. Ansorge, et Alexandre G. Dayer. 2013. « Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: special attention to the 5-HT3A and 5-HT6 receptor subtypes ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7 (juin). <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00093>.
- Vitalis, Tania, Olivier Cases, Sandrine Passemard, Jacques Callebert, et John G. Parnavelas. 2007. « Embryonic Depletion of Serotonin Affects Cortical Development ». *The European Journal of Neuroscience* 26 (2): 331-44. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05661.x>.
- Vitalis, Tania, et John G. Parnavelas. 2003. « The Role of Serotonin in Early Cortical Development ». *Developmental Neuroscience* 25 (2-4): 245-56. <https://doi.org/10.1159/000072272>.
- Vogt, I. R., D. Shimron-Abarbanell, H. Neidt, J. Erdmann, S. Cichon, T. G. Schulze, D. J. Müller, et al. 2000. « Investigation of the Human Serotonin 6 [5-HT6] Receptor Gene in Bipolar Affective Disorder and Schizophrenia ». *American Journal of Medical Genetics* 96 (2): 217-21.
- Voigt, Jörg-Peter, et Heidrun Fink. 2015. « Serotonin Controlling Feeding and Satiety ». *Behavioural Brain Research* 277 (janvier): 14-31. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.065>.
- Waage-Baudet, H., J. M. Lauder, D. B. Dehart, K. Kluckman, S. Hiller, G. S. Tint, et K. K. Sulik. 2003. « Abnormal Serotonergic Development in a Mouse Model for the Smith-Lemli-Opitz Syndrome: Implications for Autism ». *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 21 (8): 451-59.

- Waider, Jonas, Florian Proft, Georg Langlhofer, Esther Asan, Klaus-Peter Lesch, et Lise Gutknecht. 2013. « GABA Concentration and GABAergic Neuron Populations in Limbic Areas Are Differentially Altered by Brain Serotonin Deficiency in Tph2 Knockout Mice ». *Histochemistry and Cell Biology* 139 (2): 267-81. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1029-x>.
- Waller, Jessica A., Fenghua Chen, et Connie Sánchez. 2016. « Vortioxetine promotes maturation of dendritic spines in vitro: A comparative study in hippocampal cultures ». *Neuropharmacology* 103 (avril): 143-54. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.12.012>.
- Wang, Chi Chiu, Astrid Borchert, Aslihan Ugun-Klusek, Ling Yin Tang, Wai Ting Lui, Ching Yan Chu, Ellen Billett, Hartmut Kuhn, et Christoph Ufer. 2011. « Monoamine Oxidase a Expression Is Vital for Embryonic Brain Development by Modulating Developmental Apoptosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (32): 28322-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.241422>.
- Wang, Chi Chiu, Gene Chi Wai Man, Ching Yan Chu, Astrid Borchert, Aslihan Ugun-Klusek, E. Ellen Billett, Hartmut Kühn, et Christoph Ufer. 2014. « Serotonin Receptor 6 Mediates Defective Brain Development in Monoamine Oxidase A-Deficient Mouse Embryos ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (12): 8252-63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.522094>.
- Wang, Hailong, Wei Song, Tinghui Hu, Ning Zhang, Shiyong Miao, Shudong Zong, et Linfang Wang. 2011. « Fank1 Interacts with Jab1 and Regulates Cell Apoptosis via the AP-1 Pathway ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 68 (12): 2129-39. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0559-4>.
- Wang, Hue Yu, Cheng Wei Lu, Tzu Yu Lin, Jinn Rung Kuo, et Su Jane Wang. 2016. « WAY208466 Inhibits Glutamate Release at Hippocampal Nerve Terminals ». *European Journal of Pharmacology* 781 (juin): 117-27. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.010>.
- Wang, Lin, Jun-Nian Zheng, et Dong-Sheng Pei. 2016. « The Emerging Roles of Jab1/CSN5 in Cancer ». *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 33 (8): 90. <https://doi.org/10.1007/s12032-016-0805-1>.
- Wang, Shuo, Pengyan Xia, Buqing Ye, Guanling Huang, Jing Liu, et Zusen Fan. 2013. « Transient Activation of Autophagy via Sox2-Mediated Suppression of MTOR Is an Important Early Step in Reprogramming to Pluripotency ». *Cell Stem Cell* 13 (5): 617-25. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.10.005>.
- Wang, Zhenling, Yuan Hong, Li Zou, Rong Zhong, Beibei Zhu, Na Shen, Wei Chen, et al. 2014. « Reelin Gene Variants and Risk of Autism Spectrum Disorders: An Integrated Meta-Analysis ». *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 165B (2): 192-200. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32222>.
- Ward, R. P., et D. M. Dorsa. 1996. « Colocalization of Serotonin Receptor Subtypes 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, and 5-HT<sub>6</sub> with Neuropeptides in Rat Striatum ». *The Journal of Comparative Neurology* 370 (3): 405-14. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960701\)370:3<405::AID-CNE10>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960701)370:3<405::AID-CNE10>3.0.CO;2-R).
- Wesołowska, Anna. 2007. « Study into a Possible Mechanism Responsible for the Antidepressant-like Activity of the Selective 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonist SB-399885 in Rats ». *Pharmacological Reports: PR* 59 (6): 664-71.
- . 2010. « Potential Role of the 5-HT<sub>6</sub> Receptor in Depression and Anxiety: An Overview of Preclinical Data ». *Pharmacological Reports: PR* 62 (4): 564-77.
- Wesołowska, Anna, et Agnieszka Nikiforuk. 2007. « Effects of the Brain-Penetrant and Selective 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonist SB-399885 in Animal Models of Anxiety and Depression ». *Neuropharmacology* 52 (5): 1274-83. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.01.007>.
- Whitfield, James F., et Balu R. Chakravarthy. 2009. « The Neuronal Primary Cilium: Driver of Neurogenesis and Memory Formation in the Hippocampal Dentate Gyrus? ». *Cellular Signalling* 21 (9): 1351-55. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.02.013>.
- Więckowska, Anna, Marcin Kołaczkowski, Adam Bucki, Justyna Godyń, Monika Marcinkowska, Krzysztof Więckowski, Paula Zaręba, et al. 2016. « Novel Multi-Target-Directed Ligands for Alzheimer's Disease: Combining Cholinesterase Inhibitors and 5-HT<sub>6</sub>receptor Antagonists. Design, Synthesis and Biological Evaluation ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 124 (novembre): 63-81. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.016>.
- Wöhr, Markus, Anna Moles, Rainer K. W. Schwarting, et Francesca R. D'Amato. 2011. « Lack of Social Exploratory Activation in Male  $\mu$ -Opioid Receptor KO Mice in Response to Playback of Female Ultrasonic Vocalizations ». *Social Neuroscience* 6 (1): 76-87. <https://doi.org/10.1080/17470911003765560>.
- Wong, Ma-Li, et Julio Licinio. 2004. « From Monoamines to Genomic Targets: A Paradigm Shift for Drug Discovery in Depression ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 3 (2): 136-51. <https://doi.org/10.1038/nrd1303>.
- Woolley, M. L., J. C. Bentley, A. J. Sleight, C. A. Marsden, et K. C. Fone. 2001. « A Role for 5-HT<sub>6</sub> Receptors in Retention of Spatial Learning in the Morris Water Maze ». *Neuropharmacology* 41 (2): 210-19.



- Xie, Keqiang, Lesley A. Colgan, Maria T. Dao, Brian S. Muntean, Laurie P. Sutton, Cesare Orlandi, Sanford L. Boye, et al. 2016. « NF1 Is a Direct G Protein Effector Essential for Opioid Signaling to Ras in the Striatum ». *Current Biology: CB* 26 (22): 2992-3003. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.010>.
- Young, Simon N. 2013. « The effect of raising and lowering tryptophan levels on human mood and social behaviour ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368 (1615). <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0375>.
- Yun, Hyung-Mun, Ja-Hyun Baik, Insug Kang, Changbae Jin, et Hyewhon Rhim. 2010. « Physical Interaction of Jab1 with Human Serotonin 6 G-Protein-Coupled Receptor and Their Possible Roles in Cell Survival ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (13): 10016-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068759>.
- Yun, Hyung-Mun, Sunoh Kim, Hyun-Ji Kim, Evi Kostenis, Jae Il Kim, Jae Young Seong, Ja-Hyun Baik, et Hyewhon Rhim. 2007. « The Novel Cellular Mechanism of Human 5-HT6 Receptor through an Interaction with Fyn ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (8): 5496-5505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606215200>.
- Zalevsky, J., L. Lempert, H. Kranitz, et R. D. Mullins. 2001. « Different WASP Family Proteins Stimulate Different Arp2/3 Complex-Dependent Actin-Nucleating Activities ». *Current Biology: CB* 11 (24): 1903-13.
- Zhang, Ming-lian, Guo-zhen Yuan, Jian-jun Yao, Yong-chao Qian, Xia Zhang, Yin-ping Huang, Rui-chun Tang, Qing Ji, et Sanduo Jiang. 2003. « [Associations between six functional genes and schizophrenia] ». *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi = Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi = Chinese Journal of Medical Genetics* 20 (1): 69-71.
- Zheng, Jing, Da-Feng Xu, Kui Li, Hong-Tao Wang, Peng-Cheng Shen, Min Lin, Xiao-Hua Cao, et Rui Wang. 2011. « Neonatal Exposure to Fluoxetine and Fluvoxamine Alters Spine Density in Mouse Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 4 (2): 162-68.
- Zucker, Marjorie Bass. 1944. « A study of the substances in blood serum and platelets which stimulate smooth muscle ». *American Journal of Physiology-Legacy Content* 142 (1): 12-26. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1944.142.1.12>.

---

# ANNEXES

# ANNEXE 1 : TABLEAUX RECAPITULATIFS DES DONNEES STATISTIQUES

# ANOVA à 1 facteur suivie d'un test a posteriori de Tukey

| ANALYSE DES RESULTATS DE CO-IMMUNOPRECIPITATION               |   |                                   |            |                                   |                  |              |         |                  |
|---|---|-----------------------------------|------------|-----------------------------------|------------------|--------------|---------|------------------|
| FIGURE n°   | Conditions comparées                                    | One Way ANOVA                     |            | Tukey's multiple comparisons test |                  |              |         |                  |
|   |   | F (DFn, DFd)                      | P value    | Mean Diff,                        | 95% CI of diff,  | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
| <b>CO-IMMUNOPRECIPITATION DE GPRIN1</b>                       |   |                                   |            |                                   |                  |              |         |                  |
| 20A   | 5-HT6 + GPRIN1 24h vs. 5-HT6 + GPRIN1 48h               | F (3, 12) = 109,3                 | P < 0,0001 | -141,4                            | -186,9 to -95,93 | Yes          | ****    | < 0,0001         |
| 20B   | 5-HT6 + CDK5 24h vs. 5-HT6 + CDK5 48h                   | F (4, 10) = 497,2                 | P < 0,0001 | 96,94                             | 86,26 to 107,6   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
| 22  | 5-HT6 WT + GPRIN1 vs. 5-HT6 S350A + GPRIN1              | F (3, 13) = 1093 ; P < 0,0001     |            | -216,9                            | -234,2 to -199,5 | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 5HT6 WT + GPRIN1 vs. 5-HT6 S350D + GPRIN1               |                                   |            | 83,07                             | 67,11 to 99,04   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
| 23A   | 5-HT6 WT + GPRIN1 vs. 5HT6 GsDead + GPRIN1              | F (4, 24) = 254,5 P < 0,0001      |            | 50,19                             | 37,89 to 62,49   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 5HT6 WT + GPRIN1 vs. 5HT6 ΔCter + GPRIN1                |                                   |            | 60,66                             | 48,37 to 72,96   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 5HT6 WT + GPRIN1 vs. 5HT6 ΔCter/GsDead + GPRIN1         |                                   |            | 95,9                              | 82,22 to 109,6   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
| 23B   | 5-HT6 + GPRIN1 TAT CONT vs. 5-HT6 + GPRIN1 TATCT320-342 | F (2, 6) = 287,4                  | P < 0,0001 | 78,71                             | 65,26 to 92,17   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
| 23C   | 5-HT6 + GPRIN1 Veh vs. 5-HT6 + GPRIN1 SB 24h            | F (2, 21) = 271,2                 | P < 0,0001 | 64,43                             | 52,48 to 76,38   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
| 26B   | 5-HT6 WT + GPRIN1 vs. 5-HT6 W281A + GPRIN1              | F (3, 17) = 53,34                 | P < 0,0001 | 77,53                             | 44,23 to 110,8   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
| <b>CO-IMMUNOPRECIPITATION DE Gas</b>                          |   |                                   |            |                                   |                  |              |         |                  |
| 27  | 5-HT6 vs. 5-HT6 + GPRIN1                                | F (2, 9) = 14,07                  |            | -52,04                            | -86,08 to -18,00 | Yes          | **      | 0,0053           |
|   | 5-HT6 + GPRIN1 TAT CONT vs. 5-HT6 + GPRIN1 TATCT320-342 |                                   |            | 59,28                             | 25,24 to 93,32   | Yes          | **      | 0,0023           |
| <b>ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS DE POUSSÉ NEURITIQUE</b> |   |                                   |            |                                   |                  |              |         |                  |
| FIGURE n°   | Conditions comparées                                    | One Way ANOVA                     |            | Tukey's multiple comparisons test |                  |              |         |                  |
|   |   | F (DFn, DFd)                      | P value    | Mean Diff,                        | 95% CI of diff,  | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
| 28  | <b>24h</b>  | F (6, 2902) = 79,19 ; p < 0,0001  |            | -23,99                            | -28,81 to -19,18 | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | GFP vs. 5-HT6   |                                   |            | -0,6109                           | -5,665 to 4,443  | No           | ns      | 0,9998           |
|   | GFP vs. GPRIN1  |                                   |            | 1,002                             | -3,284 to 5,287  | No           | ns      | 0,9932           |
|   | 5-HT6 vs. 5-HT6 + GPRIN1                                |                                   |            | 15,49                             | 8,188 to 22,79   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 5-HT6 vs. 5-HT6 + CDK5 DN                               |                                   |            | -1,106                            | -11,02 to 8,808  | No           | ns      | 0,9999           |
|   | <b>48h</b>  | F (9, 3817) = 80,10 ; p < 0,0001  |            | -34,9                             | -44,67 to -25,13 | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 5-HT6 vs. 5-HT6 + GPRIN1                                |                                   |            | -3,808                            | -12,72 to 5,104  | No           | ns      | 0,9411           |
|   | 5-HT6 W281A vs. 5-HT6 W281A + GPRIN1                    |                                   |            | 1,488                             | -18,42 to 21,39  | No           | ns      | > 0,9999         |
|   | 5-HT6 + TATCT320-342 vs. 5-HT6 + GPRIN1 + TATCT320-342  |                                   |            | -12,99                            | -26,46 to 0,4945 | No           | ns      | 0,0702           |
|   | 5-HT6 + CDK5 DN vs. 5-HT6 + CDK5 DN + GPRIN1            |                                   |            | 3,938                             | -5,136 to 13,01  | No           | ns      | 0,9353           |
| 29  | <b>24h</b>  | F (4, 1556) = 49,04 ; p < 0,0001  |            | 21,26                             | 16,32 to 26,21   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 5-HT6 WT vs. 5-HT6 S350A                                |                                   |            | 2,152                             | -5,286 to 9,589  | No           | ns      | 0,9335           |
|   | 5-HT6 WT vs. 5-HT6 S350D                                |                                   |            | -1,082                            | -6,922 to 4,757  | No           | ns      | 0,9868           |
|   | 5-HT6 S350A vs. 5-HT6 S350A + GPRIN1                    |                                   |            | 6,698                             | -2,311 to 15,71  | No           | ns      | 0,2519           |
|   | 5-HT6 S350D vs. 5-HT6 S350D + GPRIN1                    |                                   |            |                                   |                  |              |         |                  |
|   | <b>48h</b>  | F (5, 2161) = 49,54 ; p < 0,0001  |            | 3,099                             | -6,896 to 13,09  | No           | ns      | 0,9503           |
|   | 5-HT6 WT vs. 5-HT6 S350A                                |                                   |            | 17,91                             | 3,858 to 31,96   | Yes          | **      | 0,0039           |
|   | 5-HT6 WT vs. 5-HT6 S350D                                |                                   |            | -1,443                            | -12,04 to 9,150  | No           | ns      | 0,9989           |
|   | 5-HT6 S350A vs. 5-HT6 S350A + GPRIN1                    |                                   |            | 3,221                             | -12,57 to 19,01  | No           | ns      | 0,9922           |
|   | 5-HT6 S350D vs. 5-HT6 S350D + GPRIN1                    |                                   |            |                                   |                  |              |         |                  |
| 31  | 5-HT6 Veh vs. 5-HT6 SB 1µM                              | F (7, 1635) = 80,52 ; p < 0,0001  |            | 17,35                             | 2,144 to 32,55   | Yes          | *       | 0,0128           |
|   | 5-HT6 Veh vs. 5-HT6 SB 6µM                              |                                   |            | 31,4                              | 16,49 to 46,31   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 5-HT6 Veh vs. 5-HT6 SB 10 µM                            |                                   |            | 44,85                             | 25,17 to 64,54   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 5-HT6 + GPRIN1 Veh vs. 5-HT6 + GPRIN1 SB 1µM            |                                   |            | 49,59                             | 34,77 to 64,42   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 5-HT6 + GPRIN1 Veh vs. 5-HT6 + GPRIN1 SB 6 µM           |                                   |            | 65,05                             | 46,81 to 83,29   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 5-HT6 + GPRIN1 Veh vs. 5-HT6 + GPRIN1 SB SB10 µM        |                                   |            | 82,31                             | 65,72 to 98,89   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
| 32  | 5-HT6 WT vs. 5-HT6 WT + GPRIN1                          | F (11, 4202) = 36,20 ; p < 0,0001 |            | -34,9                             | -44,69 to -25,10 | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 5-HT6 GSDEAD vs. 5-HT6 GSDEAD + GPRIN1                  |                                   |            | 7,461                             | -3,992 to 18,91  | No           | ns      | 0,6009           |
|   | 5-HT6 + TATCT320-342 vs. 5-HT6 + GPRIN1 + TATCT320-342  |                                   |            | 1,488                             | -18,47 to 21,44  | No           | ns      | > 0,9999         |
|   | 5-HT6 + KT5720 vs. 5-HT6 + GPRIN1 + KT5720              |                                   |            | 0,4787                            | -9,477 to 10,43  | No           | ns      | > 0,9999         |
|   | 5-HT6 + SB 1µM vs. 5-HT6 + GPRIN1 + SB 1µM              |                                   |            | -15,29                            | -32,86 to 2,275  | No           | ns      | 0,1611           |
|   | 5-HT6 + RpCAMP vs. 5-HT6 + GPRIN1 + RpCAMP              |                                   |            | -3,983                            | -13,64 to 5,679  | No           | ns      | 0,9727           |
| 33  | <b>STRIATUM</b>   | F (5, 3045) = 111,5 ; p < 0,0001  |            | 0,2665                            | -3,075 to 3,608  | No           | ns      | > 0,9999         |
|   | 1 DIV TAT CONT vs. 1 DIV TATCT320-342                   |                                   |            | 6,846                             | 3,514 to 10,18   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 2 DIV TAT CONT vs. 2 DIV TATCT320-342                   |                                   |            | 16,92                             | 13,92 to 19,93   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | <b>HIPPOCAMPE</b>                                       | F (5, 1230) = 78,12 ; p < 0,0001  |            | -7,608                            | -17,59 to 2,373  | No           | ns      | 0,2032           |
|   | 1 DIV TAT CONT vs. 1 DIV TATCT320-342                   |                                   |            | 7,548                             | -6,014 to 21,11  | No           | ns      | 0,6043           |
|   | 2 DIV TAT CONT vs. 2 DIV TATCT320-342                   |                                   |            | 40,69                             | 27,72 to 53,66   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | <b>CORTEX</b>   | F (5, 727) = 10,26 ; p < 0,0001   |            | 6,494                             | -9,290 to 22,28  | No           | ns      | 0,8485           |
|   | 1 DIV TAT CONT vs. 1 DIV TATCT320-342                   |                                   |            | 6,057                             | -7,041 to 19,15  | No           | ns      | 0,7732           |
|   | 2 DIV TAT CONT vs. 2 DIV TATCT320-342                   |                                   |            | 21                                | 8,447 to 33,55   | Yes          | ****    | < 0,0001         |

| ANALYSE DES RESULTATS DE LA PRODUCTION D'AMPc |  |                                |         |                                   |                  |              |         |                  |
|---|--|--------------------------------|---------|-----------------------------------|------------------|--------------|---------|------------------|
| FIGURE n°                                     | Conditions comparées                                     | One Way ANOVA                  |         | Tukey's multiple comparisons test |                  |              |         |                  |
|   |  | F (DFn, DFd)                   | P value | Mean Diff,                        | 95% CI of diff,  | Significant? | Summary | Adjusted P Value |
| 24A   | 5-HT <sub>6</sub> 24h vs. 5-HT <sub>6</sub> + GPRIN1 24H | F (9, 89) = 57,90 ; p < 0,0001 |         | -18,98                            | -72,03 to 34,08  | No           | ns      | 0,9763           |
|   | 5-HT <sub>6</sub> 48h vs. 5-HT <sub>6</sub> + GPRIN1 48h |                                |         | 60,52                             | 38,44 to 82,59   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 5-HT6 + GPRIN1 TAT CONT vs. 5-HT6 + GPRIN1 TATCT320-342  |                                |         | 6,52                              | -113,9 to 127,0  | No           | ns      | > 0,9999         |
|   | 5-HT6 + GPRIN1 WAY vs. 5-HT6 + GPRIN1 WAY                |                                |         | -106,5                            | -180,3 to -32,75 | Yes          | ***     | 0,0004           |
| 26A   | 5-HT6 WT vs. 5-HT6 W281A                                 | F (3, 22) = 15,82 ; p < 0,0001 |         | 114,7                             | 60,58 to 168,9   | Yes          | ****    | < 0,0001         |
|   | 5-HT6 W281A vs. 5-HT6 W281A + GPRIN1                     |                                |         | -6,137                            | -66,21 to 53,94  | No           | ns      | 0,9918           |

# Test de Student

| Test de student |  |          |                 |                |
|-----------------|--|----------|-----------------|----------------|
| FIGURE n°       | Conditions comparées   | P value  | P value summary | t, df          |
| 21              | INPUTS : GPRIN1 expression / 5-HT6 expression : 24h vs. 48h          | 0,3348   | ns              | t=1,096 df=4   |
| 21              | INPUTS : Cdk5 expression / 5-HT6 expression : 24h vs. 48h            | 0,193    | ns              | t=1,563 df=4   |
| 25              | Expression membranaire de 5-HT6 SNAP Tag vs. 5-HT6 SNAP + GPRIN1     | 0,7276   | ns              | t=0,3736 df=4  |
| 34              | Longueur des neurites ShRNA GPRIN1 vs. ShRNA scrambled               | < 0,0001 | ****            | t=6,963 df=346 |
| 34              | Longueur des neurites TAT peptideCt320-342 vs. TAT peptide scrambled | 0,0308   | *               | t=2,174 df=202 |

# ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test a posteriori de Sidak

Figure n° 34 Neurones de Striatum : TAT peptide scrambled vs. TAT peptide Ct320-342

| Two Way ANOVA              |            |                                  |              |   |                  |
|----------------------------|------------|----------------------------------|--------------|---|------------------|
| Facteur distance du soma   |            | Traitement (TAT peptide 320-342) |              | Interaction distance au soma X traitement |                  |
| F (DFn, DFd)               | P value    | F (DFn, DFd)                     | P value      | F (DFn, DFd)                              | P value          |
| F (109, 7480) = 189,1      | P < 0,0001 | F (1, 7480) = 407,2              | P < 0,0001   | F (109, 7480) = 19,22                     | P < 0,0001       |
| Test a posteriori de Sidak |            |                                  |              |   |                  |
| Distance au soma (µm)      | Mean Diff, | 95% CI of diff,                  | Significant? | Summary                                   | Adjusted P Value |
| 5                          | 2,031      | 1,278 to 2,784                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 10                         | 2,226      | 1,473 to 2,978                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 15                         | 2,649      | 1,896 to 3,401                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 20                         | 2,871      | 2,118 to 3,624                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 25                         | 3,077      | 2,324 to 3,829                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 30                         | 3,57       | 2,818 to 4,323                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 35                         | 3,588      | 2,836 to 4,341                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 40                         | 2,997      | 2,244 to 3,749                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 45                         | 3,054      | 2,301 to 3,807                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 50                         | 3,077      | 2,324 to 3,829                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 55                         | 2,753      | 2,001 to 3,506                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 60                         | 2,605      | 1,852 to 3,357                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 65                         | 2,056      | 1,303 to 2,808                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 70                         | 1,936      | 1,184 to 2,689                   | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 75                         | 1,639      | 0,8863 to 2,392                  | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 80                         | 1,142      | 0,3895 to 1,895                  | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 85                         | 0,8955     | 0,1428 to 1,648                  | Yes          | **  | 0,0034           |
| 90                         | 0,7369     | -0,01567 to 1,490                | No           | ns  | 0,065            |
| 95                         | 0,5163     | -0,2363 to 1,269                 | No           | ns  | 0,8366           |
| 100                        | 0,4118     | -0,3408 to 1,164                 | No           | ns  | 0,9981           |
| 105                        | 0,3284     | -0,4242 to 1,081                 | No           | ns  | > 0,9999         |
| 110                        | 0,1895     | -0,5631 to 0,9421                | No           | ns  | > 0,9999         |
| 115                        | 0,2484     | -0,5042 to 1,001                 | No           | ns  | > 0,9999         |
| 120                        | 0,1928     | -0,5598 to 0,9454                | No           | ns  | > 0,9999         |
| 125                        | 0,2206     | -0,5320 to 0,9732                | No           | ns  | > 0,9999         |
| 130                        | 0,165      | -0,5876 to 0,9176                | No           | ns  | > 0,9999         |
| 135                        | 0,0817     | -0,6709 to 0,8343                | No           | ns  | > 0,9999         |
| 140                        | 0,0817     | -0,6709 to 0,8343                | No           | ns  | > 0,9999         |
| 145                        | 0,05392    | -0,6987 to 0,8065                | No           | ns  | > 0,9999         |
| 150                        | 0,05392    | -0,6987 to 0,8065                | No           | ns  | > 0,9999         |

Figure n° 34 Neurones de Striatum : ShRNA scrambled Vs . ShRNA GPRIN1

| Two Way ANOVA              |            |                     |              |   |                  |
|----------------------------|------------|---------------------|--------------|---|------------------|
| Facteur distance du soma   |            | Infection           |              | Interaction distance au soma X traitement |                  |
| F (DFn, DFd)               | P value    | F (DFn, DFd)        | P value      | F (DFn, DFd)                              | P value          |
| F (109, 8910) = 183,3      | P < 0,0001 | F (1, 8910) = 589,2 | P < 0,0001   | F (109, 8910) = 17,42                     | P < 0,0001       |
| Test a posteriori de Sidak |            |                     |              |   |                  |
| Distance au soma (µm)      | Mean Diff, | 95% CI of diff,     | Significant? | Summary                                   | Adjusted P Value |
| 5                          | 1,218      | 0,4542 to 1,981     | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 10                         | 1,404      | 0,6404 to 2,167     | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 15                         | 2,079      | 1,316 to 2,843      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 20                         | 2,953      | 2,189 to 3,716      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 25                         | 3,786      | 3,023 to 4,550      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 30                         | 3,233      | 2,469 to 3,996      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 35                         | 3,027      | 2,264 to 3,790      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 40                         | 2,711      | 1,947 to 3,474      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 45                         | 2,69       | 1,927 to 3,453      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 50                         | 2,625      | 1,862 to 3,388      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 55                         | 2,348      | 1,584 to 3,111      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 60                         | 2,638      | 1,874 to 3,401      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 65                         | 2,561      | 1,797 to 3,324      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 70                         | 2,191      | 1,427 to 2,954      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 75                         | 1,863      | 1,100 to 2,627      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 80                         | 1,922      | 1,159 to 2,686      | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 85                         | 1,579      | 0,8157 to 2,343     | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 90                         | 1,631      | 0,8671 to 2,394     | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 95                         | 1,545      | 0,7814 to 2,308     | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 100                        | 1,444      | 0,6802 to 2,207     | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 105                        | 1,147      | 0,3836 to 1,910     | Yes          | ****                                      | < 0,0001         |
| 110                        | 0,8659     | 0,1024 to 1,629     | Yes          | **  | 0,0079           |
| 115                        | 0,7568     | -0,006638 to 1,520  | No           | ns  | 0,0558           |
| 120                        | 0,6906     | -0,07287 to 1,454   | No           | ns  | 0,1566           |
| 125                        | 0,6128     | -0,1507 to 1,376    | No           | ns  | 0,4218           |
| 130                        | 0,5699     | -0,1936 to 1,333    | No           | ns  | 0,6296           |
| 135                        | 0,6324     | -0,1311 to 1,396    | No           | ns  | 0,3381           |
| 140                        | 0,6091     | -0,1544 to 1,372    | No           | ns  | 0,4386           |
| 145                        | 0,4645     | -0,2990 to 1,228    | No           | ns  | 0,9757           |
| 150                        | 0,4608     | -0,3026 to 1,224    | No           | ns  | 0,9793           |



Figure n° 28 NG 108-15 : 5-HT6 seul vs. 5-HT6 + GPRIN1

| Two Way ANOVA              |            |                     |              |                                       |                  |
|----------------------------|------------|---------------------|--------------|---------------------------------------|------------------|
| Facteur distance du soma   |            | GPRIN1              |              | Interaction distance au soma X GPRIN1 |                  |
| F (DFn, DFd)               | P value    | F (DFn, DFd)        | P value      | F (DFn, DFd)                          | P value          |
| F (110, 9768) = 124,0      | P < 0,0001 | F (1, 9768) = 598,4 | P < 0,0001   | F (110, 9768) = 18,70                 | P < 0,0001       |
| Test a posteriori de Sidak |            |                     |              |                                       |                  |
| Distance au soma (µm)      | Mean Diff, | 95% CI of diff,     | Significant? | Summary                               | Adjusted P Value |
| 5                          | 3,25       | 2,384 to 4,116      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 10                         | 3,386      | 2,521 to 4,252      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 15                         | 3,523      | 2,657 to 4,389      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 20                         | 3,841      | 2,975 to 4,707      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 25                         | 3,636      | 2,771 to 4,502      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 30                         | 3,25       | 2,384 to 4,116      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 35                         | 3,318      | 2,452 to 4,184      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 40                         | 2,796      | 1,930 to 3,661      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 45                         | 2,818      | 1,952 to 3,684      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 50                         | 2,886      | 2,021 to 3,752      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 55                         | 3,068      | 2,202 to 3,934      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 60                         | 2,841      | 1,975 to 3,707      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 65                         | 2,432      | 1,566 to 3,298      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 70                         | 2,659      | 1,793 to 3,525      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 75                         | 2,227      | 1,361 to 3,093      | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 80                         | 1,75       | 0,8841 to 2,616     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 85                         | 1,591      | 0,7250 to 2,457     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 90                         | 1,614      | 0,7478 to 2,480     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 95                         | 1,364      | 0,4978 to 2,230     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 100                        | 1,227      | 0,3614 to 2,093     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 105                        | 1,295      | 0,4296 to 2,161     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 110                        | 1,091      | 0,2251 to 1,957     | Yes          | **                                    | 0,0011           |
| 115                        | 1,114      | 0,2478 to 1,980     | Yes          | ***                                   | 0,0007           |
| 120                        | 0,9091     | 0,04320 to 1,775    | Yes          | *                                     | 0,0259           |
| 125                        | 0,75       | -0,1159 to 1,616    | No           | ns                                    | 0,2356           |
| 130                        | 0,6136     | -0,2522 to 1,480    | No           | ns                                    | 0,7676           |
| 135                        | 0,5682     | -0,2977 to 1,434    | No           | ns                                    | 0,9109           |
| 140                        | 0,5682     | -0,2977 to 1,434    | No           | ns                                    | 0,9109           |
| 145                        | 0,3409     | -0,5250 to 1,207    | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 150                        | 0,2955     | -0,5704 to 1,161    | No           | ns                                    | > 0,9999         |

Figure n° 28 NG 108-15 : 5-HT6 + Cdk5 DN vs. 5-HT6 + Cdk5 DN + GPRIN1

| Two Way ANOVA              |            |                     |              |                                       |                  |
|----------------------------|------------|---------------------|--------------|---------------------------------------|------------------|
| Facteur distance du soma   |            | GPRIN1              |              | Interaction distance au soma X GPRIN1 |                  |
| F (DFn, DFd)               | P value    | F (DFn, DFd)        | P value      | F (DFn, DFd)                          | P value          |
| F (109, 9350) = 157,2      | P < 0,0001 | F (1, 9350) = 137,7 | P < 0,0001   | F (109, 9350) = 13,04                 | P < 0,0001       |
| Test a posteriori de Sidak |            |                     |              |                                       |                  |
| Distance au soma (µm)      | Mean Diff, | 95% CI of diff,     | Significant? | Summary                               | Adjusted P Value |
| 5                          | -3,43      | -4,220 to -2,639    | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 10                         | -3,903     | -4,693 to -3,112    | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 15                         | -3,595     | -4,385 to -2,805    | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 20                         | -3,146     | -3,937 to -2,356    | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 25                         | -2,903     | -3,693 to -2,112    | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 30                         | -3,095     | -3,885 to -2,305    | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 35                         | -2,189     | -2,979 to -1,398    | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 40                         | -1,641     | -2,431 to -0,8509   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 45                         | -1,492     | -2,282 to -0,7019   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 50                         | -0,6754    | -1,466 to 0,1148    | No           | ns                                    | 0,2637           |
| 55                         | -0,565     | -1,355 to 0,2252    | No           | ns                                    | 0,7446           |
| 60                         | -0,5275    | -1,318 to 0,2627    | No           | ns                                    | 0,885            |
| 65                         | -0,0915    | -0,8817 to 0,6987   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 70                         | 0,0423     | -0,7479 to 0,8325   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 75                         | -0,1422    | -0,9324 to 0,6480   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 80                         | -0,3996    | -1,190 to 0,3906    | No           | ns                                    | 0,9998           |
| 85                         | -0,4477    | -1,238 to 0,3425    | No           | ns                                    | 0,9952           |
| 90                         | -0,3345    | -1,125 to 0,4557    | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 95                         | -0,2004    | -0,9906 to 0,5898   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 100                        | -0,0655    | -0,8557 to 0,7247   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 105                        | -0,09201   | -0,8822 to 0,6982   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 110                        | 0,1797     | -0,6105 to 0,9699   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 115                        | 0,1327     | -0,6576 to 0,9229   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 120                        | 0,1528     | -0,6375 to 0,9430   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 125                        | -0,00793   | -0,7982 to 0,7823   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 130                        | -0,1247    | -0,9150 to 0,6655   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 135                        | -0,1718    | -0,9620 to 0,6184   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 140                        | -0,1972    | -0,9874 to 0,5931   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 145                        | -0,01797   | -0,8082 to 0,7723   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 150                        | -0,1099    | -0,9002 to 0,6803   | No           | ns                                    | > 0,9999         |

Figure n° 28 NG 108-15 : 5-HT6 W281A seul vs. 5-HT6 W281A + GPRIN1

| Two Way ANOVA              |            |                     |              |                                       |                  |
|----------------------------|------------|---------------------|--------------|---------------------------------------|------------------|
| Facteur distance du soma   |            | GPRIN1              |              | Interaction distance au soma X GPRIN1 |                  |
| F (DFn, DFd)               | P value    | F (DFn, DFd)        | P value      | F (DFn, DFd)                          | P value          |
| F (110, 9768) = 108,0      | P < 0,0001 | F (1, 9768) = 10,29 | P = 0,0013   | F (110, 9768) = 0,7509                | P = 0,9758       |
| Test a posteriori de Sidak |            |                     |              |                                       |                  |
| Distance au soma (µm)      | Mean Diff, | 95% CI of diff,     | Significant? | Summary                               | Adjusted P Value |
| 5                          | 0,7111     | 0,2089 to 1,213     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 10                         | 0,2889     | -0,2133 to 0,7911   | No           | ns                                    | 0,9932           |
| 15                         | 0,4889     | -0,01333 to 0,9911  | No           | ns                                    | 0,0698           |
| 20                         | -0,1333    | -0,6355 to 0,3689   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 25                         | 0,2        | -0,3022 to 0,7022   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 30                         | 0,1333     | -0,3689 to 0,6355   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 35                         | 0,2667     | -0,2355 to 0,7689   | No           | ns                                    | 0,9993           |
| 40                         | 0,3556     | -0,1466 to 0,8578   | No           | ns                                    | 0,7697           |
| 45                         | 0,2        | -0,3022 to 0,7022   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 50                         | 0,0667     | -0,4355 to 0,5689   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 55                         | 0,0222     | -0,4800 to 0,5244   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 60                         | 0,2        | -0,3022 to 0,7022   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 65                         | 0,5333     | 0,03107 to 1,036    | Yes          | *                                     | 0,022            |
| 70                         | 0,3333     | -0,1689 to 0,8355   | No           | ns                                    | 0,895            |
| 75                         | 0,1112     | -0,3910 to 0,6134   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 80                         | 0,3111     | -0,1911 to 0,8133   | No           | ns                                    | 0,9661           |
| 85                         | 0,1778     | -0,3244 to 0,6800   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 90                         | 0,1778     | -0,3245 to 0,6800   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 95                         | 0          | -0,5022 to 0,5022   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 100                        | 0,1111     | -0,3911 to 0,6133   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 105                        | 0,02223    | -0,4800 to 0,5245   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 110                        | -0,02222   | -0,5244 to 0,4800   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 115                        | -0,1111    | -0,6133 to 0,3911   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 120                        | -0,08888   | -0,5911 to 0,4133   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 125                        | -0,1556    | -0,6578 to 0,3467   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 130                        | -0,1556    | -0,6578 to 0,3467   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 135                        | -0,1333    | -0,6356 to 0,3689   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 140                        | 0          | -0,5022 to 0,5022   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 145                        | 0,06667    | -0,4356 to 0,5689   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 150                        | 0,08889    | -0,4133 to 0,5911   | No           | ns                                    | > 0,9999         |

Figure n° 28 NG 108-15 : 5-HT6 +TAT Ct320-342 vs. 5-HT6 + GPRIN1 +TAT Ct320-342

| Two Way ANOVA              |            |                     |              |                                       |                  |
|----------------------------|------------|---------------------|--------------|---------------------------------------|------------------|
| Facteur distance du soma   |            | GPRIN1              |              | Interaction distance au soma X GPRIN1 |                  |
| F (DFn, DFd)               | P value    | F (DFn, DFd)        | P value      | F (DFn, DFd)                          | P value          |
| F (110, 9768) = 119,6      | P < 0,0001 | F (1, 9768) = 3,522 | P = 0,0606   | F (110, 9768) = 0,3464                | P > 0,9999       |
| Test a posteriori de Sidak |            |                     |              |                                       |                  |
| Distance au soma (µm)      | Mean Diff, | 95% CI of diff,     | Significant? | Summary                               | Adjusted P Value |
| 5                          | -0,0748    | -0,4981 to 0,3485   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 10                         | -0,1224    | -0,5457 to 0,3009   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 15                         | 0,0748     | -0,3485 to 0,4981   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 20                         | -0,0346    | -0,4579 to 0,3887   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 25                         | 0,0873     | -0,3360 to 0,5106   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 30                         | 0,1865     | -0,2368 to 0,6098   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 35                         | 0,2791     | -0,1442 to 0,7024   | No           | ns                                    | 0,9044           |
| 40                         | 0,2054     | -0,2179 to 0,6287   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 45                         | 0,0829     | -0,3404 to 0,5062   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 50                         | -0,0146    | -0,4379 to 0,4087   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 55                         | -0,0151    | -0,4384 to 0,4082   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 60                         | 0,2222     | -0,2011 to 0,6455   | No           | ns                                    | 0,9995           |
| 65                         | 0,2395     | -0,1838 to 0,6628   | No           | ns                                    | 0,9955           |
| 70                         | 0,2461     | -0,1773 to 0,6694   | No           | ns                                    | 0,9912           |
| 75                         | 0,2591     | -0,1643 to 0,6824   | No           | ns                                    | 0,9732           |
| 80                         | 0,1301     | -0,2932 to 0,5534   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 85                         | -0,02548   | -0,4488 to 0,3978   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 90                         | -0,00326   | -0,4266 to 0,4201   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 95                         | -0,1144    | -0,5377 to 0,3090   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 100                        | -0,1545    | -0,5778 to 0,2689   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 105                        | -0,1014    | -0,5247 to 0,3220   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 110                        | 0,04065    | -0,3827 to 0,4640   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 115                        | 0,1848     | -0,2385 to 0,6082   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 120                        | 0,09594    | -0,3274 to 0,5193   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 125                        | 0,1182     | -0,3052 to 0,5415   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 130                        | 0,07588    | -0,3474 to 0,4992   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 135                        | 0,03144    | -0,3919 to 0,4548   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 140                        | 0,058      | -0,3653 to 0,4813   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 145                        | 0,03794    | -0,3854 to 0,4613   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 150                        | 0,06233    | -0,3610 to 0,4857   | No           | ns                                    | > 0,9999         |

Figure n° 28 NG 108-15 : 5-HT6 W281A seul vs. 5-HT6 W281A + GPRIN1

| Two Way ANOVA              |            |                     |              |                                       |                  |
|----------------------------|------------|---------------------|--------------|---------------------------------------|------------------|
| Facteur distance du soma   |            | GPRIN1              |              | Interaction distance au soma X GPRIN1 |                  |
| F (DFn, DFd)               | P value    | F (DFn, DFd)        | P value      | F (DFn, DFd)                          | P value          |
| F (110, 9768) = 108,0      | P < 0,0001 | F (1, 9768) = 10,29 | P = 0,0013   | F (110, 9768) = 0,7509                | P = 0,9758       |
| Test a posteriori de Sidak |            |                     |              |                                       |                  |
| Distance au soma (µm)      | Mean Diff, | 95% CI of diff,     | Significant? | Summary                               | Adjusted P Value |
| 5                          | 0,7111     | 0,2089 to 1,213     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 10                         | 0,2889     | -0,2133 to 0,7911   | No           | ns                                    | 0,9932           |
| 15                         | 0,4889     | -0,01333 to 0,9911  | No           | ns                                    | 0,0698           |
| 20                         | -0,1333    | -0,6355 to 0,3689   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 25                         | 0,2        | -0,3022 to 0,7022   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 30                         | 0,1333     | -0,3689 to 0,6355   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 35                         | 0,2667     | -0,2355 to 0,7689   | No           | ns                                    | 0,9993           |
| 40                         | 0,3556     | -0,1466 to 0,8578   | No           | ns                                    | 0,7697           |
| 45                         | 0,2        | -0,3022 to 0,7022   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 50                         | 0,0667     | -0,4355 to 0,5689   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 55                         | 0,0222     | -0,4800 to 0,5244   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 60                         | 0,2        | -0,3022 to 0,7022   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 65                         | 0,5333     | 0,03107 to 1,036    | Yes          | *                                     | 0,022            |
| 70                         | 0,3333     | -0,1689 to 0,8355   | No           | ns                                    | 0,895            |
| 75                         | 0,1112     | -0,3910 to 0,6134   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 80                         | 0,3111     | -0,1911 to 0,8133   | No           | ns                                    | 0,9661           |
| 85                         | 0,1778     | -0,3244 to 0,6800   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 90                         | 0,1778     | -0,3245 to 0,6800   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 95                         | 0          | -0,5022 to 0,5022   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 100                        | 0,1111     | -0,3911 to 0,6133   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 105                        | 0,02223    | -0,4800 to 0,5245   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 110                        | -0,02222   | -0,5244 to 0,4800   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 115                        | -0,1111    | -0,6133 to 0,3911   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 120                        | -0,08888   | -0,5911 to 0,4133   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 125                        | -0,1556    | -0,6578 to 0,3467   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 130                        | -0,1556    | -0,6578 to 0,3467   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 135                        | -0,1333    | -0,6356 to 0,3689   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 140                        | 0          | -0,5022 to 0,5022   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 145                        | 0,06667    | -0,4356 to 0,5689   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 150                        | 0,08889    | -0,4133 to 0,5911   | No           | ns                                    | > 0,9999         |

Figure n° 29 NG 108-15 : 5-HT6 S350A seul vs. 5-HT6 S350A + GPRIN1

| Two Way ANOVA              |            |                     |              |                                       |                  |
|----------------------------|------------|---------------------|--------------|---------------------------------------|------------------|
| Facteur distance du soma   |            | GPRIN1              |              | Interaction distance au soma X GPRIN1 |                  |
| F (DFn, DFd)               | P value    | F (DFn, DFd)        | P value      | F (DFn, DFd)                          | P value          |
| F (110, 9768) = 120,2      | P < 0,0001 | F (1, 9768) = 97,89 | P < 0,0001   | F (110, 9768) = 7,145                 | P < 0,0001       |
| Test a posteriori de Sidak |            |                     |              |                                       |                  |
| Distance au soma (µm)      | Mean Diff, | 95% CI of diff,     | Significant? | Summary                               | Adjusted P Value |
| 5                          | -1,067     | -1,619 to -0,5141   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 10                         | -1,467     | -2,019 to -0,9140   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 15                         | -1,689     | -2,242 to -1,136    | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 20                         | -1,711     | -2,264 to -1,158    | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 25                         | -1,711     | -2,264 to -1,158    | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 30                         | -1,178     | -1,730 to -0,6252   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 35                         | -0,9556    | -1,508 to -0,4030   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 40                         | -1,089     | -1,642 to -0,5363   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 45                         | -1,422     | -1,975 to -0,8696   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 50                         | -1,022     | -1,575 to -0,4696   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 55                         | -0,8889    | -1,442 to -0,3363   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 60                         | -0,5334    | -1,086 to 0,01923   | No           | ns                                    | 0,0773           |
| 65                         | -0,6222    | -1,175 to -0,06957  | Yes          | **                                    | 0,0089           |
| 70                         | -0,5556    | -1,108 to -0,002970 | Yes          | *                                     | 0,0467           |
| 75                         | -0,3778    | -0,9304 to 0,1748   | No           | ns                                    | 0,8448           |
| 80                         | -0,4444    | -0,9970 to 0,1082   | No           | ns                                    | 0,4175           |
| 85                         | -0,5112    | -1,064 to 0,04147   | No           | ns                                    | 0,1246           |
| 90                         | -0,5778    | -1,130 to -0,02519  | Yes          | *                                     | 0,0275           |
| 95                         | -0,3556    | -0,9082 to 0,1971   | No           | ns                                    | 0,9343           |
| 100                        | -0,3556    | -0,9082 to 0,1971   | No           | ns                                    | 0,9343           |
| 105                        | -0,2667    | -0,8193 to 0,2860   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 110                        | 0          | -0,5526 to 0,5526   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 115                        | -0,06667   | -0,6193 to 0,4860   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 120                        | -0,02222   | -0,5749 to 0,5304   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 125                        | 0,04444    | -0,5082 to 0,5971   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 130                        | 0,1556     | -0,3971 to 0,7082   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 135                        | 0,1556     | -0,3971 to 0,7082   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 140                        | 0,1778     | -0,3749 to 0,7304   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 145                        | 0,1556     | -0,3971 to 0,7082   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 150                        | 0,08889    | -0,4637 to 0,6415   | No           | ns                                    | > 0,9999         |

Figure n° 29 NG 108-15 : 5-HT6 S350D seul vs. 5-HT6 S350D + GPRIN1

| Two Way ANOVA              |            |                     |              |                                       |                  |
|----------------------------|------------|---------------------|--------------|---------------------------------------|------------------|
| Facteur distance du soma   |            | GPRIN1              |              | Interaction distance au soma X GPRIN1 |                  |
| F (DFn, DFd)               | P value    | F (DFn, DFd)        | P value      | F (DFn, DFd)                          | P value          |
| F (110, 9768) = 126,7      | P < 0,0001 | F (1, 9768) = 1,691 | P = 0,1934   | F (110, 9768) = 1,030                 | P = 0,3974       |
| Test a posteriori de Sidak |            |                     |              |                                       |                  |
| Distance au soma (µm)      | Mean Diff, | 95% CI of diff,     | Significant? | Summary                               | Adjusted P Value |
| 5                          | 0,2889     | 0,05598 to 0,5218   | Yes          | **                                    | 0,0016           |
| 10                         | 0,2        | -0,03292 to 0,4329  | No           | ns                                    | 0,254            |
| 15                         | 0          | -0,2329 to 0,2329   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 20                         | -0,1111    | -0,3440 to 0,1218   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 25                         | -0,06662   | -0,2995 to 0,1663   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 30                         | 0,06667    | -0,1662 to 0,2996   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 35                         | 0,08889    | -0,1440 to 0,3218   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 40                         | -0,06666   | -0,2996 to 0,1663   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 45                         | -0,1556    | -0,3885 to 0,07737  | No           | ns                                    | 0,8854           |
| 50                         | -0,2667    | -0,4996 to -0,03374 | Yes          | **                                    | 0,0068           |
| 55                         | -0,2       | -0,4329 to 0,03292  | No           | ns                                    | 0,254            |
| 60                         | -0,1556    | -0,3885 to 0,07736  | No           | ns                                    | 0,8853           |
| 65                         | -0,2444    | -0,4774 to -0,01152 | Yes          | *                                     | 0,0261           |
| 70                         | -0,2       | -0,4329 to 0,03292  | No           | ns                                    | 0,254            |
| 75                         | -0,2222    | -0,4551 to 0,01069  | No           | ns                                    | 0,0884           |
| 80                         | -0,1111    | -0,3440 to 0,1218   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 85                         | -0,02223   | -0,2551 to 0,2107   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 90                         | -0,06667   | -0,2996 to 0,1662   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 95                         | -0,04444   | -0,2774 to 0,1885   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 100                        | 0          | -0,2329 to 0,2329   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 105                        | 0,04445    | -0,1885 to 0,2774   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 110                        | 0,08889    | -0,1440 to 0,3218   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 115                        | 0,06667    | -0,1663 to 0,2996   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 120                        | 0,04444    | -0,1885 to 0,2774   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 125                        | 0,04444    | -0,1885 to 0,2774   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 130                        | 0,06667    | -0,1663 to 0,2996   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 135                        | 0,02222    | -0,2107 to 0,2551   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 140                        | 0          | -0,2329 to 0,2329   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 145                        | 0          | -0,2329 to 0,2329   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 150                        | 0          | -0,2329 to 0,2329   | No           | ns                                    | > 0,9999         |

Figure n° 32 NG 108-15 : 5-HT6 Gsdead seul vs. 5-HT6 Gsdead + GPRIN1

| Two Way ANOVA              |            |                     |              |                                       |                  |
|----------------------------|------------|---------------------|--------------|---------------------------------------|------------------|
| Facteur distance du soma   |            | GPRIN1              |              | Interaction distance au soma X GPRIN1 |                  |
| F (DFn, DFd)               | P value    | F (DFn, DFd)        | P value      | F (DFn, DFd)                          | P value          |
| F (110, 9768) = 120,2      | P < 0,0001 | F (1, 9768) = 10,98 | P = 0,0009   | F (110, 9768) = 1,085                 | P = 0,2572       |
| Test a posteriori de Sidak |            |                     |              |                                       |                  |
| Distance au soma (µm)      | Mean Diff, | 95% CI of diff,     | Significant? | Summary                               | Adjusted P Value |
| 5                          | -0,5204    | -0,7977 to -0,2431  | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 10                         | -0,308     | -0,5853 to -0,03073 | Yes          | *                                     | 0,0111           |
| 15                         | -0,2057    | -0,4830 to 0,07157  | No           | ns                                    | 0,6482           |
| 20                         | -0,247     | -0,5243 to 0,03027  | No           | ns                                    | 0,1821           |
| 25                         | -0,1519    | -0,4292 to 0,1254   | No           | ns                                    | 0,9981           |
| 30                         | -0,0155    | -0,2928 to 0,2618   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 35                         | 0,0341     | -0,2432 to 0,3114   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 40                         | 0,014      | -0,2633 to 0,2913   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 45                         | -0,0951    | -0,3724 to 0,1822   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 50                         | -0,09094   | -0,3682 to 0,1863   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 55                         | -0,3395    | -0,6168 to -0,06223 | Yes          | **                                    | 0,002            |
| 60                         | -0,2243    | -0,5015 to 0,05299  | No           | ns                                    | 0,4014           |
| 65                         | -0,1494    | -0,4266 to 0,1279   | No           | ns                                    | 0,9989           |
| 70                         | -0,03308   | -0,3103 to 0,2442   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 75                         | -0,09871   | -0,3760 to 0,1786   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 80                         | -0,1674    | -0,4447 to 0,1098   | No           | ns                                    | 0,9795           |
| 85                         | -0,0956    | -0,3729 to 0,1817   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 90                         | -0,1137    | -0,3910 to 0,1636   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 95                         | -0,1339    | -0,4111 to 0,1434   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 100                        | -0,01653   | -0,2938 to 0,2607   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 105                        | 0,05426    | -0,2230 to 0,3315   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 110                        | 0,1008     | -0,1765 to 0,3780   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 115                        | 0,07855    | -0,1987 to 0,3558   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 120                        | 0,05737    | -0,2199 to 0,3346   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 125                        | 0,01292    | -0,2643 to 0,2902   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 130                        | 0,08165    | -0,1956 to 0,3589   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 135                        | -0,00827   | -0,2855 to 0,2690   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 140                        | 0,04031    | -0,2370 to 0,3176   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 145                        | -0,0031    | -0,2804 to 0,2742   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 150                        | -0,02532   | -0,3026 to 0,2519   | No           | ns                                    | > 0,9999         |



Figure n° 32 NG 108-15 : 5-HT6 SB 271046 vs. 5-HT6 SB 271046 + GPRIN1

| Two Way ANOVA              |            |                     |              |                                       |                  |
|----------------------------|------------|---------------------|--------------|---------------------------------------|------------------|
| Facteur distance du soma   |            | GPRIN1              |              | Interaction distance au soma X GPRIN1 |                  |
| F (DFn, DFd)               | P value    | F (DFn, DFd)        | P value      | F (DFn, DFd)                          | P value          |
| F (110, 9435) = 91,32      | P < 0,0001 | F (1, 9435) = 122,1 | P < 0,0001   | F (110, 9435) = 3,080                 | P < 0,0001       |
| Test a posteriori de Sidak |            |                     |              |                                       |                  |
| Distance au soma (µm)      | Mean Diff, | 95% CI of diff,     | Significant? | Summary                               | Adjusted P Value |
| 5                          | 0,0682     | -0,4073 to 0,5437   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 10                         | -0,2209    | -0,6964 to 0,2546   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 15                         | -0,1717    | -0,6472 to 0,3038   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 20                         | -0,3969    | -0,8724 to 0,07865  | No           | ns                                    | 0,3199           |
| 25                         | -0,4641    | -0,9396 to 0,01145  | No           | ns                                    | 0,0677           |
| 30                         | -0,7362    | -1,212 to -0,2607   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 35                         | -0,7781    | -1,254 to -0,3026   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 40                         | -0,8013    | -1,277 to -0,3258   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 45                         | -0,8911    | -1,367 to -0,4156   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 50                         | -0,6765    | -1,152 to -0,2010   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 55                         | -0,5798    | -1,055 to -0,1042   | Yes          | **                                    | 0,0022           |
| 60                         | -0,5994    | -1,075 to -0,1238   | Yes          | **                                    | 0,0011           |
| 65                         | -0,6659    | -1,141 to -0,1904   | Yes          | ***                                   | 0,0001           |
| 70                         | -0,7124    | -1,188 to -0,2369   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 75                         | -0,6174    | -1,093 to -0,1418   | Yes          | ***                                   | 0,0006           |
| 80                         | -0,6607    | -1,136 to -0,1852   | Yes          | ***                                   | 0,0001           |
| 85                         | -0,5909    | -1,066 to -0,1154   | Yes          | **                                    | 0,0015           |
| 90                         | -0,4493    | -0,9248 to 0,02629  | No           | ns                                    | 0,099            |
| 95                         | -0,518     | -0,9935 to -0,04242 | Yes          | *                                     | 0,0151           |
| 100                        | -0,5629    | -1,038 to -0,08734  | Yes          | **                                    | 0,0038           |
| 105                        | -0,6321    | -1,108 to -0,1566   | Yes          | ***                                   | 0,0004           |
| 110                        | -0,4704    | -0,9459 to 0,005148 | No           | ns                                    | 0,0574           |
| 115                        | -0,4234    | -0,8989 to 0,05219  | No           | ns                                    | 0,1833           |
| 120                        | -0,3303    | -0,8059 to 0,1452   | No           | ns                                    | 0,8127           |
| 125                        | -0,1454    | -0,6209 to 0,3302   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 130                        | -0,1216    | -0,5971 to 0,3540   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 135                        | -0,05074   | -0,5263 to 0,4248   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 140                        | -0,1417    | -0,6172 to 0,3339   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 145                        | -0,2569    | -0,7324 to 0,2187   | No           | ns                                    | 0,9988           |
| 150                        | -0,2791    | -0,7546 to 0,1965   | No           | ns                                    | 0,989            |

Figure n° 32 NG 108-15 : 5-HT6 RpcAMP vs. 5-HT6 RpcAMP+ GPRIN1

| Two Way ANOVA              |            |                     |              |                                       |                  |
|----------------------------|------------|---------------------|--------------|---------------------------------------|------------------|
| Facteur distance du soma   |            | GPRIN1              |              | Interaction distance au soma X GPRIN1 |                  |
| F (DFn, DFd)               | P value    | F (DFn, DFd)        | P value      | F (DFn, DFd)                          | P value          |
| F (110, 9768) = 141,5      | P < 0,0001 | F (1, 9768) = 82,26 | P < 0,0001   | F (110, 9768) = 3,450                 | P < 0,0001       |
| Test a posteriori de Sidak |            |                     |              |                                       |                  |
| Distance au soma (µm)      | Mean Diff, | 95% CI of diff,     | Significant? | Summary                               | Adjusted P Value |
| 5                          | 0,4807     | 0,06828 to 0,8931   | Yes          | **                                    | 0,005            |
| 10                         | 0,6801     | 0,2677 to 1,093     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 15                         | 0,9473     | 0,5349 to 1,360     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 20                         | 1,118      | 0,7060 to 1,531     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 25                         | 0,5669     | 0,1545 to 0,9793    | Yes          | ***                                   | 0,0002           |
| 30                         | 0,662      | 0,2496 to 1,074     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 35                         | 0,8651     | 0,4527 to 1,278     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 40                         | 0,8884     | 0,4760 to 1,301     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 45                         | 0,632      | 0,2196 to 1,044     | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 50                         | 0,2481     | -0,1643 to 0,6605   | No           | ns                                    | 0,9811           |
| 55                         | 0,2946     | -0,1178 to 0,7070   | No           | ns                                    | 0,7484           |
| 60                         | 0,0533     | -0,3591 to 0,4657   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 65                         | 0,1483     | -0,2641 to 0,5607   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 70                         | 0,3809     | -0,03155 to 0,7933  | No           | ns                                    | 0,1267           |
| 75                         | 0,3204     | -0,09202 to 0,7328  | No           | ns                                    | 0,5157           |
| 80                         | 0,1215     | -0,2910 to 0,5339   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 85                         | 0,2662     | -0,1463 to 0,6786   | No           | ns                                    | 0,931            |
| 90                         | 0,153      | -0,2595 to 0,5654   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 95                         | 0,08941    | -0,3230 to 0,5018   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 100                        | 0,06925    | -0,3432 to 0,4817   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 105                        | 0,1178     | -0,2946 to 0,5303   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 110                        | 0,1897     | -0,2228 to 0,6021   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 115                        | 0,1432     | -0,2693 to 0,5556   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 120                        | 0,124      | -0,2884 to 0,5365   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 125                        | 0,2171     | -0,1954 to 0,6295   | No           | ns                                    | 0,9994           |
| 130                        | 0,2625     | -0,1499 to 0,6750   | No           | ns                                    | 0,9449           |
| 135                        | 0,108      | -0,3044 to 0,5204   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 140                        | 0,04134    | -0,3711 to 0,4538   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 145                        | 0,1323     | -0,2801 to 0,5447   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 150                        | 0,1101     | -0,3024 to 0,5225   | No           | ns                                    | > 0,9999         |

Figure n° 32 NG 108-15 : 5-HT6 KT5720 vs. 5-HT6 5720 + GPRIN1

| Two Way ANOVA              |            |                     |              |                                       |                  |
|----------------------------|------------|---------------------|--------------|---------------------------------------|------------------|
| Facteur distance du soma   |            | GPRIN1              |              | Interaction distance au soma X GPRIN1 |                  |
| F (DFn, DFd)               | P value    | F (DFn, DFd)        | P value      | F (DFn, DFd)                          | P value          |
| F (110, 9879) = 132,3      | P < 0,0001 | F (1, 9879) = 32,72 | P < 0,0001   | F (110, 9879) = 2,198                 | P < 0,0001       |
| Test a posteriori de Sidak |            |                     |              |                                       |                  |
| Distance au soma (µm)      | Mean Diff, | 95% CI of diff,     | Significant? | Summary                               | Adjusted P Value |
| 5                          | -0,6502    | -1,108 to -0,1927   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 10                         | -0,7276    | -1,185 to -0,2701   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 15                         | -0,8096    | -1,267 to -0,3521   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 20                         | -1,229     | -1,686 to -0,7710   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 25                         | -0,7811    | -1,239 to -0,3236   | Yes          | ****                                  | < 0,0001         |
| 30                         | -0,5574    | -1,015 to -0,0986   | Yes          | **                                    | 0,0022           |
| 35                         | -0,3995    | -0,8570 to 0,05804  | No           | ns                                    | 0,2194           |
| 40                         | -0,172     | -0,6295 to 0,2855   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 45                         | -0,0145    | -0,4720 to 0,4430   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 50                         | -0,255     | -0,7125 to 0,2025   | No           | ns                                    | 0,997            |
| 55                         | -0,1633    | -0,6208 to 0,2942   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 60                         | -0,0715    | -0,5290 to 0,3860   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 65                         | -0,1343    | -0,5918 to 0,3232   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 70                         | 0,1309     | -0,3266 to 0,5885   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 75                         | 0,06957    | -0,3880 to 0,5271   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 80                         | 0,0715     | -0,3860 to 0,5290   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 85                         | -0,0372    | -0,4947 to 0,4203   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 90                         | -0,01159   | -0,4691 to 0,4460   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 95                         | -0,01111   | -0,4687 to 0,4464   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 100                        | -0,07487   | -0,5324 to 0,3827   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 105                        | -0,1401    | -0,5976 to 0,3175   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 110                        | -0,2701    | -0,7276 to 0,1875   | No           | ns                                    | 0,9875           |
| 115                        | -0,2034    | -0,6609 to 0,2542   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 120                        | -0,2029    | -0,6604 to 0,2546   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 125                        | -0,2024    | -0,6600 to 0,2551   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 130                        | -0,1797    | -0,6373 to 0,2778   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 135                        | -0,156     | -0,6136 to 0,3015   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 140                        | -0,04493   | -0,5025 to 0,4126   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 145                        | -0,04444   | -0,5020 to 0,4131   | No           | ns                                    | > 0,9999         |
| 150                        | -0,04444   | -0,5020 to 0,4131   | No           | ns                                    | > 0,9999         |

Analyse du test des trois chambres

| FIGURE n° | Variables testées              | Two Way ANOVA        |            |   |            |                               |            |
|-----------|--------------------------------|----------------------|------------|---|------------|-------------------------------|------------|
|           |                                | Interacteur ou objet |            | Facteur groupe de souris (Wt Sal Ko Sal Wt Sb Ko) |            | Interaction Genotype X groupe |            |
|           |                                | F (DFn, DFd)         | P value    | F (DFn, DFd)                                      | P value    | F (DFn, DFd)                  | P value    |
| 36        | nombre de contacts du museau   | F (1, 66) = 44,77    | P < 0,0001 | F (3, 66) = 1,104                                 | P = 0,3540 | F (3, 66) = 2,752             | P = 0,0495 |
|           | temps passé en interaction     | F (1, 66) = 53,83    | P < 0,0001 | F (3, 66) = 4,457                                 | P = 0,0065 | F (3, 66) = 10,93             | P < 0,0001 |
|           | durée moyenne des interactions | F (1, 66) = 16,21    | P = 0,0001 | F (3, 66) = 2,129                                 | P = 0,1049 | F (3, 66) = 14,32             | P < 0,0001 |

# ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test a posteriori de Tukey

| Analyse du comportement         |   |                     |                   |                    |                   |                                   |            |
|---------------------------------|---|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------------|------------|
| FIGURE n°                       | Variables testées   | Two Way ANOVA       |                   |                    |                   |                                   |            |
|                                 |   | Facteur génotype    |                   | Facteur traitement |                   | Interaction Genotype X traitement |            |
|                                 |   | F (DFn, DFd)        | P value           | F (DFn, DFd)       | P value           | F (DFn, DFd)                      | P value    |
| 35                              | <b>test d'interaction sociale directe</b>                     |                     |                   |                    |                   |                                   |            |
|                                 | nombre de contacts du museau                                  | F (1, 34) = 1,518   | P = 0,2264        | F (1, 34) = 3,248  | P = 0,0804        | F (1, 34) = 5,302                 | P = 0,0275 |
|                                 | temps passé en contact du museau                              | F (1, 34) = 31,98   | P < 0,0001        | F (1, 34) = 18,79  | P = 0,0001        | F (1, 34) = 34,05                 | P < 0,0001 |
|                                 | durée moyenne des contacts du museau                          | F (1, 34) = 83,81   | P < 0,0001        | F (1, 34) = 32,47  | P < 0,0001        | F (1, 34) = 52,86                 | P < 0,0001 |
|                                 | nombre de contacts des pattes                                 | F (1, 34) = 2,715   | P = 0,1086        | F (1, 34) = 9,022  | P = 0,0050        | F (1, 34) = 4,543                 | P = 0,0404 |
|                                 | temps passé en contacts des pattes                            | F (1, 34) = 6,566   | P = 0,0150        | F (1, 34) = 8,623  | P = 0,0059        | F (1, 34) = 2,519                 | P = 0,1218 |
|                                 | durée moyenne des contacts des pattes                         | F (1, 34) = 45,89   | P < 0,0001        | F (1, 34) = 22,90  | P < 0,0001        | F (1, 34) = 12,59                 | P = 0,0012 |
|                                 | temps total passé en interaction sociale                      | F (1, 34) = 32,89   | P < 0,0001        | F (1, 34) = 20,20  | P < 0,0001        | F (1, 34) = 33,78                 | P < 0,0001 |
|                                 | redressements   | F (1, 34) = 9,280   | P = 0,0045        | F (1, 34) = 3,102  | P = 0,0872        | F (1, 34) = 2,703                 | P = 0,1094 |
|                                 | toiletages  | F (1, 34) = 0,5525  | P = 0,4624        | F (1, 34) = 3,701  | P = 0,0628        | F (1, 34) = 2,342                 | P = 0,1352 |
| toiletages après contact social | F (1, 34) = 22,60   | P < 0,0001          | F (1, 34) = 24,08 | P < 0,0001         | F (1, 34) = 17,78 | P = 0,0002                        |            |
| 37                              | <b>Alternance dans un labyrinthe en Y</b>                     |                     |                   |                    |                   |                                   |            |
|                                 | %SPA  | F (1, 34) = 0,01428 | P = 0,9056        | F (1, 34) = 10,43  | P = 0,0027        | F (1, 34) = 3,070                 | P = 0,0888 |
|                                 | %AAR  | F (1, 34) = 3,736   | P = 0,0616        | F (1, 34) = 0,1453 | P = 0,7054        | F (1, 34) = 2,227                 | P = 0,1449 |
|                                 | %SAR  | F (1, 34) = 1,144   | P = 0,2924        | F (1, 34) = 0,3246 | P = 0,5726        | F (1, 34) = 6,760                 | P = 0,0137 |
|                                 | <b>Analyse des stéréotypies</b>                               |                     |                   |                    |                   |                                   |            |
|                                 | nombre de secouements de la tête                              | F (1, 34) = 2,822   | P = 0,1021        | F (1, 34) = 1,808  | P = 0,1876        | F (1, 34) = 26,39                 | P < 0,0001 |
|                                 | nombre de déplacements circulaires                            | F (1, 34) = 0,2081  | P = 0,6512        | F (1, 34) = 0,8324 | P = 0,3680        | F (1, 34) = 7,078                 | P = 0,0118 |
| nombre de redressements         | F (1, 34) = 0,5638  | P = 0,4579          | F (1, 34) = 4,072 | P = 0,0515         | F (1, 34) = 6,382 | P = 0,0163                        |            |
| 38                              | <b>Test d'enfouissement de billes</b>                         |                     |                   |                    |                   |                                   |            |
|                                 | nombre de billes enfouies                                     | F (1, 34) = 0,1487  | P = 0,7022        | F (1, 34) = 4,216  | P = 0,0478        | F (1, 34) = 3,103                 | P = 0,0871 |
|                                 | <b>Test de suppression de l'alimentation par la nouveauté</b> |                     |                   |                    |                   |                                   |            |
|                                 | latence avant consommation des granulés alimentaires          | F (1, 34) = 17,57   | P = 0,0002        | F (1, 34) = 1,122  | P = 0,2970        | F (1, 34) = 1,512                 | P = 0,2273 |
| 39                              | <b>ROTAROD jour 1 session 1</b>                               |                     |                   |                    |                   |                                   |            |
|                                 | Latence avant chute   | F (1, 32) = 3,696   | P = 0,0635        | F (1, 32) = 0,5360 | P = 0,4694        | F (1, 32) = 0,007718              | P = 0,9305 |
|                                 | <b>ROTAROD jour 5 session 3</b>                               |                     |                   |                    |                   |                                   |            |
|                                 | Latence avant chute   | F (1, 32) = 16,13   | P = 0,0003        | F (1, 32) = 15,20  | P = 0,0005        | F (1, 32) = 0,2973                | P = 0,5894 |
| 40                              | <b>Test d'immersion de la queue</b>                           |                     |                   |                    |                   |                                   |            |
|                                 | Latnce de retrait à 48°C                                      | F (1, 32) = 10,49   | P = 0,0028        | F (1, 32) = 86,98  | P < 0,0001        | F (1, 32) = 3,968                 | P = 0,0550 |
|                                 | Latnce de retrait à 50°C                                      | F (1, 32) = 7,117   | P = 0,0119        | F (1, 32) = 22,01  | P < 0,0001        | F (1, 32) = 0,2464                | P = 0,6230 |
|                                 | Latnce de retrait à 52°C                                      | F (1, 32) = 1,744   | P = 0,1960        | F (1, 32) = 6,277  | P = 0,0175        | F (1, 32) = 4,732                 | P = 0,0371 |

## ANNEXE 2 : PUBLICATIONS

Article en collaboration avec le Dr  
Laurence Lalanne-Tongio

*Département de psychiatrie et d'addictologie, CHU  
de Strasbourg*

## RESUME

# Effets cognitifs des traitements addictolytiques : Une méta analyse

**MOTS-CLES:** COGNITION ; TRAITEMENTS POUR LA REDUCTION DE LA CONSOMMATION D'ALCOOL ; TRAITEMENTS POUR LE MAINTIEN DE L'ABSTINENCE DANS LA DEPENDANCE A L'ALCOOL ; TRAITEMENTS DE SUBSTITUTION A LA DEPENDANCE AUX OPIACES ; TRAITEMENT DE LA DEPENDANCE AU TABAC

**Introduction :** L'usage d'alcool, de tabac et de drogues illicites est omniprésent dans le monde entier, et l'abus de ces substances est un contributeur majeur au fardeau mondial de la maladie. De nombreuses pharmacothérapies ont été développées au cours des 50 dernières années pour cibler les troubles addictifs. Alors que l'efficacité de ces pharmacothérapies est largement reconnue, leur impact cognitif est moins connu. Cependant, tous les troubles de la toxicomanie sont connus pour favoriser les troubles cognitifs tels que le dysfonctionnement exécutif et les troubles de la mémoire. Ces déficiences sont critiques pour le maintien des comportements addictifs et entravent les thérapies cognitivo-comportementales qui sont régulièrement administrées en association avec les pharmacothérapies. On ignore également si les médicaments addictolytiques ont un impact sur les troubles cognitifs préexistants et si cet effet est modulé par l'indication de la prescription, c'est-à-dire l'abstinence, la réduction ou la substitution, ou par l'action spécifique du médicament.

**Méthode :** Dans cette revue, Nous avons examiné les effets cognitifs des médicaments prescrits pour le tabagisme (varénicline, bupropion, patchs à la nicotine et gommes à la nicotine), l'alcoolisme (naltrexone, nalmefène, baclofène, disulfiram, oxybate de sodium, acamprosate) et la dépendance aux opiacés (méthadone, buprénorphine) dans les études humaines. Les études ont été sélectionnées en suivant les lignes directrices de *MOOSE* pour les méta analyses, en utilisant les mots-clés [cognition] et [troubles cognitifs] et [traitement] pour chaque médicament.

**Résultats :** 971 articles ont été évalués, et 77 de ces études ont rempli les critères et ont été inclus dans cette revue (pour l'alcool, n = 21, pour le tabac n = 22, pour les opioiacés n = 34). Cependant, très peu d'essais cliniques comparatifs ont exploré les effets de l'exposition chronique aux traitements addictolytiques sur la cognition chez des sujets addicts.

**Discussion :** Bien que certaines médications semblent améliorer la cognition chez des patients souffrant de troubles cognitifs, d'autres pourraient favoriser les déficiences cognitives, et notre travail souligne le manque de littérature sur ce sujet. En conclusion, plus d'essais cliniques comparatifs sont nécessaires afin de mieux comprendre l'impact cognitif des médicaments addictolytiques.

## ABSTRACT

# Cognitive effects of labeled addictolytic medications

**KEYWORDS:** COGNITION TREATMENTS FOR THE REDUCTION OF ALCOHOL CONSUMPTION TREATMENTS FOR THE MAINTENANCE OF ABSTINENCE IN ALCOHOL DEPENDENCE TREATMENTS OF OPIATE ADDICTION SUBSTITUTION TREATMENTS TREATMENT OF TOBACCO DEPENDENCE

**Introduction:** Alcohol, tobacco, and illegal drug usage is pervasive throughout the world, and abuse of these substances is a major contributor to the global disease burden. Many pharmacotherapies have been developed over the last 50 years to target addictive disorders. While the efficacy of these pharmacotherapies is largely recognized, their cognitive impact is less known. However, all substance abuse disorders are known to promote cognitive disorders like executive dysfunction and memory impairment. These impairments are critical for the maintenance of addictive behaviors and impede cognitive behavioral therapies that are regularly administered in association with pharmacotherapies. It is also unknown if addictolytic medications have an impact on preexisting cognitive disorders, and if this impact is modulated by the indication of prescription, i.e. abstinence, reduction or substitution, or by the specific action of the medication. **Method:** We reviewed the cognitive effects of labeled medications for tobacco addiction (varenicline, bupropion, nicotine patch and nicotine gums), alcohol addiction (naltrexone, nalmefene, baclofen, disulfiram, sodium oxybate, acamprosate), and opioid addiction (methadone, buprenorphine) in human studies. Studies were selected following MOOSE guidelines for systematic reviews of observational studies, using the keywords [Cognition] and [Cognitive disorders] and [treatment] for each medication.

**Results:** 971 articles were screened and 77 studies met the inclusion criteria and were reported in this review (for alcohol abuse, n= 21, for tobacco n = 22, for opioid n = 34. However, very few comparative clinical trials have explored the chronic effects of addictolytic medications on cognition in addictive behaviors, and there are no clinical trials on the cognitive impact of nalmefene in patients suffering from alcohol use disorders.

**Discussion:** Although some medications seem to enhance cognition in patients suffering from cognitive disorders, others could promote cognitive impairments, and our work highlights a lack of literature on this subject. In conclusion, more comparative clinical trials are needed to better understand the cognitive impact of addictolytic medications.





Chapitre de livre en collaboration  
avec les Drs Julie Le Merrer et  
Jérôme Becker

*Unité Physiologie de la Reproduction et des  
Comportements, INRA, Nouzilly*

## RESUME

# Récepteurs Delta Opiïdes : Apprentissage et Motivation.

**MOTS CLÉS:** APPRENTISSAGE ASSOCIATIF ; ASSOCIATIONS DROGUE-CONTEXTE; GPR88; HIPPOCAMPE ; APPRENTISSAGE PROCEDURAL; STRIATUM

Les récepteurs Delta des opioïdes (DOR) présentent une structure unique, hautement conservée, et un schéma de distribution original dans le système nerveux central, indiquant un rôle fonctionnel distinct et spécifique parmi les récepteurs des opioïdes. Au cours des 15 dernières années, la pharmacologie *in vivo* et les modèles génétiques ont permis des avancées significatives dans la compréhension de ce rôle. Dans cette revue, nous nous concentrerons sur l'implication des DOR dans la modulation de différents types de processus d'apprentissage dépendant de l'hippocampe et du striatum, ainsi que la fonction motrice, la motivation et la récompense. Remarquablement, les DOR semblent jouer un rôle clé dans l'équilibre des fonctions hippocampique et striatale, avec des implications majeures pour le contrôle des performances cognitives et des fonctions motrices dans en conditions physiologique et pathologiques.

## ABSTRACT

# Delta Opioid Receptors : Learning and Motivation.

**KEYWORDS:** ASSOCIATIVE LEARNING; DRUG–CONTEXT ASSOCIATIONS; GPR88; HIPPOCAMPUS; PROCEDURAL LEARNING; STRIATUM

Delta opioid receptor (DOR) displays a unique, highly conserved, structure and an original pattern of distribution in the central nervous system, pointing to a distinct and specific functional role among opioid peptide receptors. Over the last 15 years, in vivo pharmacology and genetic models have allowed significant advances in the understanding of this role. In this review, we will focus on the involvement of DOR in modulating different types of hippocampal- and striatal-dependent learning processes as well as motor function, motivation, and reward. Remarkably, DOR seems to play a key role in balancing hippocampal and striatal functions, with major implications for the control of cognitive performance and motor function under healthy and pathological conditions.